



HÉVEA DE MORAIS

**USO DA SOMATOTROPINA RECOMBINANTE
BOVINA (r_b ST) EM ASSOCIAÇÃO COM A
GONADOTROFINA CORIÔNICA EQUINA (e CG)
NO NÚMERO DE FOLÍCULOS ANTRAIS
ASPIRADOS EM NOVILHAS HOLANDESAS
(HOL) E TABAPUÃ (TAB)**

LAVRAS - MG

2011

HÉVEA DE MORAIS

USO DA SOMATOTROPINA RECOMBINANTE BOVINA (r_{bST}) EM ASSOCIAÇÃO COM A GONADOTROFINA CORIÔNICA EQUINA (eCG) NO NÚMERO DE FOLÍCULOS ANTRAIAS ASPIRADOS EM NOVILHAS HOLANDESAS (HOL) E TABAPUÃ (TAB)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Ruminantes, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. José Camisão de Souza

LAVRAS – MG

2011

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Morais, Hévea de.

Uso da somatotropina recombinante bovina (_{rb}ST) em associação com a gonadotrofina coriônica equina (_eCG) no número de folículos antrais aspirados em novilhas holandesas (HOL) e tabapuã (TAB) / Hévea de Moraes. – Lavras: UFLA, 2011.

50 p.: il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: José Camisão de Souza.

Bibliografia.

1. Aspiração folicular. 2. Oócito. 3. Embrião. 4. Ovário.

I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.20824

HÉVEA DE MORAIS

USO DA SOMATOTROPINA RECOMBINANTE BOVINA (r_{bST}) EM ASSOCIAÇÃO COM A GONADOTROFINA CORIÔNICA EQUINA (cCG) NO NÚMERO DE FOLÍCULOS ANTRAIS ASPIRADOS EM NOVILHAS HOLANDESAS (HOL) E TABAPUÃ (TAB)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Ruminantes, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 15 de Fevereiro de 2011

Dra. Ana Tereza de Mendonça Viveiros UFLA

Dr. Eduardo Pinto Filgueiras UFLA

Dr. Márcio Zangerônimo UFLA

Dr. José Camisão de Souza
Orientador

**LAVRAS - MG
2011**

A Deus, com amor e gratidão,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Zootecnia (DZO), pela oportunidade concedida para realização do mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

Todos os conhecimentos adquiridos, os sucessos alcançados, todos os momentos de alegria que são frutos colhidos de uma grande jornada.

À minha mãe, que é o meu alicerce de vida, uma grande guerreira, um exemplo de dedicação e principalmente amor, é super amiga, posso contar com ela em todos os momentos de minha vida, mãe Eu Te Amo!

Aos meus irmãos, que mesmo distantes, me enchem de carinho e atenção, que tenho o maior orgulho...Amo vocês!!

Ao meu namorado, pôr ter me dado força, atenção e ter compartilhado os momentos mais difíceis ao meu lado!

Ao meu orientador, José Camisão de Souza, pôr ter me apoiado em todos os momentos da elaboração da dissertação.

À Veterinária Renata Spuri, pôr ter dedicado o seu tempo e suas habilidades para o início e término deste experimento. Agradeço a sua paciência e competência.

Aos integrantes do grupo GERE (Grupo de estudo em Reprodução - UFLA), em especial, à Rafaela e Renato, pela preciosa ajuda na condução do experimento.

RESUMO

O objetivo do presente experimento foi investigar se, em novilhas nulíparas Tabapuã (TAB) e Holandesas (HOL) ciclando, se o uso de rbST em associação eCG, previamente à aspiração folicular, promove melhora significativa na quantidade e na qualidade dos ovócitos recuperados. O estudo foi conduzido em esquema *change over*. Na primeira fase, novilhas HOL (12) e TAB (16) foram blocadas segundo sua população folicular antral (média de duas contagens prévias) e distribuídas igualmente (contagem alta e baixa) para um de dois tratamentos, após ablação do folículo dominante, dois dias antes (D-2) do início dos protocolos: **Grupo 1 ou Estimulado** (HOL, n=6 e TAB, n=8): injeção única de 500 mg de rbST (Boostin[®], Intervet, SP) no primeiro dia (D0) e 500 UI de eCG (Folligon[®], Intervet, SP) no D2. **Grupo 2 ou Controle** (HOL, n=6 e TAB, n=8)- somente veículo. Todas as novilhas foram submetidas a aspiração folicular (OPU) no D4, totalizando 55 sessões. Os protocolos foram repetidos 20 dias após a primeira OPU, alternando-se os animais nos tratamentos. A ultrassonografia foi realizada a cada dois dias, a partir do D-2 até o D4, e as imagens gravadas para contagem dos folículos subordinados e mensuração dos diâmetros dos folículos dominantes e subdominantes. Os ovócitos foram rastreados e classificados segundo as normas da International Embryo Transfer Society (IETS). Posteriormente, foram fertilizados e colocados em cultura durante 7 dias em um esquema de rotina de PIV (VITROGEN[®], Cravinhos, SP, Brasil). Os dados relativos aos efeitos do tratamento e da raça sobre o número de folículos aspirados, número e qualidade dos ovócitos, proporções de ovócitos: fertilizados e completando cada estágio de desenvolvimento em cultura (mórula, blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido e eclodido) foram analisados por meio do procedimento de modelos lineares generalizados (GENMOD- SAS[®], Cary, NC, EUA) com a opção de distribuições de Poisson e binomial (no caso de proporções). O estímulo hormonal com rbST e eCG combinados, prévio à aspiração folicular, aumentou ($P < 0,01$) o número de folículos antrais (2-8mm) na raça Tabapuã (de $29,9 \pm 2,6$ para $41,4 \pm 2,6$), mas não na raça Holandesa (de $14,4 \pm 2,6$ para $15,5 \pm 2,6$). Ficou claro que a raça Tabapuã ($35,6 \pm 1,8$) tem população folicular média mais elevada do que a Holandesa ($15,0 \pm 2,1$) ($P < 0,0001$). O número de estruturas viáveis não foi aumentado pelo tratamento ($P > 0,05$) tanto na raça Tabapuã (de $4,7 \pm 1,0$ para $5,2 \pm 1,1$) quanto na Holandesa (de $1,3 \pm 1,9$ para $2,0 \pm 1,6$). Houve maior percentual (33 vs. 27%) de novilhas com mais de 5 ovócitos viáveis no grupo tratado. A média de embriões atingindo o estágio de blastocisto não foi influenciada pelo tratamento (1,75 vs. 1,00 para estimulado e controle, respectivamente). Conclui-se que o aumento do número de folículos ovarianos obtidos pelo estímulo hormonal foi dependente da composição genética e não teve reflexo na quantidade e no desenvolvimento dos

ovócitos, nas condições do presente experimento. No entanto, em termos de qualidade, houve maior rendimento por animal aspirado em função do estímulo. Finalmente, estes resultados apontam para a necessidade de testes adicionais, especialmente para a raça Holandesa.

Palavras-chave: Aspiração folicular. Oócito. Embrião. Ovário.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate whether the use of rbST in combination with a low dose of eCG prior to follicular aspiration provides a significant improvement in the quantity and quality of oocytes retrieved in cycling nulliparous Tabapuã (TAB) and Holstein (HOL) heifers. The study was conducted in a change-over design. In the first phase, HOL (12) and TAB (18) heifers were blocked according to their antral follicular populations (average of two previous counts) and allocated equally (high and low counts) to one of two treatments, after ablation of the dominant follicle two days before (D-2) treatment onset: **Group 1** (HOL, n = 6 and TAB, n = 8) a single injection of 500 mg of rbST (Boostin[®], Intervet, SP) on the first day (D0) and 500 IU of eCG (Novormon[®], Intervet, Brazil) on D2. **Group 2 or control** (HOL, n = 6 and TAB, n = 8) only vehicle. All heifers were submitted to ovum pick up (OPU) on D4 for a total of 55 sessions. This protocol was repeated 20 days after OPU, alternating animals in the treatment groups. Ultrasonography was performed every other day, from D-2 to D4, and images recorded in order to count the number of subordinate follicles and measure the diameters of the dominant and subdominant follicles. Oocytes were retrieved and classified according to International Embryo Transfer Society (IETS) standards. Later, oocytes were matured, fertilized and placed in culture for 7 days on a routine IVF regimen (VITROGEN[®], Cravinhos, SP, Brazil). Data relative to the effects of treatment and breed on the number of aspirated follicles, oocyte number and quality, proportions of oocytes fertilized and completing each developmental stage (morula, early blastocyst, blastocyst, expanded and hatched blastocyst) were analyzed by a generalized linear model procedure (GENMOD, SAS[®], Cary, NC, USA), with the poisson and binomial (for proportions) options and a the scale held fixed (noscale). The combined hormonal stimulation with rbST and eCG, prior to OPU, increased (P <0.01) the number of antral follicles (2-8mm) in Tabapuã (from 29.9±2.6 to 41.4±2.6), but not in Holstein heifers (from 14.4±2.6 to 15.5±2.6). It is clear that the Tabapuã breed (35.6±1.8) has a higher mean antral follicle population than Holstein (15.0±2.1) (P <0.0001). The number of viable structures was not increased by the treatment neither in Holstein (from 4.7±1.0 to 5.2±1.1) nor in Tabapuã heifers (from 1.3±1.9 to 2.0±1.6). There was a greater percentage (33 vs 27%) of heifers with more than five viable oocytes in the treated group. The average number of embryos that reached the blastocyst stage was not affected by treatment (1.75 vs. 1.00 in treated and controls, respectively). However, in terms of quality, there was a higher viable structure yield per aspirated animal in response to the stimulus. Finally, these results underscore the need for additional tests, especially for the Holstein breed.

Keywords: Ovum pick up. Oocyte. Embryo. Ovary.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	11
1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	Efeitos fisiológicos da Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG)	14
2.2	Efeitos fisiológicos da Somatotropina Recombinante Bovina (rbST)	15
2.3	Efeitos fisiológicos do GnRH	16
2.4	Principais etapas da produção <i>in vitro</i> de embriões	17
2.4.1	Preparação da doadora e da receptora	18
2.4.2	Coleta de ovócitos através da aspiração folicular	18
2.4.3	Lavagem e seleção dos ovócitos	19
2.4.4	Maturação <i>in vitro</i> (MIV)	20
2.4.5	Fecundação <i>in vitro</i> (FIV)	20
2.4.6	Cultivo <i>in vitro</i> (CIV)	21
	REFERÊNCIAS	22
	SEGUNDA PARTE - ARTIGO	27
	ARTIGO 1 An association of recombinant bovine somatotropin (rbST) plus equine chorionic gonadotropin (eCG) and number of aspirated antral follicles in holstein (HOL) and tabapuã (TAB) heifers	27
	(Uso da Somatotropina Recombinante Bovina (rbST) em Associação com a Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG) no número de folículos antrais aspirados em Novilhas Holandesas (HOL) e Tabapuã (TAB))	27
1	INTRODUCTION	32
2	MATERIAL AND METHODS	34
3	RESULTS AND DISCUSSION	38
4	CONCLUSIONS	45
	REFERENCES	46

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A respeito da evolução da produtividade na pecuária nacional, muitas biotecnologias ligadas à reprodução animal vêm sendo desenvolvidas e aprimoradas com o intuito de maximizar a eficiência reprodutiva. Seu principal objetivo é o aumento da produção de animais geneticamente superiores, com o intuito de obter o aproveitamento deste material genético na obtenção do maior número de descendentes, em menor tempo. Na evolução das principais biotecnologias adotadas no Brasil, é importante ressaltar, o papel da Inseminação Artificial (IA), sendo a primeira biotecnologia adotada nos sistemas de produção brasileiros que visa à multiplicação genética de touros de alto valor.

Com a introdução de protocolos de ovulações múltiplas, recuperação e transferência de embriões, conhecida como Multiple Ovulation and Embryo Transfer ou MOET e a criopreservação de embriões na década de 80, a bovinocultura passou a ter em mãos ferramentas para aumentar o número de gestações provenientes de fêmeas de alto mérito genético (RODRIGUES, 2001). A produção embrionária através da Transferência de Embrião (TE) é uma biotécnica mundialmente difundida e vem apresentando crescimento acentuado, (THIBIER, 2000).

A produção de embriões *In Vitro* (PIV) é considerada a terceira geração de biotecnologia aplicada ao melhoramento genético, após IA e a TE. No início da década de 90, com a introdução da aspiração folicular guiada por ultrassonografia (Ovum Pick-up) seguida pela produção *in vitro* de embriões (OPU-PIV), a expectativa no incremento da produtividade das fêmeas superiores geneticamente aumentou. Na bovinocultura brasileira, essas tecnologias também vêm sendo amplamente utilizadas e adaptadas ao nosso sistema de produção e,

ao longo da sua evolução, tem revelado bons índices reprodutivos, confirmando ser um processo economicamente viável, bastante divulgado e empregado na pecuária moderna.

Um dos principais problemas atuais da aspiração folicular é a variabilidade nos resultados do desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos, pois, em média, apenas 30 a 40% dos oócitos maturados se desenvolvem até o estágio de blastocisto. Portanto, para otimizar a utilização da aspiração folicular em termos de número e qualidade dos complexos *cumulus oócitos* (COCs) recuperados e a competência para o desenvolvimento *in vitro* é necessário conhecer melhor a fisiologia folicular e seu controle endócrino.

A fecundação *in vitro* (FIV) pode contribuir como alternativa para a superovulação e maior produção de embriões por unidade de tempo quando comparada a TE. No entanto, mesmo com os progressos obtidos nos processos de maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) para o desenvolvimento embrionário, esta técnica ainda apresenta algumas desvantagens que precisam ser mitigadas. As taxas de produção de blastocistos bovinos oriundos de oócitos maturados e fertilizados *in vitro* têm permanecido relativamente estáticas na última década, onde somente em torno de um terço (LONERGAN, et al., 1994; THOMPSON; DUGANZICH, 1996) dos oócitos selecionados morfológicamente antes de serem submetidos a MIV resultam em embriões viáveis.

Protocolos de punção folicular utilizando pré-estimulação com FSH, cuja ação é semelhante ao eCG, resultam em maior número de folículos viáveis a serem puncionados (GIBBONS; WILTBANK; GINTHER, 1997) e diminui a quantidade de folículos atrésicos (SIRARD; PICARD; DERY, 2006). Além disso, a administração de FSH melhora a qualidade do oócitos recuperados e aumenta a percentagem de embriões transferíveis (GOODHAND; WATT; STAINES, 1999). Tem-se sugerido que o FSH seja mais eficiente em doadoras

com pouca resposta na transferência de embriões e na punção folicular guiada por ultrassom (LOONEY; LINDSEY; GONSETH, 1994).

A somatotropina recombinante bovina, quando liberada na circulação sanguínea, estimula a produção e a secreção do fator de crescimento semelhante à insulina ou IGF-I, porém, suas relações com a secreção de gonadotrofinas, com o desenvolvimento folicular, com a função luteal e com a manifestação de estro, ainda permanecem não esclarecidas (SANTOS et al., 2002).

O objetivo do presente experimento foi investigar, em novilhas nulíparas Tabapuã (TAB) e Holandesas (HOL) em atividade cíclica estral, se o uso de rbST em associação com baixas doses de eCG, previamente à aspiração folicular, promove melhora significativa na quantidade e na qualidade dos ovócitos recuperados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A fecundação *in vitro*, como técnica de melhoramento genético das raças zebuínas e taurinas, apresenta vantagens como aumento da taxa reprodutiva das fêmeas, maior intensidade de seleção, rápida difusão de estoques genéticos melhoradores e possibilidade de armazenar e transportar zigotos à longa distância (AZEVEDO; CHOW; COELHO, 1987). Entretanto, há grande variabilidade com relação à resposta superovulatória, principalmente em animais zebuínos (MOLINA; SATURNINO, 1993), sendo, portanto, fator limitante do melhoramento genético.

A presença do folículo dominante, no início do tratamento com gonadotrofina, parece afetar a magnitude da resposta superovulatória subsequente, diminuindo o recrutamento folicular por meio de fatores inibitórios, como a inibina produzida pelo folículo (WOLFSDORF; DIAZ; SCHMITT, 1997). Segundo Grasso, Guilbault e Roy (1989), a superovulação de vacas cujo folículo dominante foi ablado resultou em maior número de corpos lúteos, ovócitos, embriões e embriões transferíveis, comparada a vacas sem ablação.

2.1 Efeitos fisiológicos da Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG)

O eCG é uma glicoproteína produzida pelos cálices endometriais e se comprova biologicamente ativa entre os dias 35 e 140 da gestação da égua. O eCG permite que se consiga uma resposta superovulatória com apenas 1 dose entre os dias 8 e 12 do ciclo estral. No entanto, sua permanência prolongada no sangue provoca crescimento folicular disperso, com altas concentrações de estrógeno, que afeta tanto a taxa de fertilização quanto a qualidade embrionária. O eCG também induz resposta imunológica, com produção de anticorpos anti-

eCG, o que determina para tratamentos superovulatórios subsequentes, aumentos na dose para que se obtenha o mesmo efeito (BINDON; PIPER, 1977). Estes autores utilizaram soro anti-eCG para eliminar os efeitos da eCG na produção de anticorpos. O momento mais apropriado para administrar este soro é logo após o pico pré-ovulatório de LH. Na prática, é administrado no momento da 1ª inseminação artificial. Em geral, o soro anti-eCG melhora os resultados da superovulação, embora existam registros de trabalhos, nos quais o soro não exerceu efeito benéfico. Outros estudos demonstram que a neutralização do eCG, poucas horas após o pico de LH, sincroniza a maturação folicular e sincroniza mais precisamente o intervalo de ocorrência das ovulações múltiplas.

Pode-se então concluir que, a eCG quando aplicada em fêmeas bovinas, induz o aumento da produção de progesterona além de proporcionar maior porcentagem de fêmeas com características reprodutivas desejadas para a transferência de embriões. Este fato é notado na tendência de melhores taxas de prenhez nos grupos tratados com eCG, o que está de acordo com a melhora nas concentrações de progesterona e nas características reprodutivas desejáveis. Portanto, a eCG pode ser utilizada, não só na indução da ovulação, como também na melhoria das características reprodutivas das receptoras, possibilitando assim, a redução na relação doadora /receptora (BO et al., 2002).

2.2 Efeitos fisiológicos da Somatotropina Recombinante Bovina (rbST)

A somatotropina é um hormônio protéico produzido na hipófise. Desde o início do século, foi demonstrado que o crescimento animal poderia ser estimulado pela administração da somatotropina (CROOKER et al., 2004). O hormônio do crescimento em bovinos foi um dos primeiros fatores de crescimento produzidos como proteína recombinante em grande escala (LUCY,

2001; BAUMAN, 1992), sendo originalmente utilizado para aumentar a produção de leite. Além disso, ele está envolvido no crescimento animal (GLUCKMAN; BREIER; DAVIS, 1987) e na regulação de processos fisiológicos e metabólicos. Seu mecanismo de ação depende da ligação aos receptores teciduais, estimulando a síntese de IGF-I e de proteínas transportadoras (IGFBP), que são os mediadores hormonais nos processos metabólicos (LUCY, 2001).

Na literatura foi demonstrada a ação do rbST nos ovários (TANNER; HAUSER, 1989), estimulando a síntese de IGF-I e controlando especialmente a função do corpo lúteo (LUCY et al., 1993a) e das células da granulosa (LOBIE et al., 1990).

O crescimento e o desenvolvimento folicular são maiores em vacas e novilhas tratadas com somatotropina (WEBB; GONG; BRAMLEY, 1994). O rbST aumenta o número de folículos recrutados com diâmetro entre 2 e 5 mm (HWANG; LEE; LEE, 1997; PAVLOK et al., 1996), mas não interfere no número de folículos maiores (LUCY et al., 1993b).

O mecanismo pelo qual o rbST aumenta o crescimento folicular envolve ação direta (apesar de poucos receptores foliculares) ou indireta (liberação hepática de IGF-I), elevando as concentrações intra-foliculares de IGF-I (GONG; BRAMLEY; WEBB, 1991). Essa elevação estimula a proliferação e a esteroidogênese nas células da granulosa (GONG et al., 1994) e estimula a atividade da aromatase (ADASHI et al., 1985a, b), além de prevenir ou retardar o processo de atresia folicular (MONDSCHHEIN et al., 1989).

2.3 Efeitos fisiológicos do GnRH

O hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) é um peptídeo chave que controla a secreção de gonadotrofinas, principalmente de LH e, portanto, a função gonadal. Esse hormônio hipotalâmico é liberado de modo pulsátil e, na fêmea, a sua frequência e amplitude variam durante os estágios reprodutivos nas diferentes espécies. Há ainda alguma dúvida sobre se o GnRH controla LH e FSH igualmente, porque a síntese e liberação de LH são muito mais sensíveis ao GnRH do que a síntese e liberação de FSH (SANTOS et al., 2002; SWENSON; REECE, 1996; VALLE, 1991).

Em protocolos de sincronização de estro o GnRH é utilizado para iniciar uma nova onda de crescimento folicular e, principalmente, promover a ovulação do folículo dominante próximo a IA. Quando administrado em estádios aleatórios do ciclo estral, o GnRH causa a ovulação de folículos dominantes com mais de 9 mm ou a sua atresia, e induz a emergência de nova onda de crescimento folicular dentro de 2 a 3 dias em vacas e de um a dois dias em novilhas após o tratamento (BRAGANÇA, 2007). No entanto, associações hormonais que utilizam GnRH e prostaglandina, quando empregadas em animais que estão ciclando, resultam em percentagem de prenhez superior à de fêmeas em anestro e novilhas. Estudos revelam que 85% de vacas respondem a primeira injeção de GnRH e unicamente 54% das novilhas. O emprego do GnRH nem sempre resulta em ovulação do folículo pré-ovulatório e, conseqüentemente, na emergência em nova onda de crescimento folicular. Este fato se traduz em índices de prenhez para novilhas que não superam os 20% (BRAGANÇA, 2007).

2.4 Principais etapas da produção *in vitro* de embriões

Serão abordados em seguida, os passos envolvidos na preparação da doadora e da receptora, na coleta de ovócitos através da aspiração folicular, lavagem e na seleção, maturação, fecundação dos ovócitos, além do cultivo dos embriões *in vitro*.

2.4.1 Preparação da doadora e da receptora

Os principais critérios a serem observados na preparação das doadoras e receptoras são: ausência de anomalias no trato genital; boa fertilidade e ciclos regulares; boa condição corporal e ausência de doenças, segundo Fernandes, Varago e Lagares (2008).

2.4.2 Coleta de ovócitos através da aspiração folicular

Segundo Lehmkuhl et al. (2002), o procedimento de coleta de ovócitos através da aspiração folicular, normalmente é realizado utilizando-se equipamento de ultrassonografia, sonda transvaginal, bomba a vácuo com pressão regulada em 45 mmHg, sistema de agulhas (Figura1) e cânulas e tubos falcon de 50 mL, com o meio de lavagem aquecido.



Figura 1 Alíquota com 5 mL de meio de aspiração folicular em tubo Falcon de 50 mL.

2.4.3 Lavagem e seleção dos ovócitos

Segundo Seneda, Esper e Garcia (2001), os ovócitos lavados e selecionados são transferidos para o filtro de colheita de embriões e lavados com, 1L de soro fisiológico, 10 mL em 1L de soro fetal bovino e 1mL em 1L de antibiótico, esta solução é mantida a 35⁰C em banho-maria. O sedimento restante no filtro é observado em placas de *Petri* e efetuada a busca e contagem dos oócitos e posterior classificação qualitativa.

Os oócitos são classificados de acordo com sua morfologia (número de camadas de células do *cumulus* e aspecto do citoplasma) em graus I, II e III, oócitos sem *cumulus*, expandidos, degenerados e atresicos e os viáveis classificados como de grau I, II e III (Figura 2), segundo Fair, Hyttel e Greve (1995).

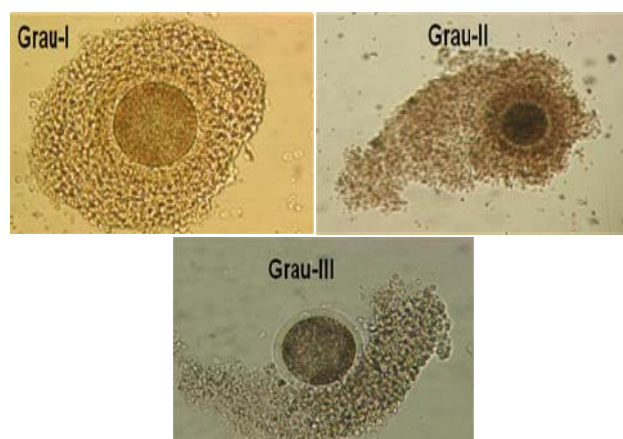


Figura 2 Ovócitos viáveis para aspiração, grau-I, grau-II e grau-III.

2.4.4 Maturação *in vitro* (MIV)

A maturação *in vitro* (MIV) dos oócitos é realizada em estufa de cultivo celular e no mínimo duas horas antes da aspiração folicular são preparados tubos de micro centrifugação (1,5 mL) com meio de maturação, segundo Sirard, Picard e Dery (2006). Visando a estabilização, estes são colocados 24 horas em estufa de cultivo embrionário com umidade saturada, temperatura estável em 39°C e atmosfera com 5% de CO₂. Para o sucesso da MIV, os oócitos devem ser submetidos à maturação nuclear e citoplasmática *in vitro*, segundo De Roover et al. (2005).

2.4.5 Fecundação *in vitro* (FIV)

Segundo Coelho et al. (2000), para a fecundação *in vitro* (FIV), os oócitos maturados são lavados três vezes em meio de fecundação (LAV) e transferidos para microgotas de meio de fecundação. O sêmen congelado é

separado em Gradiente de Percoll 90% e 45% e submetido a uma força de centrifugação de 900g durante 30 minutos. O sedimento é avaliado quanto ao volume, concentração e motilidade espermática. Posteriormente, são incubados em temperatura de 39°C por 18 a 20 horas, com atmosfera de 5% de CO₂.

2.4.6 Cultivo *in vitro* (CIV)

No cultivo *in vitro* (CIV), os zigotos são lavados por três vezes em meio SOF e as estruturas transferidas para microgotas de meio de cultivo, recobertas por óleo mineral, permanecendo nestas por um período de 6 a 8 dias até os zigotos atingirem os estádios de mórula e blastocisto. O meio de cultivo é renovado em cada microgota no terceiro e quinto dia (*feeding*) e no 6º e 7º dias foi observado o desenvolvimento embrionário, segundo Gonçalves et al. (2002).

REFERÊNCIAS

- ADASHI, E. Y. et al. Somatomedin C enhances induction of luteinizing hormone receptors by follicle-stimulating hormone in cultured granulosa cells. **Endocrinology**, Baltimore, v. 116, p. 2369-2375, May 1985a.
- ADASHI, E. Y. et al. Somatomedin C-mediated potentiation of follicle-stimulating hormone-induced aromatase activity of cultured rat granulosa cells. **Endocrinology**, Baltimore, v. 117, p. 2313-2320, May 1985b.
- AZEVEDO, N. A.; CHOW, L. A.; COELHO, E. N. Transferência embriões em bovinos. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 13, n. 148, p. 17-22, out. 1987.
- BAUMAN, D. E. Bovine somatotropin: review of an emerging animal technology. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 75, p. 3432-3451, June 1992.
- BINDON, B.; PIPER, L. Induction of ovulation in sheep and cattle by injection of PMSG and ovine anti-PMSG immune serum. **Theriogenology**, Stoneham, v. 4, p. 171-178, July 1977.
- BO, G. A. et al. The control of follicular wave development for self-pointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, Stoneham, v. 57, p. 53-72, Nov. 2002.
- BRAGANÇA, J. F. M. **Estratégias hormonais de indução/sincronização de estro em novilhas de corte entre 12 e 14 meses de idade**. 2007. 68 p. Tese (Doutorado em Reprodução de Ruminantes)–Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007. Disponível em: <http://coralx.ufsm.br/ppgm/v/jose_francisco_manta.pdf>. Acesso em: 20 nov. 2009.
- COELHO, L. A. et al. Fecundação in vitro de ovócitos bovinos com sêmen submetido a diferentes diluidores. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 29, n. 2, p. 397-402, 2000.

CROOKER, B. A. et al. **Dairy research and bovine somatotropin**. 2004.

Disponível em:

<<http://www.extension.umn.edu/distribution/livestocksystems/DI6337.html>>.

Acesso em: 06 dez. 2009.

DE ROOVER, R. et al. Ovum pick up and in vitro embryo production in cows superstimulated with an individually adapted superstimulation protocol. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 86, p. 13-25, May 2005.

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

FERNANDES, L. M.; VARAGO, F. C.; LAGARES, M. A. Bovine in vitro embryo production state of art and perspective of a constant evolution technique. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 32, n. 2, p. 100-109, 2008.

GIBBONS, J. R.; WILTBANK, M. C.; GINTHER, O. J. Functional interrelationships between follicles greater than 4 mm and the follicle-stimulating hormone surge in heifers. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 57, p. 1066-1073, Oct. 1997.

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

GONÇALVES, P. B. D. et al. Produção *in vitro* de embriões. In: GONÇALVES, P. B. D. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, 2002. cap. 10, p. 195-226.

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**, Champaign, v. 45, p. 941-949, Sept. 1991.

GONG, J. G. et al. Effects of recombinant bovine somatotropin, insulin-like growth factor-I and insulin on bovine granulosa cell steroidogenesis *in vitro*. **The Journal of Endocrinology**, Bristol, v. 143, p. 157-164, June 1994.

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

GRASSO, F.; GUILBAULT, L. A.; ROY, G. L. The influence of the presence of a dominant follicle at the time of initiation of a superovulatory treatment on superovulatory responses in cattle. **Theriogenology**, Stoneham, v. 31, n. 1, p. 199, July 1989. Abstract.

HWANG, W. S.; LEE, K. N.; LEE, B. C. Effect of bST co-treatment with FSH or PMSG on transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval in calves. **Theriogenology**, Stoneham, v. 47, n. 1, p. 159, Aug. 1997. Abstract.

LEHMKULTL, R. C. et al. Viabilidade de oócitos bovinos mantidos em líquido folicular. **Arquivos de Veterinária**, Jaboticabal, v. 18, n. 3, p. 273-279, 2002.

LOBIE, P. E. et al. Cellular localization of the growth hormone receptor/binding protein in the male and female reproductive systems. **Endocrinology**, Baltimore, v. 126, p. 2214-2221, Jan. 1990.

LONERGAN, P. et al. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and development competence following maturation, fertilization and culture *in vitro*. **Reproduction and Development**, Oxford, v. 37, p. 48-53, Mar. 1994.

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

LUCY, M. C. et al. Immunohistochemical and nucleic acid analysis of somatotropin receptor populations in the bovine ovary. **Biology of Reproduction**, Champaign v. 48, p. 1219-1227, Apr. 1993a.

LUCY, M. C. et al. Ovarian follicular populations in lactating dairy cows treated with recombinant bovine somatotropin (Sometribove) or saline and fed diets differing in fat content and energy. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, n. 4, p. 1014-1027, June 1993b.

LUCY, M. C. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, p. 1277-1293, Aug. 2001.

MOLINA, L. R.; SATURNINO, H. M. Resposta superovulatória de vacas Nelore tratadas com 25mg de FSH-P. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 17, n. 3/4, p. 81-88, maio 1993.

MONDSCHHEIN, J. S. et al. Insulin-like growth factor (IGFs) as autocrine/paracrine regulators of granulosa cell differentiation and growth: studies with a neutralizing monoclonal antibody to IGF-I. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 40, p. 79-85, Dec. 1989.

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

RODRIGUES, J. L. Transferência de embriões bovinos: histórico e perspectivas atuais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 25, n. 2, p. 102-107, jan. 2001.

SANTOS, R. A. et al. Efeito de diferentes doses de somatotropina bovina (rbST) na produção e composição do leite. **Ciências Agrotécnicas**, São Paulo, v. 25, n. 6, p. 1435-1445, out. 2002.

SENEDA, M. M.; ESPER, C. R.; GARCIA, J. M. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 67, p. 37-43, July 2001.

SIRARD, M. A.; PICARD, L.; DERY, M. The time interval between FSH administration and ovarian aspiration influences the developmental of cattle oocyte. **Theriogenology**, Stoneham, v. 51, p. 699-708, Jan. 2006.

SWENSON, M. J.; REECE, W. O. DUKE: fisiologia dos animais domésticos. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 946 p.

TANNER, J. W.; HAUSER, S. D. Molecular evidence for the presence of the somatotropin receptor in the bovine ovary. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 67, p. 413, May 1989. Suppl 1. Abst. 1001.

THIBIER, M. The IETS statistics of embryo transfers in livestock in the world for the year 1999: a new record for bovine in vivo-derived embryos transferred. **Embryo Transfer Newsletter**, Savoy, v. 18, p. 24-28, Sept. 2000.

THOMPSON, J. G.; DUGANZICH, D. Analysis of culture systems for bovine in vitro embryo production reported in abstract of the Proceedings of the International Embryo Transfer Society (1991-1995). **Theriogenology**, Stoneham, v.45, p. 195, Feb. 1996.

VALLE, E. R. **O ciclo estral de bovinos e métodos de controle**. Campo Grande: EMBRAPA CNPGC, 1991. Disponível em:
<<http://www.cnpqc.embrapa.br/publicacoes/doc/doc48/index.html>>. Acesso em: 20 nov. 2009.

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

WOLFSDORF, K. E.; DIAZ, T.; SCHMITT, E. J. P. The dominant follicle exerts an interovarian inhibition on FSH induced follicular development. **Theriogenology**, Stoneham, v. 48, p. 435-447, Aug. 1997.

SEGUNDA PARTE - ARTIGO

ARTIGO 1 AN ASSOCIATION OF RECOMBINANT BOVINE SOMATOTROPIN (rbST) PLUS EQUINE CHORIONIC GONADOTROPIN (eCG) AND NUMBER OF ASPIRATED ANTRAL FOLLICLES IN HOLSTEIN (HOL) AND TABAPUÃ (TAB) HEIFERS

(USO DA SOMATOTROPINA RECOMBINANTE BOVINA (rbST) EM ASSOCIAÇÃO COM A GONADOTROFINA CORIÔNICA EQUINA (eCG) NO NÚMERO DE FOLÍCULOS ANTRAIS ASPIRADOS EM NOVILHAS HOLANDESAS (HOL) E TABAPUÃ (TAB))

ARTIGO SUBMETIDO A REVISTA CIENCIA E AGROTECNOLOGIA SOB PROTOCOLO CAGRO 368 AGUARDANDO APROVAÇÃO

Hévea de Moraes¹
Renata Spuri¹
Tarcísio de Moraes Gonçalves¹
Rafaela Rodrigues de Carvalho¹
Renato Campos Andrade¹
José Camisão de Souza¹

¹ Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, C. postal 3037, CEP 37200-000, Lavras (MG), Brasil

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate whether the use of rbST in combination with a low dose of eCG prior to follicular aspiration provides a significant improvement in the quantity and quality of oocytes retrieved in cycling nulliparous Tabapuã (TAB) and Holstein (HOL) heifers. The study was conducted in a change-over design. In the first phase, HOL (12) and TAB (18) heifers were blocked according to their antral follicular populations (average of two previous counts) and allocated equally (high and low counts) to one of two treatments, after ablation of the dominant follicle two days before (D-2) the treatment onset: **Group 1** (HOL, n = 6 and TAB, n = 8) a single injection of 500 mg of rbST (Boostin[®], Intervet, SP) on the first day (D0) and 500 IU of eCG (Novormon[®], Intervet, Brazil) on D2. **Group 2 or control** (HOL, n = 6 and TAB, n = 8) only vehicle. All heifers were aspirated on D4 for a total of 55 ovum pick up sessions, considering one parcel loss at the second phase. This protocol was repeated 20 days after the ovum pick up, alternating animals in the treatments. Ultra-sonography was performed every other day, from D-2 to D4, and images recorded in order to count the number of subordinate follicles and measure the diameters of the dominant and subdominant follicles. The oocytes were retrieved and classified according to the International Embryo Transfer Society (IETS) standards. Later oocytes were matured, fertilized and placed in culture for 7 days on a routine IVF regimen (VITROGEN[®], Cravinhos, SP, Brasil). Data relative to the effects of treatment and breed on the number of aspirated follicles, oocyte number and quality, proportions of oocytes fertilized and completing each developmental stage were analyzed by a generalized linear model procedure (GENMOD, SAS[®], Cary, NC, USA), with the poisson and binomial (for proportions) options. The combined hormonal stimulation with rbST and eCG, prior to OPU, increased ($P < 0.01$) the number of antral follicles (2-8mm) in Tabapuã (from 29.9 ± 2.6 to 41.4 ± 2.6), but not in Holstein heifers (from 14.4 ± 2.6 to 15.5 ± 2.6). It is clear that Tabapuãs (35.6 ± 1.8) has a higher mean antral follicle population than Holsteins (15.0 ± 2.1) ($P < 0.0001$). The number of viable structures was not increased by the treatment neither in Holstein (from 4.7 ± 1.0 to 5.2 ± 1.1) nor in Tabapuã heifers (from 1.3 ± 1.9 to 2.0 ± 1.6). There was a greater percentage (33 vs 27%) of heifers with more than five viable oocytes in the treated group. The average embryos reaching the blastocyst stage was not affected by treatment (1.75 vs. 1.00 in treated and controls, respectively). There was a higher viable structure yield per aspirated animal in response to the stimulus. Finally, these results underscore the need for additional tests, especially for the Holstein breed.

Keywords: Ovum pick up. Oocyte. Embryo. Ovary.

RESUMO

O objetivo do presente experimento foi investigar se, em novilhas nulíparas Tabapuã (TAB) e Holandesas (HOL) ciclando, se o uso de rbST em associação com baixas doses de eCG, previamente à aspiração folicular, promove melhora significativa na quantidade e na qualidade dos ovócitos recuperados. O estudo foi conduzido em esquema *change over*. Na primeira fase, novilhas HOL (12) e TAB (16) foram bloqueadas segundo sua população folicular antral (média de duas contagens prévias) e distribuídas igualmente (contagem alta e baixa) para um de dois tratamentos, após ablação do folículo dominante, dois dias antes (D-2) do início dos protocolos: **Grupo 1 ou Estimulado** (HOL, n=6 e TAB, n=8): injeção única de 500 mg de rbST (Boostin[®], Intervet, SP) no primeiro dia (D0) e 500 UI de eCG (Folligon[®], Intervet, SP) no D2. **Grupo 2 ou Controle** (HOL, n=6 e TAB, n=8)- somente veículo. Todas as novilhas foram aspiradas no D4, totalizando 55 aspirações nas duas etapas, sendo que, na segunda etapa uma parcela foi perdida. Os protocolos foram repetidos 20 dias após a primeira aspiração, alternando-se os animais nos tratamentos. A ultrassonografia foi realizada a cada dois dias, a partir do D-2 até o D4, e as imagens gravadas para contagem dos folículos subordinados e mensuração dos diâmetros dos folículos dominantes e subdominantes. Os ovócitos foram rastreados e classificados segundo as normas e padrões da International Embryo Transfer Society (IETS). Posteriormente, foram fertilizados e colocados em cultura durante 7 dias em um esquema de rotina de PIV (VITROGEN[®], Cravinhos, SP, Brasil). Os dados relativos aos efeitos do tratamento e da raça sobre o número de folículos aspirados, número e qualidade dos ovócitos, proporções de ovócitos: fertilizados e completando cada estágio de desenvolvimento em cultura foram analisados por meio do procedimento de modelos lineares generalizados (GENMOD- SAS[®], Cary, NC, EUA) com a opção de distribuições de Poisson e binomial (no caso de proporções). O estímulo hormonal com rbST e eCG combinados, prévio à aspiração folicular, aumentou ($P<0,01$) o número de folículos antrais (2-8mm) na raça Tabapuã (de $29,9\pm 2,6$ para $41,4\pm 2,6$), mas não na raça Holandesa (de $14,4\pm 2,6$ para $15,5\pm 2,6$). Ficou claro que a raça Tabapuã ($35,6\pm 1,8$) tem população folicular média mais elevada do que a Holandesa ($15,0\pm 2,1$) ($P<0,0001$). O número de estruturas viáveis não foi aumentado pelo tratamento ($P>0,05$) tanto em Tabapuãs (de $4,7\pm 1,0$ para $5,2\pm 1,1$) quanto nas Holandesas (de $1,3\pm 1,9$ para $2,0\pm 1,6$). Houve maior percentual (33 vs. 27%) de novilhas com mais de 5 ovócitos viáveis no grupo tratado. A média de embriões atingindo o estágio de blastocisto não foi influenciada pelo tratamento (1,75 vs. 1,00 para estimulado e controle, respectivamente). Conclui-se que o aumento do número de folículos ovarianos obtidos pelo estímulo hormonal foi dependente da composição

genética e não teve reflexo na quantidade e no desenvolvimento dos ovócitos, nas condições do presente experimento. No entanto, houve maior rendimento de viáveis por animal aspirado em função do estímulo. Finalmente, estes resultados apontam para a necessidade de testes adicionais, especialmente para a raça Holandesa.

Palavras-Chave: Aspiração folicular. Oócito. Embrião. Ovário.

1 INTRODUCTION

Oocyte yields obtained after bovine ovum pick up (OPU) and OPU-derived embryo yield after *in vitro* culture (IVC) are low, especially relative to the antral follicle population available at the time of aspiration (BLONDIN et al., 2002; CHAUBAL et al., 2007). The follicular origin is vital to supply an adequate micro-environment for full oocyte developmental competence (IRELAND et al., 2007).

Equine chorionic gonadotrophin, with its FSH-like action and growth hormone, with its effect on IGF-I (MOREIRA et al., 2002), are important regulators of antral follicle development and their actions are related to oocyte viability (CUSHMAN et al., 2001; MURUGAVEL et al., 2009). In prior research (CUSHMAN et al., 1999; SA FILHO; VASCONCELOS; VILELA, 2009; SENDAG et al., 2008) the individual potential of rbST and eCG on improving the number and quality of follicles and oocytes has been demonstrated in cattle. The number of follicles (CUSHMAN et al., 2001) and the quality of oocytes and follicles (SA FILHO; VASCONCELOS; VILELA, 2009) were increased with exogenous rbST and FSH treatments, respectively.

According to Sa Filho, Vasconcelos and Vilela (2009), the use of FSH did not alter the number of follicles and or oocytes, but oocyte quality expressed as their proportion attaining the blastocyst stage was greater compared to untreated controls. Sendag et al. (2008) concluded that FSH was superior to eCG in terms of OPU oocyte yield, but they did not use rbST in any combination with either hormone. Furthermore, to obtain the best results with FSH, repeated injections are necessary and may demand extra labor and are costly compared to eCG (CHAUBAL et al., 2007). However, in studies conducted by Blondin et al. (2002) and Baruselli et al. (2009) it was shown that increases on oocyte yield

after follicle growth stimulation protocols may adversely affect *in vitro* oocyte developmental competence. As far as Zebu cattle is concerned, there are limited reports, but, it is clear that noticeable differences exist in constitutive and stimulated follicular dynamics and oocyte yields (BARUSELLI et al., 2009; CARVALHO et al., 2008; ROSSI, 2008).

In the literature there were no reports investigating the possible synergistic effects in heifers between eCG and rbST and much less considering the distinct antral follicle populations (BLONDIN et al., 2002) before treatment allocation. Finally, Holstein produce usually less OPU derived-oocytes relative to Zebu cows, which is also true for embryo production either after superovulation (SALES et al., 2008) or OPU-derived cultured oocytes (MERTON et al., 2009). The objective was to investigate the effects of eCG and rbST combined on follicle growth and oocyte yield after OPU in Tabapuã and Holstein heifers.

2 MATERIAL AND METHODS

Location:

The trial was held at Fazenda Palmital (FAEPE-Research unit) in Ijaci-MG and at the UFLA bovine unit, between December of 2009 and January of 2010.

Animals:

Twenty eight nulliparous heifers; twenty four month Holsteins (n=12), weighing 376.5 ± 5.5 kg and thirty six month Tabapuãs (n=16, a polled zebu breed), weighing 478 ± 21.9 kg, were used in this study. The Holstein heifers were kept on two tifton paddocks with *ad libitum* water and mineral mix and supplemented with corn silage and 1.0 kg of concentrate. The Tabapuã heifers were kept on a common Brachiaria pasture, with *ad libitum* water and mineral mix.

Experiment:

Follicular population blocks: one week prior to the initiation of treatments heifers were scanned by ultra-sonography and the antral follicle population counted. Heifers were classified according to their follicle numbers into low, average and high counts and allocated randomly to one of two treatment groups. This was done to avoid effects of follicular counts and experimental period.

Dominant follicle ablation: two days before (D-2) treatment onset heifers were scanned and dominant follicles were aspirated by guided ultrasonography with a 5.0 MHz linear probe (Aloka SD 500, Berger- SP) adapted to an ovum pick up- vaginal rod (Watanabe, Cravinhos SP) and a vacuum pressure of 45 mm Hg.

Antral follicle count: Follicle counts were performed by ultrasonography with the same equipment used for the dominant follicle ablation. The number of subordinate follicles (2-8mm in diameter) and the diameters of the dominant and co-dominant follicles was recorded on D-2, D0, D2 e D4. Images were digitally recorded and the image software Pro-Plus 4.5[®] (Media Cybernetics, MD- USA) used for all measurements. Antral follicle counts from D4 were used to compare treatments, breed, experimental period and interaction effects statistically.

Treatments: treatments were imposed on a *change-over* scheme, in two periods, and animals were randomly allocated to one of two treatments (period one): **Group 1 or Stimulated** (HOL n=6 and TAB n=8)- a single injection of 500 mg of rbST (Boostin[®], Intervet, SP) on the first day (D0) and 500 IU of eCG (Folligon[®], Intervet, SP) on D2. **Group 2 or Control** (HOL, n=6 and TAB, n=8)- heifers received vehicle only. All OPU were performed on D4. This protocol was repeated (period 2) 20 days after the first OPU alternating animals in the two treatments (Figure 3). In period 2, one Tabapuã heifer allocated to the Control group was injured and had to be removed from the trial. The number of OPU was reduced to 15, in this group as a consequence.

OPU and Oocyte Culture:

The OPU sessions were carried out with the methodology described by De Hoover et al. (2005). Oocytes were classified under stereomicroscopy according to Oropeza et al. (2004); in short:

Category I- oocytes with at least three *cumulus* cell layers, compacted and with a homogeneous cytoplasm;

Category II- oocytes with less than three *cumulus* layers, cytoplasm generally homogenous;

Category III- oocytes with a single *cumulus* layer, irregular cytoplasm aspect with dark areas;

Category IV- completely denuded oocytes;

Category V- expanded *cumulus* oocytes

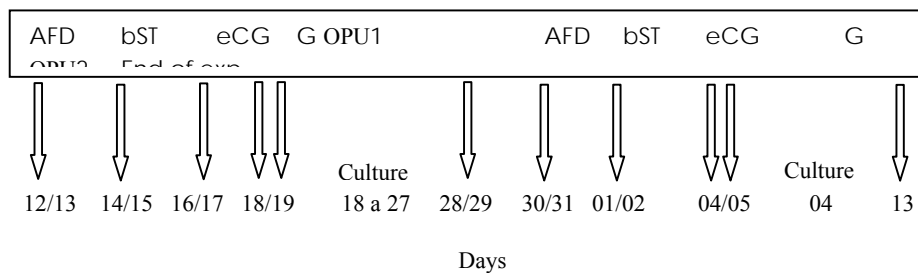
Oocytes were submitted to maturation, fertilization and culture, according to a well established commercial methodology (VITROGEN[®], Cravinhos, SP- Brazil). The semen used was from a single bull of proven *in vitro* fertility.

Statistical Analysis:

All data were analyzed using the Statistical Analysis System pack (SAS[®], Cary, NC, USA). Data relative to the effects of treatment, period, breed and interactions upon antral follicle and oocyte numbers, proportions of fertilized oocytes, oocytes reaching the blastocyst stage were analyzed via the GENMOD procedure. The Poisson and binomial (in the case of proportions) were used. Means were compared by orthogonal contrasts and expressed as least square means and mean square errors. The level of statistical significance was held at $P < 0.05$.

Phase 1 (December)

Phase 2 (December and January)



AFD= Aspiração do folículo dominante
bST= 500 mg de bST (2ml/animal)
eCG= 500UI de eCG (2,5ml/animal)
AFD= Aspiration of the dominant follicle
bST= 500 mg of bST
eCG= 500UI of eCG
G= Buserelin Acetate or GnRH
OPU1= Follicular aspiration
OPU 2= Second follicular aspiration

Figure 3 Experimental Protocol

3 RESULTS AND DISCUSSION

There was no interaction effect between experimental period and any other dependent variable, thus, data illustrated here did not include period for clarity.

The combined rbST and eCG hormonal stimulus, prior to follicular aspiration increased ($P < 0.04$) the number of antral follicles (2-8mm) in the Tabapuã breed, but not in the Holstein breed (table 1).

This result characterizes, then, an interactive effect between breed and treatment upon average antral follicle count on the day of OPU or D4. This interaction indicates that Holstein heifers may have already higher endogenous growth hormone concentrations and therefore would not respond equally. Selection for milk production indeed has increased circulating rbST in high producing dairy cattle (LEFCOURT et al., 1995). Perhaps the rbST dosage should be increased for Holsteins to respond in the same pattern as the Tabapuã heifers did.

Table 1 Recombinant bovine somatotropin (rbST) and equine chorionic gonadotropin (eCG) combined stimulus on antral follicle count in Tabapuã and Holstein heifers. Values are least square means and MSE.

Treatment*	Breed				Mean		Probability (P=)		
	Tabapuã	N	Holstein	N	Treat. ¹	N	Treat	Breed	T*B ²
rbST/eCG	41.4±2.6 ^a	16	15.5±2.6 ^c	12	28.4±1.9	28	0.001	0.0001	0.04
Control	29.9±2.6 ^b	15 ^{**}	14.4±2.6 ^c	12	22.1±2.0	27			
Breed Mean	35.6±1.8	31	15.0±2.1	24		55			

^{a, b, c} Distinct superscripts indicate statistical differences (P<0.05).

¹ Treat. = treatment.

² T*B= interaction between treatment and breed.

*Treatments were 500 mg of rbST (D0), followed by 500 IU of eCG on D2 and OPU on D4. Data from two periods of a change-over scheme were combined, since period (1 and 2) did not affect follicle means.

**one heifer was lost in the second period- severe lameness.

Oocyte numbers were not influenced (P>0.5) by treatment (table 2). Even in a stratified data analysis, with one class yielding equal to or greater than four viable oocytes (n=15) in contrast to another with one or zero viable oocytes (n=17), no effect of treatment (P=0.46) was shown. In this case, 52.9% (9 of 17) of the stimulated group heifers produced four or more viable oocytes, compared to 40.0% (6 of 15) in the control group. The number of viable oocytes was greater (P<0.0001) for the Tabapuã breed. In relation to the total oocytes produced, independently of quality, the same pattern was observed, where in the stimulated group (3.0±1.1) there was no increase (P=0.05) compared to controls (3.6±1.1), but for the Tabapuã heifers (4.9±0.8) this total average was higher (P<0.0001) compared to the Holsteins (1.6±1.3). Higher oocyte production was also found by Pontes et al. (2010) comparing Holstein and Gir cows.

Table 2 Effect of rbST and eCG combined stimulus on the mean number of viable oocytes. Values are least square means and MSE.

Breed	Treatment*				N	Breed Mean	Probability		
	N	Stimulated	N	Control			Treat.	Breed	T*B
Tabapuã	16	4.7±1.0	15**	5.2±1.1	31	4.9±0.7 ^a	0.05	0.0001	0.52
Holstein	12	1.3±1.9	12	2.0±1.6	24	1.6±1.2 ^b			
Total	28	3.0±1.1	27	3.6±0.9	55	4.1±3.8			

^{a, b} Distinct superscripts within the column indicate statistical differences (P<0.05)

¹ Treat. = treatment

² T*B= interaction between treatment and breed

* Treatments were 500 mg of rbST (D0), followed by 500 IU of eCG on D2 and OPU on D4. Data from two periods of a change-over scheme were combined, since period (1 and 2) did not affect follicle means.

** one heifer was lost in the second period- severe lameness.

The average number of embryos reaching the blastocyst stage was not influenced by treatment (table 3) and was comparable to those reported in the literature (CHAUBAL et al., 2007; DODE et al., 2002).

Table 3 Mean number of in vitro developed oocytes derived from rbST and eCG-treated or untreated heifers.

Treatment	N*	Blastocyst	MSE	Probability (P=)
				Treatment
Stimulated	4	1.75	0.96	0,40
Control	3	1.00	0.00	

* Heifer number producing oocytes that reached the final day in culture on each treatment

In the present study in Tabapuã and Holstein heifers the hormonal stimulus was not intended to superovulate (low eCG dosage), with its inherent

deleterious effects on fertility (NOGUEIRA et al., 2004), but to give physiological support to follicle and oocyte development. The lower eCG dose aimed to limit anti-eCG antibody production as well as to provide a cheaper and less labor intensive option to regular FSH-protocols. The mean number of antral follicles observed was comparable to those in the literature in Tabapuã (ROSSI, 2008) and Holstein heifers (CHAUBAL et al., 2007).

The number of oocytes recovered per OPU session was highly variable (0-17) between individuals and reflected an equally variable range in antral follicle counts. This observation underscores the need to evaluate donors previously before their utilization in commercial OPU and embryo programs, as well as, in research. The reasons for this variability, which resembles those found in reported superovulatory responses (SALES et al., 2008) are not clear, but could, in part, be explained by genetics (FIHRI et al., 2005; IRELAND et al., 2007). In the present experiment, the attempt to reduce this variation by creating basal follicle population classes was an important and necessary strategy to avoid equivocal interpretations and a possible experimental phase and treatment interaction.

It is possible that the OPU sessions in this trial have been done too shortly after the rbST administration, and, to the same effect, the eCG injection could have been delayed a day or two, so that extra time would be allowed for the rbST to act. Especially for Holstein heifers, higher numbers of follicles and oocytes could have been achieved had the current strategy been changed. These changes may be tested in future trials by applying higher rbST dosages.

However, another reason for the adoption of the present interval of only two days was to avoid excessive follicle growth or maturation (PEREZ et al., 2009). Although larger follicles should be easier to visualize and aspirate than smaller ones, they do not necessarily produce more competent oocytes. In the present trial the percentage recovery of viable oocytes relative to the number of

follicles aspirated was approximately 11 and 14%, which is comparable (CHAUBAL et al., 2007), higher (FIHRI et al., 2005) or lower (VIANA et al., 2010) than what has been reported.

Larger follicles such as those produced under gonadotropin stimulation, may be mature and contain granulosa cell agglomerates and a more viscous follicular fluid (GOODHAND; WATT; STAINES, 1999). Consequently, a vacuum pressure of 45 mm Hg may not have been sufficient to aspirate the denser follicular fluid of the larger follicles. In addition, a collapsed follicular wall around the needle may have reduced flux or incarcerated the oocyte (GOODHAND; WATT; STAINES, 1999). The use of a greater diameter needle could also have improved the results, although in combination with higher pressure could damage oocytes and ovaries (MANIK; SINGLA; PALTA, 2003). Accumulation of luteal tissue may also be a consequence of advanced follicular development caused by eCG, that can interfere with the follicle: oocyte ratio in OPU (STUBBINGS; WALTON, 1995).

In the present experiment, in spite of the dominant follicle ablation, variations in the follicular wave may have occurred affecting oocyte yield directly. According to Adams, Matteri and Kastelic (1992), Fortune and Hansel (1985), Gibbons, Wilbank and Ginther (1999) and Ginther, Bergfelt and Kulick (1999), at around 24 to 36 h post ovulation, the growth of a follicle cohort may commence at variable time points affecting the number of follicles at the time of OPU. In the present protocol there was not a rigid control of the follicular wave emergence. However, there are no records in the literature similar to the present stimulus in terms of follicular wave emergence. These data, however, could be rescued from the recorded images for later analyses.

There are reports showing that gonatropin therapy decreases oocyte recovery (GOODHAND; BROADBENT; HUTCHINSON, 1996; GOODHAND; WATT; STAINES, 1999; SIRARD; PICARD; DERY, 1999).

An inverse relationship between follicle diameter and oocyte recovery rates (SENEDA; ESPER; GARCIA, 2001), confirmed in the present results, through the observation of positive correlations between the number of antral follicles and total viable oocytes ($r^2=0.32$; $P < 0.0002$) and the total number of oocytes retrieved ($r^2=0.36$; $P < 0.0001$). Additionally, the number of structures retrieved increased linearly with the number of viable structures ($r^2=0.96$, $P < 0.0002$), indicating that there was no loss of quality as a function of the amount of oocytes retrieved. This finding opens good possibilities for oocyte yield gains through hormonal stimulus on follicular development in cattle.

Thus, the use of eCG and rbST may have improved oocyte morphological quality by decreasing the population of atretic follicles (BLONDIN; COENEN; GUIBAULT, 1996; CUSHMAN et al., 1999) and increasing antral follicle rescue from pre established follicular pools. Some authors suggested that FSH-like effects synchronize the follicular development by accelerating growth and *in vivo* oocyte maturation which could benefit later embryo development *in vitro* (GIBBONS; BEAL; KRISHER, 1994). Furthermore, the use of eCG may have altered the follicular environment around the oocytes influencing their quality directly and indirectly, but not enough to differentiate between the two treatments applied (ROTH; ARAV; BRAW-TAL, 2002; NOGUEIRA et al., 2004). Follicle stimulating hormone, as well as, exogenous rbST increase IGF-I receptor density (SPICER; ALPIZAR; VERNON, 1994; CUSHMAN et al., 2001) and decrease the amount of IGF 2-binding proteins in bovine follicles (ECHTERNKAMP; HOWARD; ROBERTS, 1994). Thus, the greater follicular development and the increase on the bioavailability and activity of IGF-I induced by the eCG-FSH-like effect could be associated to the oocyte quality maintenance observed in this experiment, which followed increased oocyte numbers. Although the blastocyst stage does

not guarantee posterior *in vitro* development, it is a strong indicator of early development potential (MCEVOY; SINCLAIR; YOUNG, 2000).

The average number of embryos reaching the blastocyst stage was not influenced by treatment (table 3) and was comparable to those reported in the literature (CHAUBAL et al., 2007). Multiple injections and once a week OPU sessions have been more efficient than single injection and shorter OPU session interval schemes (GOODHAND; BROADBENT; HUTCHINSON, 1996), which differs from our results. Moreover, low cleavage rates may be the result of faulty pre-fertilization oocyte selection overall in *in vitro* culture systems (LOONEY; LINDSEY; GONSETH, 1994; USHIJIMA; AKIYAMA; TAJIMA, 2008).

Follicle stimulating hormone therapy improved pregnancy rates, according to Faber, Molina and Ohlrichs (2003), but in the present experiment it was not possible to evaluate pregnancy, since embryos were not transferred to recipients and were not in sufficient numbers for adequate statistics. In spite of the fact that, this was the first attempt to culture oocytes and embryos in our lab, some embryos successfully reached the blastocyst stage (Table 3). The effect of FSH on embryo development may be influenced by the injection scheme and OPU frequency.

4 CONCLUSIONS

A positive effect of rbST plus eCG on the antral follicular count of Tabapuã heifers was demonstrated. For Holstein heifers adjustments should be tried on the dosage, once it is possible that their endogenous concentrations of rbST are higher than in this particular zebu breed. It is reasonable, at this point, to speculate that, as a result of selection for milk production, the constitutively higher rbST concentrations in Holsteins desensitized this breed to the rbST dose used. Perhaps not enough time had been allowed for the rbST to have the same action in Holsteins comparatively to zebu heifers. Higher oocyte number was well correlated to viable oocyte number, indicating that there is potential for increasing OPU output without lowering quality. Culture results must be improved so that final blastocyst yield may benefit from the enhanced ovarian output prior to OPU. Distinct breed related responses were very clear under the present conditions. More studies should be performed in order to explain through which mechanisms these differences may be affecting OPU results.

Acknowledgments

The authors wish to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), INTERVET/SCHERING-PLOUGH, Associação Brasileira dos Criadores de Tabapuã (ABCT), FAEPE (Faculdade de Ensino, Pesquisa e Extensão) and VITROGEN for the financial and technical support.

REFERENCES

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

BARUSELLI, P. S. et al. Efeito do eCG ou Benzoato de Estradiol associado ao norgestomet na taxa de concepção de vacas de corte submetidas à IATF no pós-parto. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, Belo Horizonte, v. 46, p. 103-109, July 2009.

BLONDIN, P.; COENEN, K.; GUIBAULT, L. A. Superovulation can reduce the developmental competence of bovine embryos. **Theriogenology**, Stoneham, v. 46, p. 1191-1203, Feb. 1996.

BLONDIN, P. et al. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 66, p. 38-43, May 2002.

CARVALHO, J. B. P. et al. Effect of early luteolysis in progesterone-based AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, Stoneham, v. 69, p. 167-175, July 2008.

CHAUBAL, S. A. et al. Hormonal treatments for increasing the oocyte and embryo production in an OPU-IVP system. **Theriogenology**, Stoneham, v. 67, p. 719-728, Dec. 2007.

CUSHMAN, R. A. et al. Alteration of activation, growth, and atresia of bovine preantral follicles by long-term treatment of cows with estradiol and recombinant bovine somatotropin. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 65, p. 581-586, Mar. 2001.

CUSHMAN, R. A. et al. Superovulatory response of one ovary is related to the micro- and macroscopic population of follicles in the contralateral ovary of the cow. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 60, p. 349-354, Jan. 1999.

DE HOOVER, R. et al. Ovum pick up and in vitro embryo production in cows superstimulated with an individually adapted superstimulation protocol. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 86, p. 13-25, May 2005.

DODE, M. A. N. et al. The effect of sperm preparation and co-incubation time on in vitro fertilization of *bos indicus* oocytes. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 69, p. 15-23, Feb. 2002.

ECHTERNKAMP, S. E.; HOWARD, H. J.; ROBERTS, A. J. Relationships among concentrations of steroids, insulin-like growth factor-I and insulin-like binding proteins in ovarian follicular fluid of beef cattle. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 51, p. 971-981, Mar. 1994.

FABER, D. C.; MOLINA, J. A.; OHLRICH, C. L. Commercialization of animal biotechnology. **Theriogenology**, Stoneham, v. 59, p. 125-138, December 2003.

FIHRI, A. F. et al. Genetic and nongenetic effects on the number of ovarian follicles and oocyte yield and quality in the bovine local (Oulmes Zaer), exotic breeds and their crosses in Morocco. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 4, p. 9-13, Jan. 2005.

FORTUNE, J. E.; HANSEL, W. Concentrations of steroids and gonadotropins in follicular fluid from normal heifers primed for superovulation. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 32, p. 1069-1079, Nov. 1985.

GIBBONS, J. R.; BEAL, W. E.; KRISHER, R. L. Effect of once versus twice weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. **Theriogenology**, Stoneham, v. 42, p. 405-419, Feb. 1994.

GIBBONS, J.; WILBANK, M.; GINTHER, O. J. Relationship between follicular development and the decline in the follicle-stimulation hormone surge in heifers. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 60, p. 72-77, Jan. 1999.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; KULICK, L. J. Selection of the dominant follicle in cattle: establishment of follicle deviation in less than 8 hours through depression of FSH concentrations. **Theriogenology**, Stoneham, v. 52, p. 1079-1093, Nov. 1999.

GOODHAND, K. L.; BROADBENT, P. J.; HUTCHINSON, J. J. M. In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production in cattle pre-treated with FSH, progesterone and oestradiol. **Theriogenology**, Stoneham, v. 45, p. 355, Feb. 1996.

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

IRELAND, J. J. et al. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. **Human Reproduction**, Oxford, v. 22, p. 1687-1695, Apr. 2007.

LEFCOURT, A. M. et al. Circadian and ultradian rhythms of peripheral growth hormone concentrations in lactating dairy cows. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 12, p. 47-256, Nov. 1995.

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

MANIK, R. S.; SINGLA, S. K.; PALTA, P. Collection of oocyte through transvaginal ultrasound-guided aspiration of ovarian follicular fluid of beef cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 76, p. 155-161, Apr. 2003.

MCEVOY, T. G.; SINCLAIR, K. D.; YOUNG, L. E. Large offspring syndrome and other consequences of ruminant embryo culture in vitro. **Human Fertility**, York, v. 3, p. 238-246, July 2000.

MERTON, J. S. et al. Genetic parameters for oocyte number and embryo production within a bovine ovum pick-up-in vitro production embryo program. **Theriogenology**, Stoneham, v. 72, p. 885-893, Mar. 2009.

MOREIRA, F. et al. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on development of in vitro derived bovine embryos. **Theriogenology**, Stoneham, v. 57, p. 895-907, Nov. 2002.

MURUGAVEL, K. et al. The effect of addition of equine chorionic gonadotropin to a progesterone based estrous synchronization protocol in buffaloes (*Bubalus bubalis*) under tropical conditions. **Theriogenology**, Stoneham, v. 71, p. 1120-1126, Mar. 2009.

NOGUEIRA, M. F. et al. Do high progesterone concentrations decrease pregnancy rates in embryo recipients synchronized with PGF2 α and eCG? **Theriogenology**, Stoneham, v. 61, p. 1283-1290, Apr. 2004.

OROPEZA, A. et al. Improvement of the developmental capacity of oocytes from prepubertal cattle by intraovarian insulin-like growth factor-I application. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 70, p. 1634-1643, Nov. 2004.

PEREZ, R. F. G. et al. Strategies to improve fertility in *Bos indicus* postpubertal heifers and nonlactating cows submitted to fixed-time artificial insemination. **Theriogenology**, Stoneham, v. 72, p. 681-689, March 2009.

PONTES, J. H. F. et al. Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from *Bos Taurus*, *Bos indicus* and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. **Theriogenology**, Stoneham, v. 74, p. 1349-1355, July 2010.

ROSSI, O. D. S. **Desenvolvimento ponderal e folicular ovariano de fêmeas Tabapuã pré-púberes submetidas a diferentes dietas**. 2008. 106 p. Dissertação (Mestrado em Reprodução de Ruminantes)—Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

ROTH, Z.; ARAV, A.; BRAW-TAL, R. 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**, Champaign, v. 85, p. 1398-1405, Nov. 2002.

SA FILHO, O. G.; VASCONCELOS, J. L. M.; VILELA, E. R. Remoção temporária de bezerros em dois momentos do protocolo de sincronização da ovulação GnRH-PGF2 α -BE em vacas nelore pós-parto. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v. 61, p. 102-120, dez. 2009.

SALES, J. N. et al. Embryo production and quality of Holstein heifers and cows supplemented with β -carotene and tocopherol. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 106, p. 77-89, Apr. 2008.

SENDAG, S. et al. Effects of eCG and FSH on ovarian response, recovery rate and number and quality of oocytes obtained by ovum pick-up in Holstein cows. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 106, p. 208-214, Apr. 2008.

SENEDA, M. M.; ESPER, C. R.; GARCIA, J. M. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 67, p. 37-43, July 2001.

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

SPICER, L. J.; ALPIZAR, A.; VERNON, R. K. Insulin-like growth factor-I receptors in ovarian granulosa cells: effects of follicular size and hormones. **Molecular Cell Endocrinology**, Amsterdam, v. 102, p. 69-76, Mar. 1994.

STUBBING, R. B.; WALTON, J. S. Effects of ultrasonically guided follicle aspiration on estrous cycle and follicular dynamics in Holstein cows. **Theriogenology**, Stoneham, v. 43, p. 705-712, Apr. 1995.

VIANA et al. Ovarian follicular dynamics, follicle deviation, and oocyte yield in Gyr breed (*Bos indicus*) cows undergoing repeated ovum pick-up. **Theriogenology**, Champaign, v. 73, p. 966-972, Jan. 2010.

USHIJIMA, H.; AKIYAMA, K.; TAJIMA, T. Transition of cell numbers in bovine preimplantation embryos: *in vivo* collected and *in vitro* produced embryos. **Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v. 54, p. 239-243, Mar. 2008.