

VARIÁVEIS BIOLÓGICAS ASSOCIADAS A RECUPERAÇÃO DE COMPLEXOS CUMULUS-OÓCITO POR ASPIRAÇÃO FOLICULAR

Viana, J.H.M.¹; Bols, P.E.J.²

¹Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, 36038-330 Brasil

²University of Antwerp, Universiteitsplein 1, Gebouw U, 2610 Wilrijk, Belgium
jhmviaana@cnppl.embrapa.br

Introdução

A técnica de aspiração folicular orientada por ultra-sonografia (OPU) foi desenvolvida, na década de 80, para atender à demanda por um procedimento para coleta de complexos *cumulus*-oócito (COCs) que fosse menos traumática que as abordagens cirúrgica ou por laparoscopia até então utilizadas. A aspiração folicular orientada por ultra-som foi posteriormente adaptada para uso veterinário, sendo rapidamente reconhecida como a técnica de eleição para a recuperação de COCs (Galli et al., 2001). Dentre as reconhecidas vantagens da técnica, estão o fato de ser pouco invasiva, não depender de pré-estimulação hormonal, poder ser utilizada em qualquer fase do ciclo estral, em animais pré-púberes ou em gestação inicial. Também contornou o principal obstáculo ao uso comercial da fertilização *in vitro* (FIV), que era a recuperação de COCs em doadora vivas, sendo considerada a melhor alternativa aos programas clássicos de produção de embriões por superovulação (Bousquet et al., 1999).

A baixa eficiência dos sistemas inicialmente utilizados limitaram, nas décadas de 80 e 90, a expansão do uso comercial da aspiração folicular, que se concentrou em animais de alto valor genético mas com problemas de fertilidade adquiridos ou histórico de insucesso na superovulação (Bols et al., 1996). Nos últimos anos, contudo, este cenário vem mudando, com o uso intensivo de doadoras em reprodução e um conseqüente aumento na produção *in vitro* de embriões bovinos em todo o mundo, particularmente na América do Sul e Ásia (Thibier, 2004). Esta evolução foi surpreendente, considerando-se que as taxas de produção de blastocistos obtidas por diferentes grupos de pesquisa se mantiveram na faixa de 25 a 40%. O aumento no número e/ou qualidade dos COCs destinados à fertilização *in vitro*, entretanto, pode compensar parcialmente a baixa eficiência dos sistemas de cultivo atualmente disponíveis.

Historicamente, duas abordagens principais têm sido utilizadas para otimizar a recuperação de COCs: (1) estudo dos fatores físico/mecânicos envolvidos e conseqüentes aprimoramentos nos equipamentos utilizados para aspiração; (2) estudo e controle dos fatores relacionados ao desenvolvimento e maturação intra-ovarianos de folículos e oócitos (Bols et al., 1997). A primeira abordagem foi a mais explorada e levou ao desenvolvimento ou adaptação de uma gama de opções em sistemas de aspiração folicular. Entretanto, considerando-se os índices atualmente obtidos nas etapas de laboratório, o sucesso produção *in vitro* de embriões está diretamente relacionado ao número e qualidade dos COCs que são destinados ao cultivo.

Disponibilidade de folículos para aspiração

As características físicas dos equipamentos de ultra-sonografia (formação de imagem e resolução)

determinam que apenas folículos em fase antral, e apresentando diâmetros superiores à dois a três milímetros, possam ser identificados e, conseqüentemente, puncionados. Estes folículos representam apenas uma pequena fração do total de folículos presentes nos ovários e seu número, em um determinado momento, depende da mobilização da reserva ovariana (I), do desenvolvimento folicular nas fases iniciais e sua associação com o *status* metabólico e endócrino da doadora (II), e da dinâmica do crescimento na fase antral (III). Maximizar o número e qualidade de folículos em fase antral e, conseqüentemente, disponíveis para aspiração, é uma das principais estratégias para melhoras a recuperação de COCs destinados à FIV.

I. Reserva ovariana

Em todas as fêmeas de mamíferos, a reserva de oócitos é estabelecida durante a vida fetal, sendo gradualmente mobilizada durante a vida reprodutiva (Van der Hurk, 2005). Apesar de ser uma das características mais importantes para determinar o potencial de uma determinada fêmea como doadora, quer seja de oócitos ou embriões, não existe um procedimento prático para sua avaliação *in vivo*. Na medicina humana, são adotados testes indiretos de reserva ovariana, baseados na relação inibina/FSH circulantes, mas com precisão limitada e objetivos diferentes. Contudo, parece haver uma relação entre tamanho da reserva de folículos primordiais e a proporção de folículos que iniciam seu desenvolvimento (Hirshfield, 1994). Desta forma, o número de folículos em fase antral observado durante o ciclo estral pode refletir, pelo menos em parte, a reserva de folículos primordiais presente (Gülekli et al., 1999). Variações significativas no número de folículos em desenvolvimento nos ovários são relatadas entre indivíduos e entre raças (Boni et al., 1997), e a reserva ovariana poderia ser a chave para explicar diferenças nos resultados de TE/FIV obtidos em determinados grupamentos genéticos. Entretanto, em animais em produção esta relação pode ser obscurecida por diferentes fatores que interferem no processo de recrutamento folicular, como balanço metabólico, condição corporal, condições ambientais, etc.

II. Recrutamento folicular

Infelizmente, os fatores responsáveis pelos estádios iniciais de desenvolvimento folicular são os menos conhecidos (Fortune, 2003). As fases iniciais do crescimento folicular não dependem da estimulação pelos hormônios hipofisários, e são controladas por fatores intraovarianos. Diversos fatores com ação positiva (IGF-I, EGF, TGF α , bFGF, GDF9, BMP15, ativina, IL 1 β , NO) ou atretogênica (TNF α , folistatina, andrógenos, radicais livres, IL6) sobre o desenvolvimento e sobrevivência folicular vem sendo caracterizados (Erickson & Shimasaki, 2001). A complexidade das interações entre estes fatores, e a natureza autócrina e parácrina de sua ação torna a manipulação das fases iniciais do crescimento folicular extremamente complexa. Uma abordagem relativamente bem sucedida, neste contexto, foi o uso do BST em bovinos, objetivando o aumento do número de folículos em crescimento, efeito atribuído ao aumento na concentração intra-ovariana de IGF-1. Seu uso foi proposto como uma alternativa para maximizar os resultados da punção folicular (Buratini Jr., 2000). Entretanto, os resultados desta e de outras estratégias de manipulação indireta das fases iniciais do crescimento folicular, como a indução de balanço energético positivo, são limitadas pela reserva ovariana das doadoras, sendo freqüentemente inconsistentes.

III. Dinâmica folicular

Uma vez atingida a fase antral, os fatores associados ao controle do crescimento folicular são mais bem conhecidos e, conseqüentemente, de controle mais factível. O número de folículos em fase antral varia ao longo do ciclo estral, em função do padrão de crescimento folicular característico dos bovinos (Driancourt, 2001). Cada onda de crescimento folicular é caracterizada pela mobilização de um conjunto de folículos entre dois e quatro milímetros, diâmetro que também coincide com o estágio no qual o oócito adquire competência para sofrer maturação, meiose e manter o posterior desenvolvimento embrionário *in vitro* (Hendriksen et al, 2004). Nesta fase, o estabelecimento da dominância folicular é o principal fator afetando a qualidade do pool de folículos em desenvolvimento. O fenômeno da dominância folicular, mecanismo de determinação da taxa de ovulação espécie-específica, é baseado na inibição da liberação do FSH pela secreção de estradiol e inibina pelo folículo dominante (Crowe, 1999). Desta forma, a presença de folículos dominantes interfere tanto no número quanto na viabilidade dos folículos disponíveis para superovulação (Bungartz & Niemann, 1994) e também para aspiração folicular. A coleta de COCs no início do ciclo estral (coincidindo com a primeira onda de crescimento folicular), após a sincronização da onda de crescimento ou após a remoção mecânica do folículo dominante resultaram na recuperação de um maior número de COCs e/ou em um maior potencial de desenvolvimento *in vitro* dos mesmos (Machatková et al., 2000). A redução do intervalo entre coletas sucessivas também tem sido utilizada para minimizar os efeitos da dominância folicular (Petyim et al., 2003). Entretanto, a constante remoção dos folículos em desenvolvimento, combinada à ausência de corpos lúteos, pode levar à alterações no perfil endócrino e no padrão de crescimento folicular das doadoras (Viana et al., 2004). Uma abordagem alternativa é o aumento artificial da concentração circulante de FSH pela administração de gonadotrofinas exógenas ou pela imunização contra inibina (Blondin et al., 2002; Viana et al., 2003). Apesar de um efeito positivo no número e qualidade dos COCs recuperados, esta estratégia apresenta alguns dos inconvenientes da produção de embriões pela superovulação convencional, particularmente quanto ao intervalo necessário entre os tratamentos.

Conclusão

Grande parte do sucesso em programas de produção *in vitro* de embriões pode ser creditado ao número e qualidade dos COCs utilizados. Entretanto, os mecanismos de avaliação e manipulação do crescimento folicular ainda são restritos à fase antral. Avanços na efetiva utilização da reserva de gametas requerem um maior conhecimento dos mecanismos associados à formação e mobilização do pool de folículos primordiais.

Referências

- BLONDIN, P.; BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUNGU, H. et al. **Biology of Reproduction**, v.66, p.38-43, 2002.
- BOLS, P.E.J.; VAN SOOM, A.; VANROOSE, G. et al. **Theriogenology**, v.45, p.359, 1996.
- BOLS, P.E.J.; YSEBAERT, M.T.; VAN SOOM, A. et al. **Theriogenology**, v.47, p.1221-1236, 1997.
- BONI, R.; ROELOFSEN, M.W.M.; PIETERSE, M.C. et al. **Theriogenology**, v.48, p.277-289, 1997.

- BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUNGU, H.; MORIN, N. et al. **Theriogenology**, v.51, p.59-70, 1999.
- BUNGARTZ, L.; NIEMANN, H. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.101, p.583-591, 1994.
- BURATINI Jr, J.; PRICE, C.A.; VISITIN, J.A. et al. **Theriogenology**, v.54, p.421-431, 2000.
- CROWE, M.A. **Reproduction Domestic Animals**, v.34, n.3, p.157-166, 1999.
- DRIANCOURT, M.A. **Theriogenology**, v. 55, p. 1211-1239, 2001
- ERICKSON, G.F.; SHIMASAKI, S. **Fertility and Sterility**, v.76, p.943-949, 2001.
- FORTUNE, J.E. **Animal Reproduction Science**, v.78, p. 135-163, 2003
- GALLI, C.; CROTTI, G.; NOTARI, C. et al **Theriogenology**, v.55, p.1341-1357, 2001.
- GÜLEKLI, B.; BULBUL, Y.; ONVURAL, A. et al. **Human Reproduction**, v.14, n.11, p.2822-2826, 1999.
- HENDRIKSEN, P.J.; STEENWEG, W.N.; HARKEMA, J.C. et al. **Theriogenology**, v.61, p. 909-920, 2004
- HIRSHFIELD, A.N. **Biology of Reproduction**, v.50, p.421-428, 1994.
- MACHATKOVÁ, M.; JOKESOVÁ, E.; HORKY, F. et al. **Theriogenology**, v.54, p.543-550, 2000.
- PETYIM, S.; BAGE, R.; HALLAP, T. et al. **Theriogenology**, v.60, p. 175-188, 2003
- THIBIER, M. **IETS Newsletter**, v.22, n.4, p.12-19, 2004.
- VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. **Theriogenology**, v.63, p. 1717-1751, 2005.
- VIANA, J.H.M.; FERREIRA, A.M.; CAMARGO, L.S.A. et al. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, p.68-74, 2003.
- VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A., FERREIRA A.M. et al. **Animal Reproduction Science**, v.84, p. 1-12, 2004.

ASPIRAÇÃO DE OÓCITOS (OVUM PICK-UP), A TÉCNICA IDEAL PARA O ESTUDO DO AMBIENTE INTRA-FOLICULAR E DA QUALIDADE OOCITÁRIA EM VACAS DE LEITE DE ALTA PRODUÇÃO

J.L.M.R. Leroy¹, P.E.J.Bols², G. Opsomer¹, A. Van Soom¹, A. de Kruif¹

¹ Department of Reproduction, Obstetrics and Herd Health, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Salisburylaan 133, 9820 Merelbeke, Belgium; ²Laboratory for Veterinary Physiology, Department of Veterinary Medicine, University of Antwerp, Universiteitsplein 1, B-2610 Wilrijk, Belgium. jo.leroy@UGent.be_Tel: ++3292647548 Fax: ++3292647534

RESUMO

Vacas de leite de alta produção apresentam fertilidade diminuída. Este problema multifatorial tem sido associado aos distúrbios que podem ocorrer na sinalização do eixo hipotalâmico - hipofisário - ovariano. Apenas mais recentemente, tem se dado maior atenção à qualidade ovocitária e ao ambiente intrafolicular, sendo a técnica de aspiração de oócitos uma ferramenta ideal para o estudo desses dois fatores. Desta maneira, tem sido possível investigar o papel do oócito e de seu ambiente nas patologias relacionadas à redução da fertilidade em vacas de leite dentro de sistemas modernos. Esse papel é considerado o estado da arte nesta área de pesquisa em particular.

Palavras chave: Vacas de leite de alta produção, *ovum-pick-up*, oócitos, fluido folicular e fertilidade reduzida.

INTRODUÇÃO

O declínio da fertilidade em gado de leite de alta produção vem sendo bem documentado por inúmeros estudos no mundo todo desde muitas décadas. Esse fenômeno tem sido associado ao aumento da produção de leite (Lean et al., 1989; Royal et al., 2000; Lucy, 2001; Butler, 2003; Lopez-Gatiús, 2003; Bousquet et al., 2004; Mee et al., 2004). Um progresso genético significativo em conjunto com a melhoria do manejo nutricional tornou possível, a produtores de leite, alcançarem uma enorme produtividade leiteira. No entanto, para manter esse perfil economicamente eficiente, vacas de leite pertencentes a sistemas modernos devem conceber dentro dos primeiros três meses após o parto, sendo considerado o período de maior exigência metabólica. Logo após a parição, há um rápido aumento na produção de leite e, conseqüentemente, na perda de energia, o que é impossível de ser recuperado pela aquisição de energia suficiente através da alimentação (Rukkwamsuk et al., 1999). Especialmente vacas supercondicionadas demonstram apetite diminuído, com subseqüente aumento na mobilização de lipídeos e no grau de infiltração de triglicérides no fígado, resultando em altas concentrações de corpos cetônicos no plasma (Rukkwamsuk et al., 1999). A rápida mobilização de reservas corporais, refletidas pela perda de escore da condição corporal (até 10% do peso corpóreo na parição) pode agravar o apetite diminuído (Macmillan et al., 1998; Vernon 2002). Vacas primíparas tipicamente mostram um balanço

energético negativo(BEN) ainda maior, pois necessitam de uma energia extra para o crescimento corpóreo (Cavestany et al., 2005). Tem sido mostrado que tal estresse metabólico, adicionado a diversas disfunções endócrinas, é de difícil conciliação com uma performance reprodutiva satisfatória. Biologicamente falando, faz sentido favorecer a produção de leite acima da fertilidade, o que é denominado como priorização de nutrientes (Lucy, 2003). É melhor limitar o investimento de recursos para a sobrevivência dos atuais produtos nascidos (ex: produção de leite) do que arriscar a saúde e sobrevivência daqueles que ainda estão por serem concebidos e nascerem (ex: fertilidade) (Silvia, 2003). A falha reprodutiva é certamente um problema multifatorial no qual a quantidade de leite produzida apenas desempenha um papel pequeno quando comparado à importância do BEN, grau de condição corporal ou das doenças do pós-parto (pp) (Loeffler et al., 1999; de Vries and Veerkamp, 2000; Snijders et al., 2000; Lucy, 2001). A produção diária de leite não é um indicador apropriado do BEN, porque o consumo de alimentos e o manejo podem confundir a possível associação entre produção e balanço energético (Villa-Godoy et al., 1988; Macmillan et al., 1998; de Vries and Veerkamp, 2000; Kruip et al., 2000). As rações de alta proteína e energia, tipicamente fornecidas às vacas de alta produção leiteira, visam à manutenção da produção de leite em conjunto com o aumento do rebanho, sendo fatores associados a resultados ruins quanto à fertilidade (Butler, 1998; Lucy, 2001; Fahey et al., 2002; Lucy, 2003). Finalmente a seleção genética para alta produção de leite poderia também ser apontada como causa de fertilidade reduzida, assim como tem sido sugerido por Snijders et al. (2000, 2001). Considerando como um todo, tais pontos enfatizam a relação descompromissada existente entre a alta produção leiteira e a fertilidade. A patogenia da fertilidade diminuída é complexa e já tem sido detalhadamente estudada. O objetivo deste artigo tem como foco a importância da qualidade oocitária na capacidade gestacional, amplamente documentada. Esse oócito está crescendo e maturando no ambiente folicular. Estaria ele bem isolado de todos estes distúrbios metabólicos e endócrinos ou estaria vulnerável, realmente em perigo? As informações sobre a composição do ambiente folicular e sobre a qualidade do oócito em relação ao problema de fertilidade reduzida são muito escassas. A técnica de coleta oocitária (OPU) prova ser uma técnica adequada para encontrar respostas a todas essas questões.

CAMINHOS MÚLTIPLOS PARA A SUBFERTILIDADE

Caminhos específicos que levam aos distúrbios reprodutivos em vacas pós-parto, metabolicamente comprometidas, têm sido intensivamente investigados (revisado por Butler, 2003). Muitos dos esforços têm sido focados nas alterações dos sinais endócrinos (eixo hipotalâmico- hipofisário- ovariano) e nas disfunções ovarianas expressas nos sintomas reduzidos de estro ou anestro, formação de cistos, ovulação atrasada, intervalos prolongados entre o parto e a primeira inseminação (Harrison et al., 1990; Opsomer et al., 1998; Beam Butler, 1999; de Vries and Veerkamp, 2000; Diskin et al., 2003; Vanholder et al., 2003; Lopez et al., 2004). O parâmetro final e, de alguma forma, o de maior credibilidade é a taxa de concepção, definida como sendo a proporção de vacas denominadas prenhes após IA (inseminação artificial). Assim como tem sido revisado por Bousquet et al. (2004), a taxa de sucesso de uma IA mostrou uma diminuição dramática em quase todos os países que criam vacas de leite de alta produção. O conceito de “taxa de concepção” está intimamente relacionado ao oócito e, conseqüentemente, à

qualidade embrionária. Apenas recentemente, no entanto, alguns estudos começaram a ter o oócito como foco e, subseqüentemente a qualidade embrionária, o que pode ser um fator importante para a taxa de concepção e fertilidade (Boland et al., 2001). Oócitos e embriões são altamente sensíveis aos distúrbios nos seus ambientes devido a causas metabólicas, nutricionais e outras; desta maneira, tendo consequências fatais para o resultado final de fertilidade (McEvoy et al., 2001). O'Callaghan & Boland (1999) já sugeriram que o declínio observado na fertilidade em vacas de alta produção é um problema mais relacionado ao oócito ruim e à qualidade embrionária, do que aos distúrbios endócrinos. Muito recentemente essa afirmação foi confirmada por Horan et al. (2005). Mais e mais, a mortalidade embrionária precoce é proposta como sendo uma causa significativa na falha reprodutiva em ruminantes (Dunne et al., 1999; Mann and (&) Lamming, 2001; Bilodeau-Goeseels and (&) Kastelic, 2003). Não se sabe se tal problema tem origem na qualidade de um oócito ruim e/ ou nas mudanças de microambiente dos embriões nas trompas de *Fallopium* e no útero (Boland et al., 2001). É nessa área que a técnica de coleta oocitária (OPU) pode ser utilizada. Primeiramente, tal técnica pode ser empregada na colheita de oócitos de maneira mais ou menos não-invasiva para estudar suas qualidades intrínsecas. Em segundo lugar, é um instrumento ideal para desvendar e analisar o ambiente intra-folicular. Ambas as aplicações dessa técnica serão comentadas extensivamente nos próximos parágrafos.

TÉCNICA DE COLETA DE OOCITOS (OPU) PARA O ESTUDO DA QUALIDADE OVOCITÁRIA EM VACAS DE LEITE DE ALTA PRODUÇÃO.

O teste final para qualidade do oócito é a sua habilidade em ser fertilizado e se desenvolver até o estágio de blastocisto, finalmente estabelecendo uma gestação que resulta em um produto vivo (Lonergan et al., 2001). Infelizmente, é praticamente impossível se transferir todos os oócitos avaliados para receptoras, confirmando-se a prenhez. Desta maneira, somos obrigados a utilizar outros parâmetros, os quais são apontados como sendo bem correlacionados à qualidade do oócito propriamente dito, como descrito anteriormente. O parâmetro mais confiável e comumente utilizado é a competência do desenvolvimento oocitário *in vitro* e, mais especificamente, no momento da primeira clivagem (Van Soom et al., 1992). Isso está relacionado ao *status* de poliadenilação de importantes genes maternos transcritos (Brevini-Gandolfi et al., 2000). Outros parâmetros de avaliação do oócito são utilizados rotineiramente, assim como a aparência morfológica do *cumulus* e ooplasma (Loos et al., 1989; Hawk and Wall, 1994), o conteúdo lipídico (Leroy et al., 2005), a avaliação da ultra-estrutura, do estágio nuclear, ooplasma (Revah and Butler, 1996; Yaakub et al., 1997; O'Callaghan et al., 2000), genes transcritos (Wrynzecki et al., 2000) e a presença de apoptose (Yuan et al., 2005). A OPU é uma técnica ideal para a colheita de oócitos em animais vivos, possibilitando o estudo de parâmetros morfológicos e de qualidade genética ou para investigar sua competência de desenvolvimento. Para esse propósito o protocolo de OPU foi otimizado por Bols (1997). Uma questão importante agora seria: As qualidades intrínsecas dos oócitos estão comprometidas nas vacas de alta produção leiteira? E, conseqüentemente, a qualidade alterada dos gametas femininos é um fator importante na patogenia da subfertilidade? Recentes estudos confirmam essa hipótese através do uso da técnica de OPU. Snijders et al. (2000) estudaram a competência do desenvolvimento dos oócitos em gado de leite com alto e

moderado mérito genético quanto à produção de leite. Oócitos provenientes de vacas em sistemas modernos de produção, com um alto mérito genético rederam um número significativamente menor de blastocistos *in vitro*, independente da produção de leite. Walters et al. (2002) observaram, em vacas de primeira e segunda lactações, um aumento na qualidade morfológica dos oócitos entre 30-70 dias pós-parto e uma clara diminuição a partir de então. Vacas de terceira lactação, no entanto, mostraram uma melhoria linear na qualidade oocitária provavelmente devido a um balanço energético menos severo (Walters et al., 2002b). Em contraste com esse estudo, no qual 120 vacas de leite foram submetidas a OPU, apenas uma vez durante o período de 120 dias após o parto, Kendrick et al. (1999) e Gwazdauskas et al. (2000) relataram que a qualidade oocitária é melhor por volta dos 30 dias pós-parto e diminui continuamente até os 100 dias pós-parto. No entanto, no estudo anterior, as mesmas vacas foram aspiradas duas vezes por semana, sendo esse um procedimento que interfere no início de uma nova onda folicular (“turnover”) e, provavelmente, altera a qualidade oocitária (Boni et al., 1996). Vacas de leite que foram superalimentadas durante o período seco para a indução de fígado gorduroso e que, conseqüentemente, demonstraram um balanço energético (BEN) mais profundo logo após o parto, produziram oócitos aos 80-120 dias pós-parto (pp) apresentando baixa competência no desenvolvimento *in vitro* quando comparadas a vacas controle (Kruip et al., 1995). Concluindo, pode-se dizer que, graças à técnica de aspiração oocitária foi possível se demonstrar a qualidade reduzida dos oócitos de vacas de alta produtividade leiteira. Essa observação pode ser considerada talvez como sendo parcialmente responsável pela fertilidade reduzida de maneira geral e, mais especificamente, pela baixa taxa de concepção e alta prevalência na mortalidade embrionária precoce. Uma qualidade oocitária pobre e subseqüente desenvolvimento embrionário desapontador pode estar refletindo um desenvolvimento folicular e um ambiente intrafolicular comprometido, afetando diretamente a maturação do oócito. O ambiente do fluido folicular (FF), envolvendo o oócito em crescimento e maturação pode ser perfeitamente estudado através da técnica de OPU.

A TÉCNICA DE COLHEITA OOCITÁRIA (OPU) COMO UMA MANEIRA IDEAL PARA A INVESTIGAÇÃO DO AMBIENTE INTRA-FOLICULAR

O fluido folicular está em contato com as células da granulosa e participando do processo final de crescimento do ovócito *in vivo*, da pré-maturação e do processo final de maturação. As condições intrafoliculares são determinantes para a qualidade do oócito. Geralmente, aceita-se o fato de que o RNAm materno e as proteínas moleculares são sintetizadas e acumuladas durante o crescimento e maturação oocitária (Lonergan, 2003a, Vassena et al. 2003; Van den Hurk & Zhao, 2005). Esta maturação é crucial para garantir o desenvolvimento embrionário na fase inicial antes da ativação do genoma, o qual ocorre no estágio de 16 células em vacas. Tem sido mostrado que o ambiente de maturação pode influenciar na abundância de diversos genes transcritos, importantes para o desenvolvimento em oócitos bovinos (Watson et al., 2000; Lonergan, 2003b). Transportando esse conhecimento para a situação específica das vacas de leite de alta produtividade, pode-se concluir que o oócito é vulnerável a possíveis mudanças no seu ambiente folicular. Britt (1992), levantou a hipótese de que a competência de desenvolvimento do oócito e a capacidade esteroideogênica do folículo de vacas de leite de alta produção

é determinada durante o longo período de crescimento folicular (até 80 dias) antes da ovulação. Desta maneira, a exposição de folículos primordiais a condições adversas associadas ao BEN no início do pós-parto, é menos capaz de produzir progesterona e estrógeno em quantidades adequadas (após a ovulação) (Britt, 1992; Roth et al., 2001). No mais, esses folículos contém um oócito inferior com anormalidades genéticas que irá ovular por volta de 60-80 dias pós-parto. Além do BEN, também tem se sugerido que a alta quantidade de energia e proteína nas rações modernas de vacas de leite altera o ambiente intra-folicular, e talvez afete a qualidade oocitária (Boland et al., 2001; McEvoy et al., 2001; Kenny et al., 2002). A qualidade oocitária dificultada resulta em baixas taxas de concepção, em alta mortalidade embrionária e, conseqüentemente, prolonga os intervalos entre parto e concepção. Sugere-se que diversos mecanismos estejam direta ou indiretamente afetando o crescimento e o desenvolvimento oocitário. Tem se tomado muita atenção quanto ao efeito do BEN nas mudanças endócrinas no soro e nos folículos, as quais afetam a viabilidade e o crescimento folicular (Gong, 2002; Lucy, 2003; Sutton et al., 2003; Webb et al., 2004). Além das interações entre crescimento e qualidade oocitária, sugere-se geralmente que quaisquer distúrbios endócrinos no ambiente intra-folicular possivelmente provoquem distúrbios no crescimento e maturação oocitária (Reis et al., 2002). No entanto, apenas poucos estudos sugeriram possíveis influências do BEN associadas a concentrações de glicose, β -hidroxibutirato (BHB) ou de ácidos graxos não esterificados (AGNE) na qualidade do oócito. No mais, pouco se sabe sobre as implicações dessas mudanças bioquímicas do soro, as quais ocorrem na composição do fluido folicular (FF) no pós-parto. Edwards (1974) já sugeriu que agentes capazes de interferir na saúde do oócito poderiam ser introduzidos no folículo pré-ovulatório e também poderiam exercer seus efeitos após ovulação, desde que haja relativamente grandes quantidades de FF entre as células do cummulus. O ambiente folicular de vacas de leite de alta produção tem sido extensivamente estudado em nosso laboratório. Desta maneira, fomos capazes de investigar se todas essas mudanças metabólicas no soro, causadas pelo BEN e pelas dietas de alta energia e proteína em vacas de leite de alta produtividade, refletem-se no fluido folicular. O nosso protocolo de OPU encontra-se descrito na literatura (Leroy et al., 2004b). Brevemente, 9 vacas de leite sadias múltiparas, apresentando alta produção, foram utilizadas para colheita de sangue e para a aspiração de amostras de fluido folicular.

Onze dias após o parto, todos os animais mostraram involução uterina normal e crescimento folicular em um ou em ambos os ovários, no exame ultra-sonográfico. Nos dias 14, 20, 26, 33, 40 e 46 após o parto, os folículos dominantes com um diâmetro maior que 0,8 cm foram sujeitos a aspiração transvaginal guiada por ultra-som como descrito por Bols et al. (1995). O reto foi esvaziado e a genitália externa, bem como a área perineal, foram limpas cuidadosamente. As vacas receberam anestesia epidural (5 cc de Procain HCl 4% com adrenalina, Eurovet N.V., Heusden-Zolder, Belgium) para a prevenção das contrações. Um instrumento para OPU, equipado com uma probe dotada de um transdutor multi angular mecânico (Esaote / Pie Medical NV, Maastricht, The Netherlands) e um sistema de agulha guiado (Pie Medical) foi inserido via vaginal e ambos os ovários foram visualizados com a ajuda da manipulação retal. Antes da aspiração, o número de folículos de diferentes tamanhos (< 4 mm, 4-8 mm, e > 8 mm) por ovário foi documentado. Subseqüentemente os folículos foram puncionados e o fluido folicular foi aspirado por um segundo operador, seguindo seu posicionamento ao longo da linha de biopsia. A agulha (TERUMO NEOLUS 21GX2" 0.8 X 50, Leuve, Belgium) foi anexada

através de um mandril de aço conectado a um tubo extra fino de silicone (inner diameter: 0.034"; Silclear™ Tubing, Multi Purpose Medical Grade Silicone Tubing, Degania Silicone/Israel) e uma seringa de 5 mL (Plastipak™, Madrid, Spain) foi utilizada para a aspiração do FF dos folículos puncionados. O maior e o segundo maior folículo (se presente) com um diâmetro maior do que 8 mm foram aspirados. Atenção foi tomada no sentido de prevenir a contaminação por sangue. Amostras de fluido folicular apresentando obvia contaminação com sangue foram omitidas dos processamentos subseqüentes. Para identificação de possível atresia do folículo puncionado, as análises de progesterona (P4) e estradiol – 17 β (E) em cada amostra de fluido folicular foram feitas através de RIA (radioimunoensaio). Fluido folicular com taxas de E/P4 <1 foram considerado oriundo de um folículo obviamente atrésico, sendo tais taxas omitidas das análises bioquímicas (Wise, 1987; Badinga et al., 1992; Landau et al., 2000). Em cada amostra as concentrações de glicose, beta-hydroxibutirato (β-OHB), uréia, proteína total (PT), triglicérides (TG), ácidos graxos não esterificados (AGNE) e colesterol total (CT) foram medidas através de uma técnica de análise química, utilizando-se dois analisadores automatizados usado em análises clínicas (Modular P & Hitachi 911, Roche Diagnostics). Alguns dos resultados encontram-se abaixo (Leroy et al., 2004b). Baseado nas medidas de glicose, concluímos que as concentrações de glicose presentes no FF são muito bem correlacionadas com os níveis séricos e que eles são consistentemente mais altos (10%) do que no soro. Estes achados sugerem que as mudanças pp quanto à glicemia são bem refletidas no FF dos folículos dominantes, mas que o oócito está mais ou menos protegido dessas concentrações extremamente baixas. Ambas as concentrações de glicose e de β-OHB, assim como a glicose no FF são negativamente correlacionadas ($r = -0,56$ e $-0,83$, respectivamente). A maioria das concentrações séricas de β-OHB atingem um pico aos 33 dias pp (**1,62 mM**). Esta concentração está associada aos sinais de cetose subclínica (Busato et al., 2002). As concentrações de β-OHB no soro e no FF dos folículos puncionados foram similares e ambas as curvas dos perfis foram exatamente as mesmas. Baseado nas boas correlações entre as concentrações no soro e no FF ao decorrer do período experimental pode-se dizer que os níveis elevados de β-OHB no soro (cetonemia) aparecerão também no FF. Esses achados correspondem aos resultados previamente descritos (Leroy et al., 2004a). As concentrações de uréia apresentaram um importante aumento durante as primeiras semanas após o parto e permaneceram estáveis nas semanas seguintes. Assim, como já mostrado por Leroy et al. (2004a) e Collins et al. (1997) em éguas e vacas no exame post-mortem, também encontramos uma correlação muito alta entre o FF e as concentrações de uréia sérica. Níveis elevados de uréia sérica refletem-se no FF e, portanto, podem influenciar na qualidade do oócito.

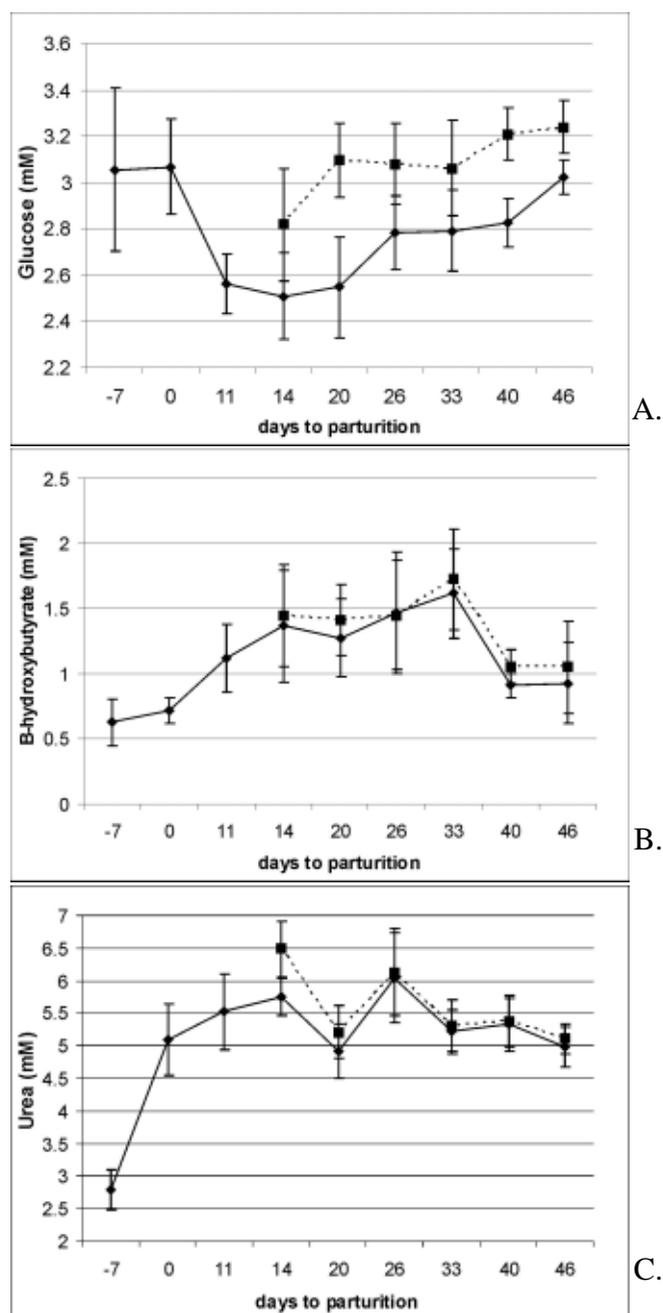


Figura 1- Médias e erro padrão da média (\pm SEM), glicose (A), β -hidroxibutirato (B) e uréia (C) concentrações (mM) no soro (linhas contínuas) e fluido folicular (linhas pontilhadas) em vacas de leite de alta produção durante o período experimental.

Durante o período de BEN, a lipólise causa um aumento nas concentrações de AGNE no soro durante as primeiras semanas pp, seguida de uma diminuição constante após esse período. As análises de medidas repetidas dos dados revelaram que existe uma diminuição paralela no FF. O jejum agudo resulta em um aumento de AGNE no soro e no FF como já foi mostrado (Comin et al., 2002; Jorritsma et al., 2003). Em nossos estudos, no entanto, as concentrações do FF permaneceram mais baixas do que os níveis séricos. Além disso, houve uma variação no soro muito maior quanto às concentrações de AGNE entre os animais quando comparados com o FF (coeficiente de variação com média de 58% e 30%, respectivamente). Ambos os achados sugerem que possivelmente exista um mecanismo para

proteger o oócito e as células da granulosa de possíveis efeitos tóxicos das altas concentrações de AGNE, que foram mostrados *in vitro* (Mu et al. 2001; Vanholder et al., 2003). As concentrações de AGNE e a composição no soro e no FF das vacas de leite de alta produção durante e logo após o período de BEN foram os focos de nossas pesquisas. Como mostra a figura 2, confirmou-se que as concentrações de AGNE no fluido folicular também aumentaram devido ao BEN, mas permaneceram significativamente mais baixas no soro. No mais, a composição de AGNE difere entre o soro e o FF (Leroy et al., 2005).

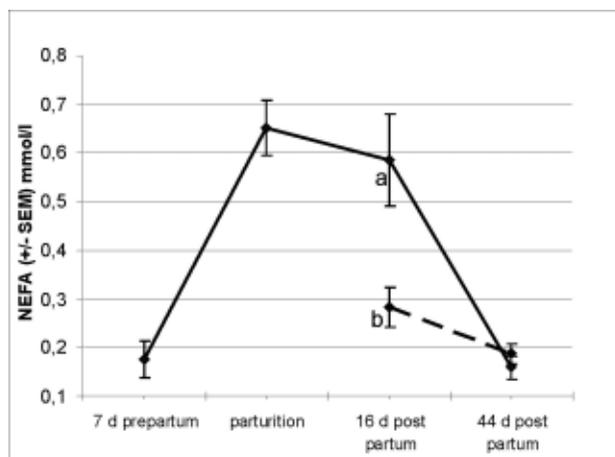


Figura 2- Media absoluta das concentrações de ácidos graxos não esterificados (\pm SEM) no soro (linhas contínuas) e no fluido folicular (linhas tracejada) em diferentes momentos até o parto. Concentrações de AGNE marcadas com as letras a e b diferem significativamente entre diferentes momentos. As concentrações de ácidos graxos não esterificados em um determinado momento marcado com*, diferem significativamente entre o soro e o fluido folicular ($< 0,05$).

Concluindo, a utilização da técnica de OPU tem mostrado pela primeira vez que a composição bioquímica do FF é bem correlacionada com a composição no soro e que as mudanças bioquímicas típicas que ocorrem durante as primeiras semanas pp são bem refletidas no FF do folículo dominante. Esse achado pode ser talvez um fator importante na patogenia da subfertilidade de vacas de leite de alta produtividade, afetando a qualidade de ambos os oócitos e as células da granulosa.

CONHECIMENTOS VÁLIDOS PARA ESTUDOS *IN VITRO*

O segundo passo importante neste caminho da pesquisa é investigar agora se esse BEN associado as concentrações no FF de, por exemplo, uréia, β -OHB, glicose ou AGNE são diretamente tóxicos para as células da granulosa e para o oócito. Sendo muito difícil investigar esta hipótese em animais vivos, desenvolvemos modelos de maturação *in vitro* para a investigação da toxicidade de altas concentrações de AGNE ou β -OHB (Leroy et al., 2005). Os efeitos das condições hipoglicêmicas na maturação oocitária e subsequente competência no desenvolvimento foram também testados. Kruip & Kemp (1999) já sugeriram possíveis efeitos tóxicos diretos dos altos níveis de AGNE no ovário. Jorritsma et al. (2004) demonstraram efeitos tóxicos nas concentrações supra-fisiológicas do ácido oleico ligado a albumina na maturação oocitária *in vitro*. Homa & Brown (1992) descreveram efeitos similares dos ácidos linoleicos. Os efeitos tóxicos das concentrações elevadas de AGNE foram também documentados

em bovinos (Vanholder et al., 2005) e em células da granulosa em humanos (Mu et al., 2001), em células de Leydig (Lu et al., 2003) e em células pancreáticas (Maedler et al., 2001). Em nossos estudos *in vitro*, testamos os efeitos das concentrações associadas ao BEN e aos três mais importantes ácidos graxos presentes no FF : ácido oléico (AO, C 18:1), ácido palmítico (AP, C 16: 0) e ácido esteárico (AE, C18:0). A adição de AP ou de AE durante a maturação oocitária mostrou um efeito negativo na maturação, fertilização, na taxa de clivagem e no número de blastocistos. Células do *cummulus* em apoptose foram observadas em maior quantidade e mais tarde, nos complexos de *cummulus* oócitos maturados na presença de AE ou AP. O tratamento OA não mostrou efeito de maneira alguma. Outra importante característica do BEN são as concentrações baixas e elevadas de glicose e de β -OHB em ambos, tanto no soro quanto no FF (Leroy et al., 2004b). Resultados preliminares indicaram que as condições hipoglicêmicas mais do que as concentrações de corpos cetônicos, durante a maturação *in vitro*, são detrimenais para a capacidade de desenvolvimento do oócito (Leroy et al., não publicado). Devido às dietas com alta proteína, a uréia aumenta no soro e no FF. Tem sido mostrado que altos níveis de uréia podem ser prejudiciais à qualidade do oócito. De Wit et al. (2001) demonstraram um retardo na maturação nuclear e taxas reduzidas de fertilização e clivagem em oócitos bovinos na presença de 6 mM de uréia, durante a inibição da polimerização de tubulina nos macrotúbulos. Efeitos tóxicos similares na maturação oocitária têm sido documentados por Ocon & Hansen (2003). Os dados destes estudos sugerem que os efeitos tóxicos das concentrações elevadas de AGNE no FF e de uréia ou concentrações muito baixas de glicose na qualidade dos oócitos podem ser um dos fatores através do qual, o BEN exerce seus efeitos negativos na fertilidade de vacas de leite de alta produtividade. Estes dados podem ser um passo importante na patogenia da fertilidade reduzida em vacas de leite de alta produtividade.

CONCLUSÕES

Graças a técnica de OPU foi possível estudar a qualidade do oócito e o ambiente intrafolicular em vacas de leite de alta produção. Todas as mudanças bioquímicas típicas que caracterizam o período de BEN em vacas de leite de alta produção podem ter seu impacto na composição do FF. Os oócitos parecem ser vulneráveis a estas alterações metabólicas levando a falha da competência no desenvolvimento. Isso poderia explicar parcialmente as desapontadoras taxas de concepção documentadas no mundo todo e a alta prevalência de morte embrionária em vacas de leite de alta produção.

REFERÊNCIAS

1. Badinga L., Driancourt M.A., Savio J.D., Wolfenson D., Drost M., De La Sota R.L. & Thatcher WW. 1992. Endocrine and ovarian responses associated with the first-wave dominant follicle. **Biol Reprod.** 47: 871-83.
2. Beam S.W. & Butler WR. 1997. Energy balance and ovarian follicle development prior to first ovulation postpartum in dairy cows receiving three levels of dietary fat. **Biology of Reproduction.** 56: 133-142.

3. Bilodeau-Goeseels S. & Kastelic J.P. 2003. Factors affecting embryo survival and strategies to reduce embryonic mortality in cattle. **Canadian Journal of animal Science**. 83: 659-671.
4. Boland M.P., Lonergan P. & O'Callaghan D. 2001. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. **Theriogenology**. 55: 1323-1340.
5. Bols P.E.J., Vandenheede J.M.M., Van Soom A. & de Kruif A. 1995. Transvaginal ovum pick-up (OPU) in the cow: a new disposable needle guidance system. **Theriogenology**. 43: 677-687.
6. Bols P.E.J. 1997. **Transvaginal ovum pick-up in the cow: technical and biological modifications**. PhD Thesis, Universtiy of Ghent.
7. Boni R., Roviello S. & Zicarelli L. 1996. Repeated ovum pick-up in Italian Mediterranean buffalo cows. **Theriogenology**. 46: 899-909.
8. Bousquet D., Bouchard E. & DuTremblay D. 2004. Decreasing fertility in dairy cows: myth or reality? **Le Médecin Vétérinaire**. 34: 59-61.
9. Brevini-Gandolfi T.A.L., Favetta L.A., Lonergan P. & Gandolfi F. 2000. The mechanism regulating maternal mRNA stability and translation is affected in bovine embryos with low developmental competence. **Theriogenology**. 53: 268 (Abstr.).
10. Britt J.H. 1992. Impacts of early postpartum metabolism on follicular development and fertility. **The Bovine Proceedings**. 39-43.
11. Busato A., Faissler D., Küpfer U. & Blum J.W. 2002. Body condition scores in dairy cows: associations with metabolic and endocrine changes in healthy dairy cows. **J Vet Med A**. 49: 455-460.
12. Butler W. R. 1998. Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. **J Dairy Sci**. 81:2533-2539.
13. Butler W.R. 2003. Energy balance realtionships with follicular development, ovulation and fertility in pp dairy cows. **Livestock Production Science**. 83: 211-218.
14. Cavestany D., Blanc J.E., Kulcsar M., Uriarte G., Chilibroste P., Meikle A., Febel H., Ferraris A. & Krall E. 2005. Studies of the transition cow under a pasture-based milk production system: metabolic profiles. **J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med**. 52: 1-7.
15. Collins A., Palmer E., Bezard J., Burke J., Duchamp G. & Buckley J.A. 1997. A comparison of the biochemical composition of equine follicular fluid and serum at four different stages of the follicular cycle. **Eq Vet J (Suppl)**. 25: 12-16.
16. Comin A., Gerin D., Cappa A., Marchi V., Renaville R., Motta M., Fazzini U. & Prandi A. 2002. The effect of an acute energy deficit on the hormone profile of dominant follicles in dairy cows. **Theriogenology**. 58: 899-910.
17. de Loos F., van Vliet C., van Maurik P. & Kruip T.A. 1989. Morphology of immature bovine oocytes. **Gamete Res**. 24: 197-204.
18. de Vries M.J. & Veerkamp R.F. 2000. Energy balance of dairy cattle in relation to milk production variables and fertility. **J Dairy Sci**. 83: 62-69.
19. De Wit A.A.C., Cesar M.L.F. & Kruip T.A.M. 2001. Effect of urea during in vitro maturation on nuclear maturation and embryo development of bovine cumulus-oocyte-complexes. **J Dairy Sci**. 84: 1800-1804.
20. Diskin M.G., Mackey D.R., Roche J.F., Sreenan J.M. 2003. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. **Animal Reproduction Science**. 78: 345-370.
21. Dunne L.D., Diskin M.G., Boland M.P., O'Farrell K.J. & Sreenan J.M. 1999. The effect of pre- and post-insemination plane of nutrition on embryo survival in beef heifers. **Animal Science**. 69: 411-

417.

22. Edwards R.G. 1974. Follicular fluid. **J Reprod Fert.** 37: 189-219.
23. Fahey J., O'Sullivan K., Crilly J. & Mee J.F. 2002. The effect of feeding and management practices on calving rate in dairy herds. **Animal Reproduction Science.** 74: 133-150.
24. Gong J.G. 2002. Influence of metabolic hormones and nutrition on ovarian follicle development in cattle: practical implications. **Domestic Animal Endocrinology.** 23: 229-241.
25. Gwazdauskas F.C., Kendrick K.W., Pryor A.W. & Bailey T.L. 2000. Impact of follicular aspiration on folliculogenesis as influenced by dietary energy and stage of lactation. **J Dairy Sci.** 83:1625-1634.
26. Harrison R.O., Ford S.P., Young J.W., Conley A.J. & Freeman A.E. 1990. Increased milk production versus reproductive and energy status of high producing dairy cows. **J Dairy Sci.** 73: 2749-2758.
27. Hawk H.W. & Wall R.J. 1994. Improved yields of bovine blastocysts from in vitro-produced oocytes. I. Selection of oocytes and zygotes. **Theriogenology.** 41: 1571-1583.
28. Homa S.T. & Brown C.A. 1992. Changes in linoleic acid during follicular development and inhibition of spontaneous breakdown of germinal vesicles in cumulus-free bovine oocytes. **J Reprod Fert.** 94: 153-160.
29. Horan B., Mee J.F., O'connor P., Rath M. & Dillon P. 2005. The effect of strain of Holstein-Friesian cow and feeding system on postpartum ovarian function, animal production and conception rate to first service. **Theriogenology.** 63: 950-971.
30. Jorritsma R., César M.L., Hermans J.T., Kruitwagen C.L.J.J., Vos P.L.A.M. & Kruip T.A.M. 2004. Effects of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cells and developmental potential of oocytes *in vitro*. **Anim Reprod Sci.** 81: 225-235.
31. Jorritsma R., Groot M.W., Vos P.L., Kruip T.A., Wensing T. & Noordhuizen J.P. 2003. Acute fasting in heifers as a model for assessing the relationship between plasma and follicular fluid NEFA concentrations. **Theriogenology.** 60:151-161.
32. Kendrick K.W., Bailey T.L., Garst A.S., Pryor A.W., Ahmadzadeh A., Akers R.M., Eyestone W.E., Pearson R.E. & Gwazdauskas F.C. 1999. Effects of energy balance on hormones, ovarian activity, and recovered oocytes in lactating Holstein cows using transvaginal follicular aspiration. **Journal of Dairy Science.** 82: 1731-1740.
33. Kenny D.A., Humpherson P.G., Leese H.J., Morris D.G., Tomos A.D., Diskin M.G. & Sreenan J.M. 2002. Effect of elevated systemic concentrations of ammonia and urea on the metabolite and ionic composition of oviductal fluid in cattle. **Biol Reprod.** 66: 1797-1804.
34. Kruip T.A.M. & Kemp B. 1999. Voeding en vruchtbaarheid bij landbouwhuisdieren. **Tijdschrift voor Diergeneeskunde.** 124: 462-467.
35. Kruip T.A.M., Van Beek H., De Wit A. & Postma A. 1995. Quality of bovine oocytes in dairy cows post partum: consequences for embryo production *in vivo* and *in vitro*. *Proceedings of 11th conference of the ESET, Hannover, 8-9 September 1995:* p 113-119.
36. Kruip T.A.M., Stefanowska J & Ouweltjes W. 2000. Robot milking and effect on reproduction in dairy cows: a preliminary study. **Animal Reproduction Science.** 60-61: 443-447.
37. Landau S., Braw-Tal R., Kaim M., Bor A. & Bruckental I. 2000. Preovulatory follicular status and diet affect the insulin and glucose content of follicles in high-yielding dairy cows. **Anim Reprod Sci.** 64:181-197.
38. Lean I.J., Galland J.C. & Scott J.L. 1989. Relationships between fertility, peak milk yields and lactational persistency in dairy cows. **Theriogenology.** 31: 1093-1103.
39. Leroy J.L.M.R., Opsomer G., De Vliegher S., Vanholder T., Goossens L., Geldhof A., Bols P.E.J.,

- de Kruif A. & Van Soom A. 2005. Comparison of embryo quality in high-yielding dairy cows, in dairy heifers and in beef cows. **Theriogenology**. (In Press).
40. Leroy J.L.M.R., Vanholder T., Delanghe J.R., Opsomer G., Van Soom A., Bols P.E.J. & de Kruif A. 2004a. Metabolite and ionic composition of follicular fluid from different-sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. **Anim Reprod Sci**. 80: 201-211.
41. Leroy J.L.M.R., Vanholder T., Delanghe J.R., Opsomer G., Van Soom A., Bols P.E.J., De Wulf J. & de Kruif A. 2004b. Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum. **Theriogenology**. 62: 1131-1143.
42. Leroy J.L.M.R., Vanholder T., Mateusen B., Christophe A., Opsomer G., de Kruif A., Genicot G. & Van Soom A. 2005. Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes *in vitro*. **Reproduction**. (In Press).
43. Loeffler S.H., de Vries M.J. & Schukken Y.H. 1999. The effects of timing of disease occurrence, milk yield, and body condition on fertility of dairy cows. **J Dairy Sci**. 82: 2589-2604.
44. Lonergan P., Gutierrez-Adan A., Rizos D., Pintado B., de la Fuente J., Wade M. & Boland M.P. 2003b. Relative messenger RNA abundance in bovine oocytes collected at the LH surge and matured *in vitro* or their counterparts matured *in vivo*. **Theriogenology**. 59, 493.
45. Lonergan P., Rizos D., Gutierrez-Adan A., Fair T. & Boland M.P. 2003a. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reprod. Domest. Anim.* 38: 259-267.
46. Lonergan P., Rizos D., Ward F. & Boland M.P. 2001. Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. **Reproduction Nutrition and Development**. 41: 427-437.
47. Lopez H., Satter L.D. & Wiltbank M.C. 2004. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. **Anim. Reprod. Sci**. 81: 209-223.
48. López-Gatius F. 2003. Is fertility declining in dairy cattle? A retrospective study in northeastern Spain. **Theriogenology**. 60: 89-99.
49. Lu Z.H., Mu Y., Wang B.A., Li X.L., Lu J.M., Li J.Y., Pan C.Y., Yanase T. & Nawata H., 2003. Saturated free fatty acids, palmitic acid and stearic acid, induce apoptosis by stimulation of ceramide generation in rat testicular Leydig cell. **Biochem. Bioph. Res. Co**. 303: 1002-1007.
50. Lucy M.C. 2001. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? **J. Dairy Sci**. 84: 1277– 1293.
51. Lucy M.C. 2003. Mechanisms linking nutrition and reproduction in postpartum cows. **Reproduction Supplement**. 61: 415–427.
52. Maedler K., Spinass G.A., Dyntar D., Moritz W., Kaiser N. & Donath M.Y. 2001. Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on beta-cell turnover and function. **Diabetes**. 50: 69-76.
53. Mann G.E. & Lamming G.E. 2001. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. **Reproduction**. 121:175-180.
54. McEvoy T.G., Robinson J.J., Ashworth C.J., Rooke J.A. & Sinclair K.D. 2001. Feed and forage toxicants affecting embryo survival and fetal development. **Theriogenology**. 55: 113-129.
55. McMillan W.H. 1998. Statistical models predicting embryo survival to term in cattle after embryo transfer. **Theriogenology**. 50: 1053-1070.
56. Mu Y.M., Yanase T., Nishi Y., Tanaka A., Saito M., Jin C.H., Mukasa C., Okabe T., Nomura M., Goto K. & Nawata H. 2001. Saturated FFAs, palmitic acid and stearic acid, induce apoptosis in human granulosa cells. **Endocrinology**. 142: 3590-3597.

57. Ocon O.M. & P.J. Hansen. 2003. Disruption of bovine oocytes and preimplantation embryos by urea and acidic pH. **J. Dairy Sci.** 86: 1194-2000.
58. O'Callaghan D. & Boland M.P. 1999. Nutritional effects on ovulation. **Anim. Sci.** 68, 299-314.
59. O'Callaghan D., Yaakub H., Hyttel P., Spicer L.J., Boland M.P. 2000. Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition and systemic hormone concentrations in ewes. **Journal of Reproduction and Fertility.** 118: 303-313.
60. Opsomer G, Coryn M., Deluyker H. & de Kruif A. 1998. An analysis of ovarian dysfunction in high yielding dairy cows after calving based on progesterone profiles. **Reprod. Domest. Anim.** 33: 193-204.
61. Reis A., Staines M.E., Watt R.G, Dolman D.F. & McEvoy T.G. 2002. Embryo production using defined oocyte maturation and zygote culture media following repeated ovum pick-up (OPU) from FSH-stimulated Simmental heifers. **Animal Reproduction Science.** 72: 137-151.
62. Revah I. & Butler W.R. 1996. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility.** 106: 39-47.
63. Royal M., Mann G.E. & Flint A.P.F. 2000. Strategies for reversing the trend towards subfertility in dairy cattle. **The Veterinary Journal.** 160: 53-60.
64. Roth Z., Meidan R., Shaham-Albalancy A., Braw-Tal R. & Wolfenson D. 2001. Delayed effect of heat stress on steroid production in medium-sized and preovulatory bovine follicles. **Reproduction.** 121: 745-751.
65. Rukkamsuk T., Wensing T., Kruif T.A.M. 1999. Relationship between triacylglycerol concentrations in the liver and first ovulation in postpartum dairy cows. **Theriogenology.** 51: 1133-1142.
66. Silvia W.J. 2003. Addressing the decline in reproductive performance of lactating dairy cows: a researcher's perspective. **Veterinary Science Tomorrow.** 3: 1-5.
67. Snijders S.E.M., Dillon P.G., O'Farrell K.J., Diskin M., Wylie A.R.G., O'Callaghan D., Rath M. & Boland M.P. 2001. Genetic merit for milk production and reproductive success in dairy cows. **Animal Reproduction Science.** 65: 17-31.
68. Snijders S.E., Dillon P., O'Callaghan D. & Boland M.P. 2000. Effect of genetic merit, milk yield, body condition and lactation number on *in vitro* oocyte development in dairy cows. **Theriogenology.** 53: 981-989.
69. Sutton M.L, Gilchrist R.B. & Thompson J.G. 2003. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. **Human Reproduction Update.** 9: 35-48.
70. van den Hurk R. & Zhao J. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology.** 63: 1717-1751.
71. Vanholder T., Opsomer G., Govaere J.L., Coryn M. & A. de Kruif. 2002. Cystic ovarian disease in dairy cattle: etiology, pathogenesis, and risk factors. **Tijdschr. Diergeneeskd.** 127: 146-155.
72. Vanholder T., Leroy J.L.M.R., Van Soom A., Opsomer G., Maes D., Coryn M. & de Kruif A. 2005 . Effect of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cell steroidogenesis and proliferation in vitro. **Animal Reproduction Science.** 2005, 87: 33-44.
73. Van Soom A., Van Vlaenderen I., Mahmoudzadeh A.E., Deluyker H. & de Kruif A. 1992. Compaction rate of in vitro fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. **Theriogenology.** 38: 905-919.
74. Vassena R., Mapletoft R.J., Allodi S., Singh J. & Adams G. 2003. Morphology and developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status. **Theriogenology,**60: 923-932.

75. Vernon R.G. 2002. Nutrient partitioning, lipid metabolism and relevant imbalances. **Proceedings of the 12th World Buiatrics Congress**, 18-23 August, 2002; Hannover, Germany.
76. Villa-Godoy A., Hughes T.L., Emery R.S., Chapin L.T. & Fogwell R.L. 1988. Association between energy balance and luteal function in lactating dairy cows. **J Dairy Sci.** 71:1063-1072.
77. Walters A.H., Bailey T.L., Pearson R.E. & Gwazdauskas F.C. 2002. Parity-related changes in bovine follicle and oocyte populations, oocyte quality, and hormones to 90 days postpartum. **J. Dairy Sci.** 85: 824-832.
78. Watson A.J., De Sousa P., Caveney A., Barcroft L.C., Natale D., Urquhart J. & Westhusin M.E. 2002. Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. **Biology of Reproduction.** 62, 355-364.
79. Webb R., Garnsworthy P.C., Gong J.G. & Armstrong D.G. 2004. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. **J Anim Sci.** 83 (E. Suppl): E63-E74.
80. Wise T. 1987. Biochemical analysis of bovine follicular fluid: albumine, total protein, lysosomal enzymes, ions, steroids and ascorbic acid content in relation to follicular size, rank, atresia classification and day of estrous cycle. **J. Anim. Sci.** 64: 1153-1169.
81. Wrenzycki C., De Sousa P., Overström E.W., Duby R.T., Herrmann D., Watson A.J., Niemann H., O'Callaghan D. & Boland M.P. 2000. Effects of superovulated heifer diet type and quantity on relative mRNA abundances and pyruvate metabolism in recovered embryos. **Journal of Reproduction and Fertility.** 118: 69-78.
82. Yaakub H., O'Callaghan D., O'Doherty J.V. & Hyttel P. 1997. Effect of dietary intake on follicle numbers and oocyte morphology in unsuperovulated and superovulated ewes. **Theriogenology** 47: 182 (Abstr).
83. Yuan Y.Q., Van Soom A., Leroy J.L.M.R., Dewulf J., Van Zeveren A., de Kruif A. & Peelman L.J. 2005. Apoptosis in cumulus cells, but not in oocytes, may influence bovine embryonic developmental competence. **Theriogenology.** 63: 2147–2163.

INOVAÇÕES METODOLÓGICAS NA BIOTECNOLOGIA DE REFRIGERAÇÃO E CONGELAÇÃO DE SÊMEN EQUINO

Papa, F.O.; Melo, C.M.; Dell'Aqua, J.A.; Macedo, L.P.; Carvalho, A.G.;
Alvarenga, M.A.; Medeiros, A.S.L.

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, UNESP Botucatu, SP, Brazil,
papa@fmvz.unesp.br

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de técnicas adequadas para a preservação e armazenamento de sêmen é um dos passos de maior importância neste avanço, uma vez que possibilita o melhor aproveitamento de animais de grande potencial genético, o armazenamento de material genético de animais que não possam – temporária ou permanentemente – serem utilizados na reprodução, além de permitir o transporte de sêmen a longas distâncias, sendo considerado como o melhor seguro biológico de reprodutores geneticamente superiores.

Em função da dificuldade de se obter padronização da Biotécnica de congelamento de sêmen equino, a técnica mais utilizada atualmente no Brasil tem sido a refrigeração e transporte de amostras refrigeradas. Dentre os fatores limitantes da utilização de sêmen congelado na espécie equina encontramos o alto custo com equipamentos, necessidade de mão de obra especializada, deslocamentos de todo material de congelamento até os haras, assim como locais apropriados para manipulação do sêmen nesses mesmos haras.

Com base nas dificuldades em processar amostras de sêmen nas propriedades rurais, uma nova técnica pode resolver ou amenizar todos esses problemas. Esta consiste na colheita do sêmen nos estabelecimentos rurais, diluição, centrifugação quando necessário pré-resfriamento em containers adequados e o seu envio para centrais ou laboratórios especializados, os quais detendo uma infraestrutura adequada poderão processar e criopreservar amostras de sêmen com segurança e manter ou mesmo melhorar os índices de fertilidade.

REFRIGERAÇÃO E TRANSPORTE DE SÊMEN

O Brasil ocupa posição de destaque na utilização de sêmen refrigerado, sendo o segundo país que mais utiliza esta biotécnica. Dentre as vantagens de sua utilização destacamos a possibilidade de coletar e processar o sêmen numa propriedade e transportá-lo a diferentes localidades para inseminação de éguas. Com isso, se elimina o custo e o estresse associado ao o envio de éguas até o garanhão, além da redução da transmissão de doenças que poderiam afetar a égua recém chegada.

A ampla utilização da refrigeração e transporte de sêmen equino, assim como a liberação da congelamento de sêmen nas diferentes Associações de criadores, motivou diversas pesquisas na Área de Reprodução Animal-FMVZ-UNESP-Botucatu.

Experimento I: Efeito de dois antibióticos na viabilidade e fertilidade do sêmen equino refrigerado a 5°C (Macedo *et al* 2005)

Quinze ejaculados de cinco garanhões foram diluídos na concentração de 50×10^6 de espermatozoides por mL de extensor a base de glicose e leite desnatado (Kenney, et al 1975), com dois diferentes antibióticos: sulfato de gentamicina e sulfato de ampicilina na concentração de 0,2 mg/ml. As

amostras foram analisadas a cada 24 h pelo CASA para motilidade total, progressiva e número de espermatozoides rápidos e a integridade de membrana plasmática pela fluorescência (Harrison e Vickers, 1990). Para o teste de fertilidade utilizaram-se dois ciclos de 12 éguas, as quais foram inseminadas 36 horas após indução da ovulação com hCG com 1×10^9 de espermatozoides refrigerados por 72h a 5°C. O diagnóstico de gestação foi realizado 15 dias após a ovulação por ultra-sonografia. Os parâmetros espermáticos, bem como os índices de fertilidade estão descritos na tabela 1 e figura 1, respectivamente. Através do estudo pode-se concluir que os antibióticos foram eficientes no controle do crescimento bacteriano. Analisando os parâmetros espermáticos observa-se que o antibiótico gentamicina apresentou uma ação deletéria quando comparado com a amicacina ($p < 0,05$) figuras 1 e 2. Quanto à fertilidade apesar das diferenças entre os antibióticos utilizados gentamicina de 33,3% (4/12) e amicacina 66,7% (8/12) não foi observada diferença estatística ($p > 0,05$) provavelmente devido ao número de I.A.

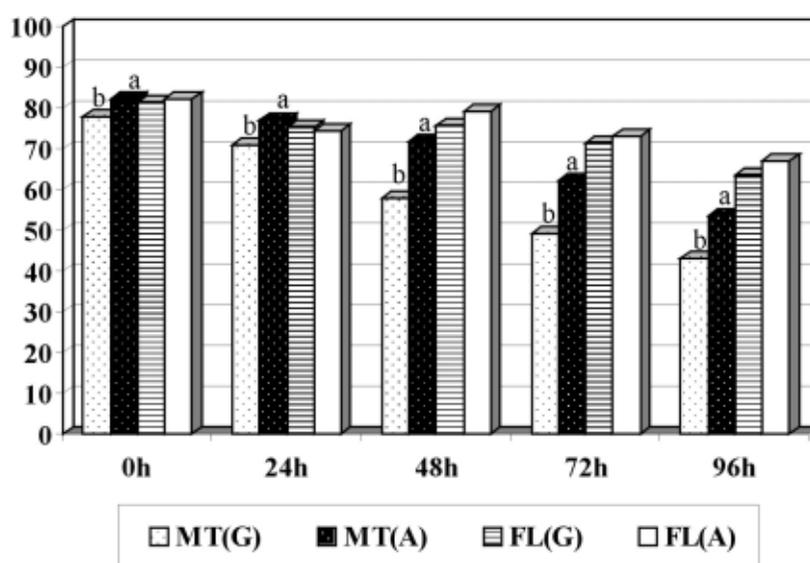


Figura 1- Motilidade total (MT) e integridade da membrana plasmática (FL) de sêmen refrigerado a 5°C, em diferentes momentos com os antibióticos gentamicina (G) e amicacina (A), Letras diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

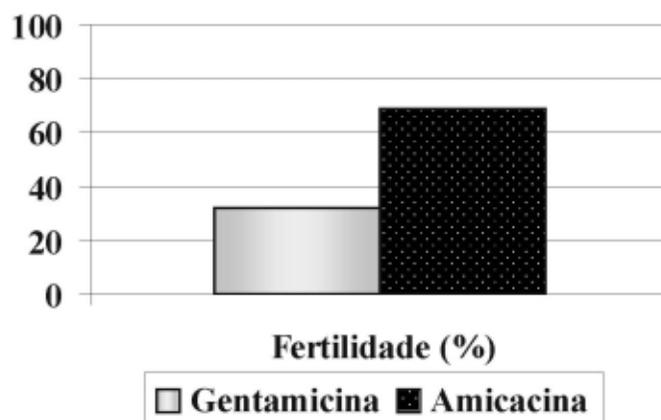


Figura 2. Resultados de fertilidade de éguas inseminadas com 72 hs de sêmen refrigerado a 5°C, utilizando os antibióticos gentamicina e amicacina.

Experimento II: Efeito de diferentes diluentes nos parâmetros espermáticos de sêmen refrigerado (Carvalho, G.A. *et al.*, 2005)

Vinte ejaculados de quatro garanhões foram divididos em 4 alíquotas, diluídos na proporção de 1:1 com os diferentes diluentes (E1=Kenney, E2=glicina+gema+taurine*, E3=glicina+leite desnatado, E4=glicina+leite desnatado+taurine), centrifugados à 600xg/10'. Os *pellets* foram ressuspensos com os respectivos diluentes e refrigerados em Equitainer® por 24h. Após esse período as amostras foram transferidas para caixas isotérmicas contendo água na mesma temperatura do Equitainer® e mantidas em geladeira por 96h. As amostras foram avaliadas a cada 24h pelo CASA e a integridade de membrana pela fluorescência. Foram realizadas 91 inseminações: 16 grupo 1 (E1/48h) e 15 para os outros grupos (E2/48h, E3/48h, E4/48h, E4/72h e E4/96h). O diagnóstico de gestação foi realizado 16 dias após a ovulação. Os resultados laboratoriais e as taxas de fertilidade estão descritos nas figuras 3, 4 e 5, respectivamente.

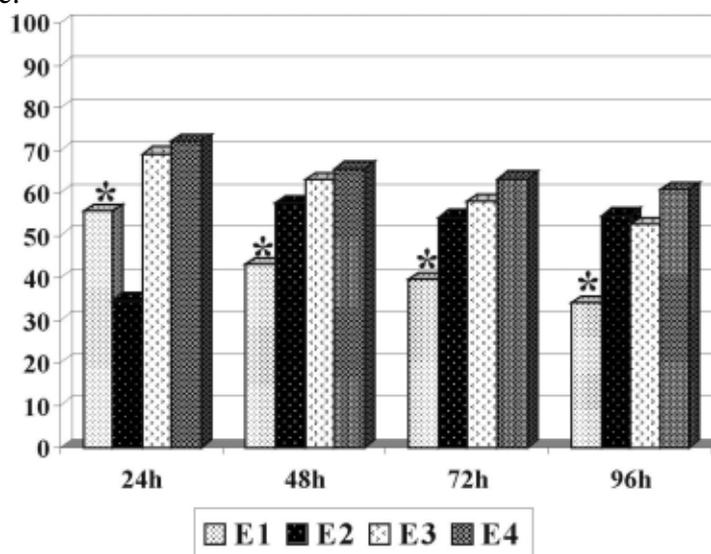


Figura 3. Médias de motilidade total em 4 diferentes diluentes após os períodos de refrigeração: 24, 48, 72 e 96h. (*) diferem estatisticamente dos demais ($p < 0,05$).

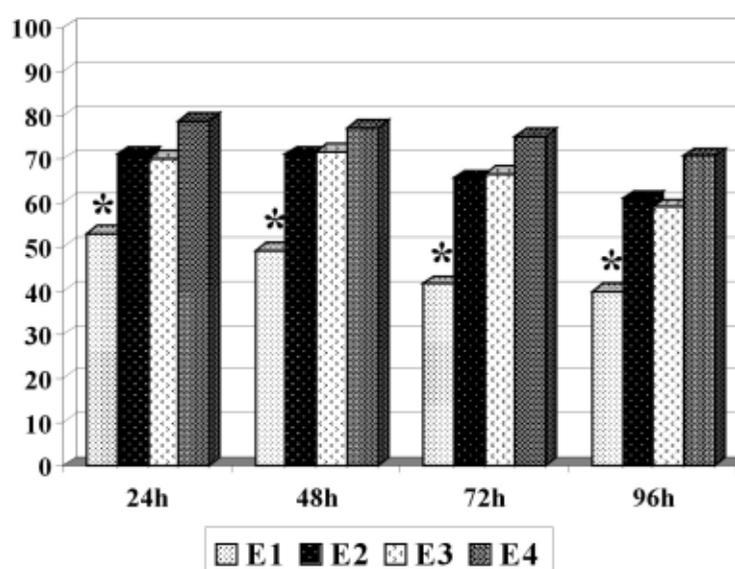


Figura 4. Médias da integridade membrana plasmática em 4 diferentes diluentes após os períodos de refrigeração: 24, 48, 72 e 96h. (*) diferem estatisticamente dos demais ($p < 0,05$).

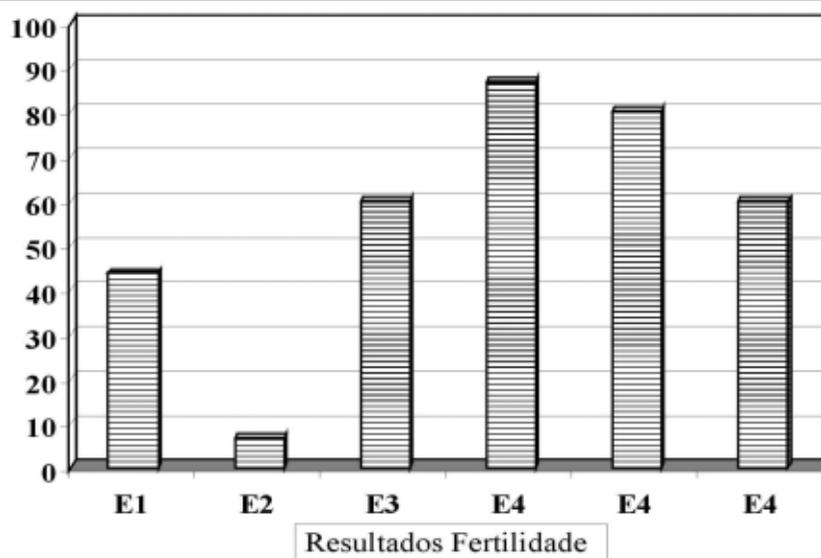


Figura 5. Porcentagem de prenhes de 4 diferentes diluentes com 48 hs de refrigeração e do diluente E4 com 72 e 96 hs de refrigeração. ($P>0,05$).

A associação glicina + leite desnatado + taurine presente no diluente E4, possibilitou a manutenção dos parâmetros espermáticos, bem como a fertilidade do sêmen refrigerado nos momentos 48, 72 e 96h.

SÊMEN REFRIGERADO E POSTERIORMENTE CONGELADO:

Experimento I: Efeito da refrigeração por 24 horas antes da congelação na fertilidade de sêmen eqüino (Melo et al 2005)

Treze ejaculados de diferentes garanhões foram diluídos com Botu-Semen® e divididos em duas partes: uma submetida a congelação (Papa et al, 2002) como grupo Controle e a outra diluída na concentração de 50×10^6 espermatozoides/mL e refrigerada em Equitainer® por 24h e congelada (Tratamento). As éguas foram inseminadas pré e pós-ovulação, com a concentração de 350×10^6 espermatozoides viáveis com pipeta flexível, na ponta do corno. Os resultados laboratoriais e a fertilidade estão dispostos na tabela 2.

Tabela 1: Valores médios entre os garanhões e protocolos de congelação na motilidade total (TM), motilidade progressiva (PM) integridade de membrana (FL) e fertilidade (FERT):

Garanhão	Tratamento	TM(%)	PM (%)	FL(%)	FERT (%)
A	Controle	71,00±5,33	40,67±6,8	46,67±8,57	72,7
A	Tratamento	73,67±3,88	37,00±8,25	46,5±6,09	83,3
B	Controle	73,33±6,22	34,67±2,58	53,83±6,08	40,0
B	Tratamento	68,67±10,11	22,67±3,27	54,17±8,08	50,0

A refrigeração por 24h previamente a congelação não afetou os parâmetros laboratoriais e os índices de fertilidade. Portanto, semelhante as amostras refrigeradas, hoje é possível colher o sêmen nos estabelecimentos rurais, manipular os mesmos e enviar em contaniers sob refrigeração até centrais e laboratórios especializados para a criopreservação.

SÊMEN CONGELADO**Experimento I: Utilização do diluente MP 50 para a criopreservação de sêmen eqüino (Papa *et al.*, 2002)**

78 ejaculados provenientes de 5 garanhões foram analisadas pelo CASA e a integridade de membrana por fluorescência. O sêmen foi centrifugado e os *pellets* ressuspensos com diluente MP50 na concentração de 200×10^6 espermatozoides/mL, envasado em palhetas de 0,5mL e criopreservado. No teste de fertilidade foram inseminadas 12 éguas com dose de 800×10^6 espermatozoides totais no corpo uterino até 6h pós-ovulação. O diagnóstico de gestação foi realizado 12 dias após a ovulação e resultou em 75% de éguas prenhes (9/12). O diluente MP50 de nome comercial Botu-Crio[®] manteve a viabilidade e fertilidade após o processo de criopreservação, viabilizando a utilização do sêmen congelado, o que pode colaborar com um aumento da variabilidade genética, pois favorece o uso de diferentes garanhões além de contribuir como seguro biológico de animais de alto valor genético.

Experimento II: A influência do número de espermatozoides e tempo de estabilização na congelação de sêmen eqüino utilizando Botu-Crio[®] (Blanes *et al.*, 2005)

Quinze ejaculados de diferentes garanhões foram diluídos com meio Botu-Semen[®] e centrifugados. Os pellets foram ressuspensos com diluidor Botucio[®] em palhetas de 0,5mL nas concentrações de 200×10^6 (C1), 150×10^6 (C2), 100×10^6 (C3) e 50×10^6 (C4) espermatozoides. Parte das palhetas foi levada à refrigeração 5°C por 20 minutos e outra à 60 minutos e em seguida imersas em N₂. As amostras foram descongeladas em banho-maria à 46°/20" (Dell'Aqua *et al.*, 2001), submetidas ao CASA e integridade de membrana espermática pela fluorescência. Os valores da motilidade total, progressiva e integridade de membrana não apresentaram diferenças estatísticas nas diferentes concentrações espermáticas por palheta. As amostras estabilizadas a 5°C/20 min. apresentaram valores de MT superiores as estabilizadas por 60min quando congeladas com Botu-Crio[®]. Conforme figura 6.

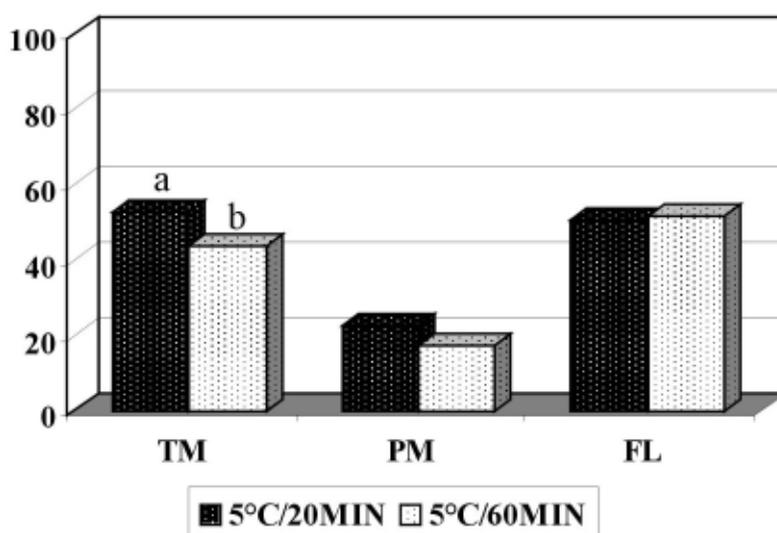


Figura 6. Porcentagem da motilidade total (TM), motilidade progressiva (PM) e integridade da membrana plasmática (FL) nos tempos de estabilização de 20 e 60 minutos. Letras diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

Experimento III: Criopreservação de sêmen de garanhões utilizando diferentes amidas (Medeiros et al., 2002)

Dois ejaculados de 20 garanhões de diferentes raças com motilidade acima de 60% foram congelados em palhetas de 0,5 mL com o diluente INRA 82 contendo diferentes crioprotetores (Dimetilacetamida 1, 3 e 5%, Metilformamida 5%, Dimetilformamida 5% e Glicerol 5%). Após descongelação as palhetas foram analisadas pelo CASA e a integridade de membrana pela fluorescência. Os resultados encontram-se na tabela 7. O presente experimento demonstrou que as amidas, de um modo geral, protegeram melhor o espermatozóide equino durante o processo de congelação, bem como a manutenção da fertilidade. Trinta inseminações foram realizadas, sendo metade com Dimetilformamida e o restante com Glicerol, com índices de 40 % (6/15) e 0% (0/15), respectivamente. Conforme figura 7.

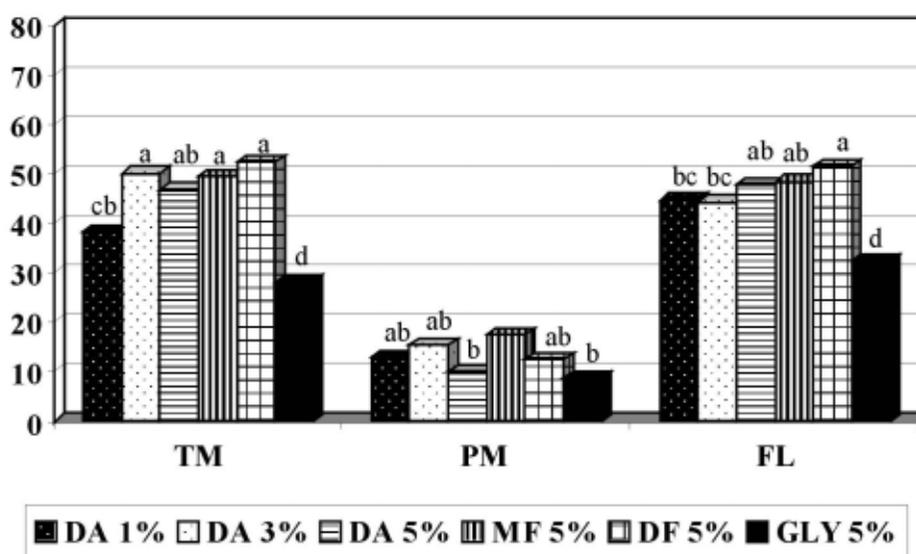


Figura 7. Porcentagem da motilidade total (TM), motilidade progressiva (PM) e integridade da membrana plasmática (FL) nas diferentes associações de crioprotetores. Letras diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

Experimento IV: Efeito do tempo e intensidade de centrifugação para congelação de sêmen equino (Dell'Aqua Jr. & Papa, 2001)

Doze ejaculados de diferentes garanhões foram centrifugados para remoção do plasma seminal para congelação. Nove diferentes combinações de tempos e intensidades de centrifugação foram verificados, com objetivo de avaliar qual procedimento apresentava maior recuperação espermática com o mínimo de alterações nos parâmetros espermáticos estudados. Os ejaculados foram diluídos em uma solução composta de 50% de Ringer lactato e 50% leite desnatado (Kenney, et al. 1975) na proporção de 1:1 (sêmen:diluente) e centrifugados nos seguintes protocolos: P1 (600 x g/3min); P2 (800 x g/3min); P3 (1000 x g/3min); P4 (600 x g/5min); P5 (800 x g/5min); P6 (1000 x g/5min); P7 (600 x g/10min); P8 (800 x g/10min); P9 (1000 x g/10min). Os resultados estão demonstrados na figura 8.

Em relação aos resultados obtidos concluiu-se que a intensidade de centrifugação de 600 x g por um período de 10 minutos promove uma recuperação espermática em torno de 87% dos espermatozoides iniciais e não interfere na motilidade e na integridade da membrana plasmática do espermatozóide.

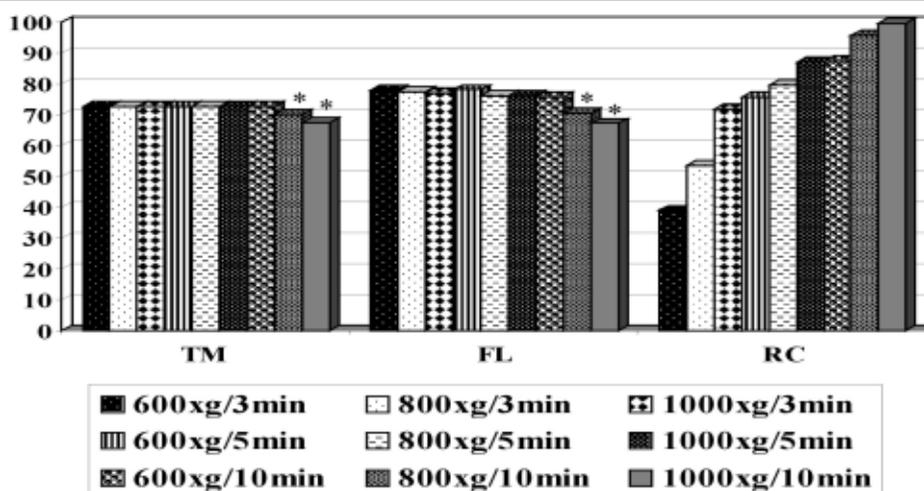


Figura 8. Porcentagem da total motility (TM), integridade da membrana plasmática (FL) e recuperação espermática nos diferentes protocolos de centrifugação, protocolos que apresentam * diferem estatisticamente dos demais ($p < 0,05$).

Experimento V: Efeito do tipo de envase e temperatura de descongelção na criopreservação de sêmen eqüino (Dell'Aqua Jr. & Papa, 2001)

Doze ejaculados de diferentes garanhões foram utilizados na verificação do efeito do tipo de envase e temperatura de descongelção na criopreservação de sêmen eqüino. Foram estudados três tipos de envase para sêmen mini-palhetas (0,25 mL), palheta francesa (0,5 mL) e macrotubo (4 mL) em três temperaturas de descongelção 38°C, 46°C e 65°C, sendo o tempo de permanência nestas temperaturas estabelecido para cada tipo de envase até que este atingisse 35°C. Desta forma foram definidos que para as mini-palhetas 0,25 mL 38°C/30seg, 46°C/15seg e 65°C/7seg; palhetas 0,5 mL 38°C/40seg, 46°C/20seg e 65°C/10seg e macrotubo 4 mL 38°C/90seg, 46°C/50seg e 65°C/30seg. Os parâmetros espermáticos avaliados foram a motilidade total computadorizada (CASA) e a integridade da membrana plasmática pela fluorescência (Harrison e Vickers, 1990) e estão demonstrados na figura 9.

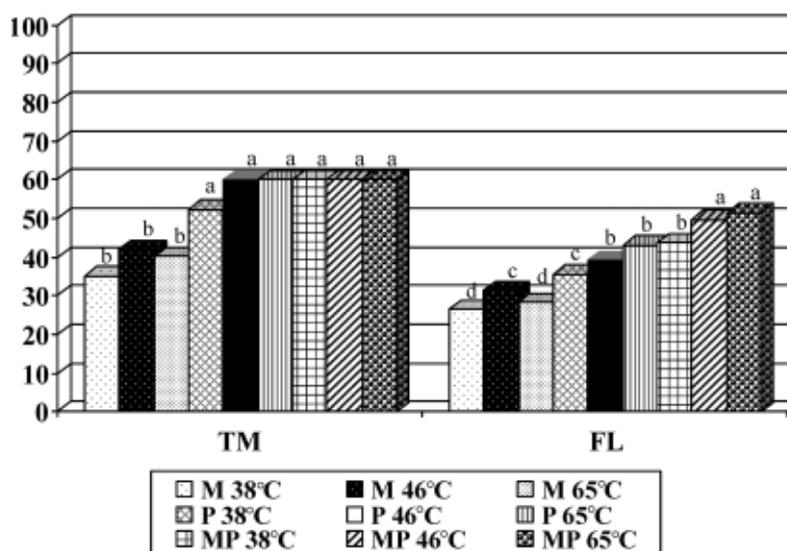


Figura 9. Porcentagem da mitilidade total (MT) e integridade da membrana plasmática (FL) nos diferentes tipos de envase e temperatura de descongelção. Letras diferentes diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

Em relação aos dados obtidos concluí-se que as mini-palhetas se apresentam como um tipo de envase superior as palhetas e ao macrotubo. E que as temperaturas descongelamento mais altas são melhores na manutenção dos parâmetros espermáticos exceto no macrotubo, onde uma temperatura intermediária preservou melhor a integridade da membrana plasmática.

Experimento VI: Efeito da dose inseminante e do local de deposição de sêmen na fertilidade de éguas inseminadas com sêmen congelado (Dell'Aqua Jr. & Papa, 2001)

Setenta éguas foram divididas em seis grupos para verificação do efeito da dose inseminante e do local de deposição do sêmen na fertilidade utilizando sêmen congelado. Sêmen de um garanhão de fertilidade comprovado foi congelado em palhetas e mini-palhetas. As éguas foram inseminadas pré e/ou pós-ovulação num intervalo máximo de 6 horas nos seguintes grupos: G1 = 50×10^6 spz pré-ovulação (1 mini palheta 0,25 ml), corpo do útero; G2 = 50×10^6 spz pré-ovulação (1 mini palheta 0,25 ml), ápice do corno; G3 = 150×10^6 pré e 150×10^6 pós-ovulação (1 palheta 0,5 ml), corpo do útero; G4 = 150×10^6 pré e 150×10^6 pós-ovulação (1 palheta 0,5 ml), ápice do corno; G5 = 800×10^6 pós-ovulação (8 palhetas de 0,5 ml) corpo do útero G6 = 400×10^6 pré e 400×10^6 pós-ovulação (8 (4/4) palhetas 0,5 ml), corpo do útero; G7 = 50×10^6 pré e 50×10^6 pós-ovulação (1 mini palheta 0,25 ml), corpo do útero. E apresentaram as seguintes taxas de prenhes conforme figura 10.

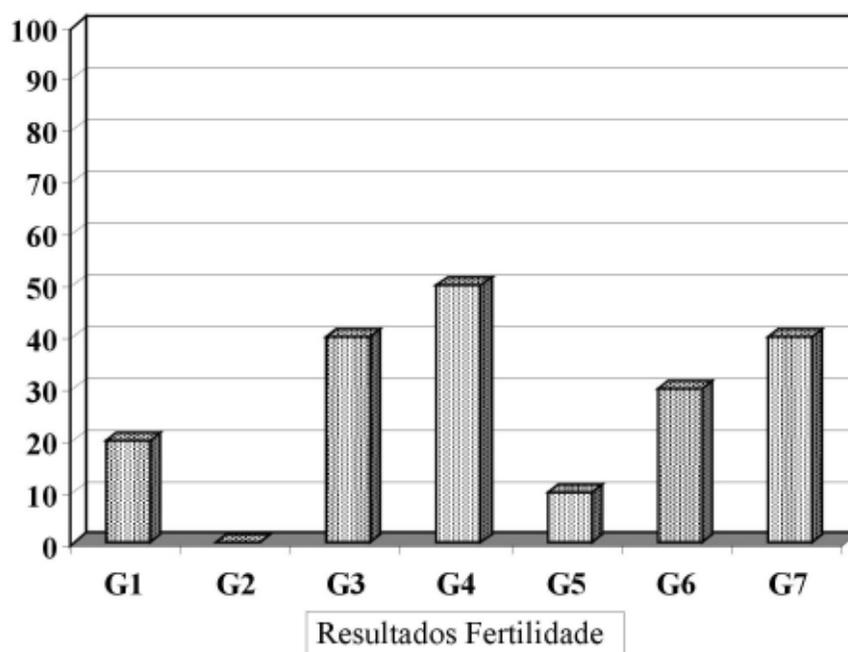


Figura 10. Porcentagem de prenhes dos 7 diferentes protocolos de inseminação ($P > 0,05$).

Em relação as taxas de prenhes obtidas concluí-se que doses inseminantes com baixas concentração espermáticas podem apresentar índices de fertilidade semelhantes a tradicionalmente utilizada e que inseminações pré e pós-ovulação tendem a resultar em índices de gestação mais consistentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Carvalho, G.A., Zahn, F.S., Melo, C.M., Alvarenga, M.A. Dell'Aqua Jr., J.A., Papa, F.O. Effects of different extenders on sperm parameters and fertility of equine cooled semen. 4th International Symposium on Stallion Reproduction October 21-23, 2005, Hannover, Germany, 2005 *no prelo*.
- Macedo, L.P., Papa, F.O., Gomes, G.M., Melo, C.M., Oliveira, J.V., Dellaqua Jr., J.A. Effect of antibiotics on viability and fertility of equine semen cooled to 5°C, 4th International Symposium on Stallion Reproduction October 21-23, 2005, Hannover, Germany, 2005 *no prelo*.
- Melo, C.M., Zahn, F.S., Martin, I., Alberti, K., Orlandi, C., Siqueira Filho, E.R., Dell'aqua Jr, J.A., Alvarenga, M.A., Papa, F.O. Effects of cooling stallion semen for 24h before freezing on fertility rates, 4th International Symposium on Stallion Reproduction October 21-23, 2005, Hannover, Germany, 2005 *no prelo*.
- Dell'aqua Jr., J.A., Papa, F.O., Alvarenga, M.A., Zahn, F.S. Effect of packing systems and thawing temperature on spermatoc parameters and fertility rate of frozen equine semen. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.25 n.1, p.458-460, 2001.
- Harrison R.A., Vickers S.E. Use of fluorescent probes to assay membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.88, p. 343-352, 1990.
- Kenney, R.M., Bergman R.V., Cooper W.L., Morse G.W. Minimal contamination technique for breeding mares: techniques and preliminary findings. In: **ANN. CONV. AAEP.**, 1975. **Proceedings**. 21, 1975, p.327-336.
- Macedo, L.P. **Efeito de diferentes diluentes e antibióticos sobre a longevidade e fertilidade do sêmen equino refrigerado a 5°C**. Dissertação de Mestrado, 80p. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-UNESP-Botucatu-SP.
- Medeiros A.S.L, Gomes G.M, M.T Carmo, Papa F.O. Alvarenga M.A. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. **Theriogenology**, v.58, p273-276, 2002.
- Melo C.M., Zahn F.S, Martin I., Alberti K., Orlandi C., Siqueira Filho E.R., Dell'aqua Jr J.A., Alvarenga M.A., Papa F.O.. Effect of 24 h cooling period before freezing on equine semen fertility. 4th International Symposium on Stallion Reproduction October 21-23, 2005, Hannover, Germany, 2005 *no prelo*.
- Papa F.O., Zahn F.S., Dell'aqua Jr J.A. Cholesterol incorporation on equine sperm membrane: effects on post-thaw sperm parameters and fertility. **Theriogenology**, v.58, p. 237-240, 2002.
- Zuccari, C. E.S.N. **Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática equina**. Botucatu, 1998. Tese de Doutorado 121p. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-UNESP- Botucatu – SP.

TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM CAPRINOS E OVINOS

Gusmão, A.L.; Andrade Moura, J.C.

Escola de Medicina Veterinária da UFBA Av. Ademar de Barros, 500- Ondina - 40170110-Salvador –
Bahia - gusmao@ufba.br

1- INTRODUÇÃO

A caprino-ovinocultura é uma atividade pecuária de grande importância em todo o mundo, principalmente em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. Este fato não se deve a uma opção pela criação, a incentivos governamentais ou por uma tendência de mercado, mas pela incrível capacidade de adaptação destas espécies a diferentes condições de ambiente e a situações edafo-climáticas das mais rigorosas em todo o mundo.

A exploração destas espécies tem sido muito mais como uma atividade de subsistência, sem estabilidade em sua cadeia produtiva, sem interação com o desenvolvimento e sem uma filosofia de modernização da atividade. É carente em tecnologias avançadas, em investimento na formação e qualificação de mão de obra. Apesar das limitações existentes, tem havido uma crescente demanda por parte da iniciativa privada, por Biotécnicas da reprodução que visem o incremento da produtividade e da rentabilidade dos rebanhos e das unidades produtivas. Dentre estas Biotécnicas podemos ressaltar a sincronização de estros, a Inseminação artificial, o diagnóstico precoce de prenhez, transferência de embriões (TE), colheita de oócitos, a produção de embriões em laboratório, e a fertilização *in vitro*.), fixa-se o óstio caudal da cervix bilateralmente com duas pinças modelo Posi (FERRAZ & ELER 1999; SIMPLÍCIO et al. 2002).

Apesar do primeiro relato de sucesso com TE em caprinos ter ocorrido nos anos 30 (WARWICK et al. 1934), tentativas para ampliar esta tecnologia só foram descritas bastante tempo depois, com os experimentos de MOORE (1974), TERVIT et al.(1983), CHEMINEAU et al.(1986) e AGRAWAL & GOEL (1991),

2- VANTAGENS DA TE EM CAPRINOS E OVINOS

Dentre as várias vantagens da TE, podemos salientar o seu uso como forma de expansão de populações de animais com capacidade melhoradora, permite a introdução de raças exóticas com elevado potencial produtor, maximiza o controle de doenças, facilita e reduzem os custos de importação e exportação de germoplasmas superiores geneticamente.

3- LIMITAÇÕES DA TE EM CAPRINOS E OVINOS

A principal limitação da TE em pequenos ruminantes sempre esteve relacionada a dois fatores: os custos e a metodologia cirúrgica de colheita de embriões.

4- SUPEROVULAÇÃO

Em nossa rotina de trabalho, as cabras e ovelhas são tratadas de acordo com os protocolos esquematizados abaixo.

A) CABRAS

Dia	Data	Hora	Procedimento	Comentário
0			Colocar ½ CRESTAR	Esponja nas Receptoras
1				
11		6 manhã 6 tarde	2,5 mL folltropin 2,5 mL folltropin	
12		6 manhã 6 tarde	1,5 mL folltropin 1,5 mL folltropin	
13		6 manhã 6 tarde	1,0 mL folltropin + CIOSIN 0,2 mL 1,0 mL folltropin + CIOSIN 0,2 mL	Retirar Espon. Recept. + 300UI eCG Retirar CRESTAR a Tarde Doad.
14			Inseminação ou cobrição	
15		6 manhã	Inseminação ou cobrição	
16				Colocar novo CRESTAR
20		9 manhã	Retirar comida e água	Retirar CRESTAR e aplicar 0,4 ml CIOSIN a tardinha.
21		9 manhã	Colheita dos embriões	

B) OVELHAS

Dia	Data	Hora	Procedimento	Comentário
0		8	Colocar CIDR	Esponja nas Receptoras
1				
8				
9		18	Trocar CIDR	
10				
11		18	2,4 ml folltropin	
12		6 18	2,4ml folltropin 1,8ml folltropin	
13		6 18	1,8 ml folltropin 1,6ml folltropin	Remov. Esponjas Recept. + 400UI eCG
14		6	1,2ml folltropin + 200UI eCG 1,0ml (NOVORMON)	REMOVER O CIDR Pela manhã 6 h
15		6 manhã 18	Animais em jejum Inseminação Laparoscópica	Inseminação 36 horas após a retirada do CIDR
20		12 manhã	Retirar comida e água	Jejum Receptoras
21		8 manhã	Colheita dos embriões	

5- COLHEITA E AVALIAÇÃO DE EMBRIÕES CAPRINOS E OVINOS

No Brasil, em nosso ponto de vista, os trabalhos desenvolvidos por PEREIRA et al. (1991) e PEREIRA et al. (1998), foram de fundamental importância para a popularização da TE em cabras, e comparados a repercussão prática que o experimento de ELSDEN et al. (1978), representou para a vaca.

Na ovelha, o principal fator que limitava a utilização da TE em escala comercial, sempre foi a dificuldade de serem realizadas colheitas pelo método transcervical. Este fato tornava o método cirúrgico e o laparoscópico as únicas opções de colheita. Estas técnicas traziam como grandes desvantagens a necessidade da aquisição de equipamento de elevado custo, e a formação de aderências do sistema genital das doadoras, reduzindo o número de colheitas efetuadas em uma mesma fêmea, e em algumas vezes até comprometendo a vida reprodutiva futura deste animal. Recentemente, foi possível superar esta grande barreira, tornando a colheita transcervical uma rotina em nosso laboratório. (SILVA, et al. 2001; SILVA et al. 2004)

Um cateter Nelaton - Robinson, (Ruesch, Nº Ref. 220500 para cabra e Nº Ref. 238500 para ovelha), desprovida de balão, (SUYADI et al. 2000, SILVA et al. 2004), é introduzido no útero com o auxílio de um mandril, após a fixação do óstio cervical com pinças de Posi. O meio de colheita é infundido através de seringa bico para cateter, em um volume que varia de 10 a 30 ml por vez, e em nossa rotina utilizamos um total de 250 ml de meio por corno uterino. A colocação no fundo de saco vaginal das ovelhas de 200 µg Misoprostol (Cytotec®) três a cinco horas antes da colheita, facilitou a passagem do cateter. (SILVA et al. 2004).

Recentemente foi descrito por SALLES (2002) e GUSMAO et al.(2002), um método que permite a colheita de embriões de cabras e ovelhas, pela via transcervical, usando um circuito fechado. Uma alternativa ao cateter Nelaton – Robinson, com custo mais baixo e acesso mais fácil, seria as sondas naso - gástricas Nº10 ou 12, utilizadas em medicina humana. Entretanto, estas possuem uma entrada que só permite a utilização de seringas, e são muito moles e flexíveis, dificultando a manipulação e possibilitando que se dobrem no interior do útero.

O lavado é recolhido e mantido em temperatura ambiente (25 a 30°C), até o momento da transferência.

A classificação dos embriões de caprinos e ovinos segue o mesmo padrão descrito para bovinos, de acordo com o método relatado por LINDNER & WRIGHT(1983) e baseado nas normas da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS).

6- TRANSFERÊNCIA

A transferência é realizada pelo método semi-laparoscópico, utilizado-se uma mistura de ketamina e xilazina para sedação e após a exteriorização do corno uterino ipsilateral à ovulação o embrião é injetado no útero com o auxílio de um unopet.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, K.P., GOEL, A.K. Production of elite jaminapari kids by embryo transfer technology. **Indian J. Anim. Reprod.** v. 12, p. 78-80, 1991.
- CHEMINEAU, P., PROCUREUR, R., COGNIÉ, Y., LAFEVRE, P.C., LOCATLLI, A., ELSDEN, R.P., NELSON, L.D., SEIDEL, G.E., Jr. Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotrophin. **Theriogenology**, v.9, p. 17-26, 1978.
- FERRAZ, J. B. S.; ELER, J. P. A Importância da Correta Avaliação do Patrimônio Genético antes da Transferência de Embriões. **Arquivo da Faculdade de Veterinária UFRGS**, Porto Alegre, v.27, n.1, p. 101-109, 1999.
- FLORES-FOXWORTH, G., MAC BRIDE, B.M., KRAEMER, D.C., NUTI, L.C. A comparison between laparoscopic and transcervical collection and transfer in goats. **Theriogenology**. v. 37, p. 213, 1992
- GUSMÃO, A.L., RESENDE, J., OLIVEIRA, J.V.L., RIBEIRO FILHO, A.L., ANDRADE MOURA, J.C., SILVA, J.C., BRAGA, W. Modificação da técnica de colheita transcervical de embriões de cabras com um cateter disprovido de balão. In: Cong. Norte/Nordeste de Reprod. Anim., v.1 p.101-103, 2002.
- LINDNER, G.M., WRIGHT, R.W. Bovine embryo morphology and evaluation. **Theriogenology**. v.20, p.407-416, 1983.
- MOORE, N.W. Multiple ovulation and ovum transfer in the goat. **Proc. Austral. Sci. Anim. Produc.** v.10, p.246-249, 1974.
- NOWSHARI, M.A., BECKERS, J.F., HOLTZ, W. Superovulation of goats with purified pFSH supplemented with defined amounts of pLH. **Theriogenology**. v.43, p.797-802, 1995.
- PEREIRA, R.J.T.A., LIMA, P.F., SILVA, M.A.V., WISCHRAL, A., OLIVEIRA, M.A.L. Colheita de embrião caprinos por via transcervical. **Cong. Brasil. Reprod. Anim.** v.2, p.314, 1991 (Abstr.)
- PEREIRA, R.J.T.A., SOHREY, B., HOLTZ, W. Nonsurgical embryo collection in goats treated with prostaglandin F₂ α and oxytocin. **J. Anim. Sci.** v. 76, p. 360-363, 1998.
- SALLES, H.O. **Circuito fechado para colheita de embriões em caprinos**, www.cnpc.embrapa.br/embrioes.htm
- SILVA, J. C.; MELLO, A.; RESENDE, J.; OLIVEIRA, J. V. L.; ANDRADE MOURA, J. C.; RIBEIRO FILHO, A. L.; COELHO LIMA, M. C.; BONINA, G.; GUSMÃO, A. L. Superovulação de Ovelhas Santa Inês Através de uma única Injeção Subcutânea de FSH Dissolvido em Polivinilpirrolidona. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 24., 2001, Belo Horizonte. **Anais ...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2001, p.500.
- SILVA, J. C.; QUINTELA, A.; ANDRADE MOURA, J. C.; RESENDE, J.; GORDIANO, H.D; MARTINS, L.P.; CHALHOUB, M; RIBEIRO FILHO, A. L.; GUSMÃO, A. L. Avaliação da Colheita Transcervical De Embriões Ovinos da Raça Santa Inês. **Acta Scientiae Veterinariae**. v32, p.90, 2004.
- SIMPLICIO, A.A., SALLES, H.O., SANTOS, D.O. Transferencia de embriões nos pequenos ruminantes domésticos. In: Cong. Norte/Nordeste de Reprod. Anim., v.1 p. 17-27, 2002.
- SUYADI, B. SOHNREY, HOLTZ, W. Transcervical embryo collection in Boer goats. **Small Rum. Research**. v. 36, p. 195-200, 2000.
- TERVIT, H.R., GOOLD, P.G., MCKENZIE, R.D., CLARKSON, D.T. Techniques and success of embryo transfer in Angora goats. **New Zeal. Vet. J.** v.31, p. 67-70, 1983.
- WARWICK, B.L., BERRY, R.O., HORLACHER, W.R. Results of mating rams to Angora female goats. **Proc. Amer. Sci. Anim. Produc.** p.225, 1934.

CONFERÊNCIAS

HISTÓRICO DOS 20 ANOS DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES (1985-2005)

Mara Iolanda Batistella Rubin

MV. MSc. DMV - Laboratório de Embriologia Animal, Bloco 4 - Ala Sul - Hospital Veterinário, Universidade Federal de Santa Maria 97.105-900 Santa Maria/RS – Brasil
mararubin@smail.ufsm.br

Ao ser desafiada para a tarefa de sintetizar os 20 anos da nossa Sociedade pelo Dr. Alvarenga, presidente da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE), pensei no que seria importante relatar aos jovens e como prestar uma homenagem aos fundadores. Assim, vou descrever os fatos que acredito tenham sido marcantes nesta trajetória.

A SBTE nasceu para representar os interesses dos seus associados e para ser um agradável fórum de debates em transferência de embriões (TE). Nosso agradecimento pelo empenho do colega Assis Roberto de Bem, que assumiu temporariamente a Sociedade até que o primeiro presidente fosse eleito, assim foi possível a nossa organização e crescimento. Entretanto, a SBTE tecnicamente não nasceu em 1985, quando o Presidente e os membros da diretoria foram eleitos, a história da transferência de embriões no Brasil iniciou alguns anos antes.

Se pensarmos sobre os passos dos pioneiros, há mais de 20 anos, vamos lembrar que estavam presentes em nossas rotinas os equipos de silicone autoclaváveis, da preparação dos meios para coleta dos embriões, dos vidros de relógio, das placas de Petri, também de vidro e siliconizadas, das transferências cirúrgicas e da sincronização de cio somente com prostaglandina. É uma recordação cinematográfica. Em contraste, hoje estamos utilizando produtos totalmente descartáveis, meios prontos, transferência direta, implantes de progestágenos, ultra-sonografia, além de transporte e telecomunicação eficientes.

A primeira tentativa de TE no Brasil, foi efetuada com embriões frescos da raça holandesa transportados via intercontinental, em 26/04/1977, na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), em Santa Maria/RS, sob a orientação do Prof. Dr. Joachim Hahn, da Escola Superior de Medicina Veterinária de Hannover/Alemanha [1]. Infelizmente os embriões transferidos não resultaram em gestações. Adicionalmente, 5 doadoras foram superovuladas sem sucesso.

Exatamente um ano após, Walter Antonio de Pádua Becker que era professor na UNESP-Jaboticabal/SP desde 1975, iniciou a trabalhar com TE na Alemanha (1978). Walter veio ao Brasil e, no final de maio de 1978, recebeu o Prof. Hahn no aeroporto de Guarulhos (SP), com embriões da raça Fleckvieh transportados em uma garrafa térmica. Em março de 1979, nasceram no Brasil, os primeiros bezerros de TE provenientes de embriões importados [5,25]. Ariano, (19/03/1979), o macho, veio a ser um doador de sêmen e a bezerra Odisséia foi doada ao então presidente do Brasil, João Batista Figueiredo. Além de competente cirurgião, Walter era conhecido por sua personalidade dinâmica. Sua visão empresarial, antevia a projeção da “Agropecuária Lagoa da Serra” como uma das empresas de inseminação artificial mais importantes para expansão genética bovina, não somente no Brasil, mas

também no exterior. Ele também implantou o serviço de TE [25] junto a “Lagoa da Serra”, onde foi diretor-superintendente. Walter teve como colaboradores colegas que hoje se destacam e que auxiliaram a expandir o uso da TE no Brasil como Douglas Brasil Gaetti, Claudemir de Carvalho e Carlos Fernando Marins Rodrigues.

Após as primeiras tentativas, o programa pioneiro de coleta e transferência de embriões bovinos no Brasil foi conduzido com sucesso no início de 1979 pela equipe coordenada pelo colega de São João da Boa Vista/SP, Jorge Nicolau Neto. Formado na USP/SP em 1976, ele seguiu seus estudos nos Estados Unidos sob orientação dos Prof. Dr. Robert Baker e Dr. John Hasler, a partir de janeiro de 1977.

Em janeiro de 1979, um de seus programas de TE resultou no nascimento da “Eureka” [28], a primeira dos quatro bezerros obtidos após transferência de seis embriões da raça Holandesa vermelha e branca, nascida na Associação São Pedro de Pesquisa Científica, de Sorocaba/SP [25], amplamente noticiada em outubro do mesmo ano [18]. O pioneirismo de Jorge consolidou-se mais uma vez em 14/03/1984, com o nascimento da primeira bezerra proveniente de embrião congelado nascida no Brasil [9].

A experiência de Jorge Nicolau soma hoje, mais de 90.000 embriões transferidos. Ele participou ativamente de comissões estaduais e federais, tratando da legislação do mercado de embriões. Em 1995, como resultado de seu sucesso profissional, concretizou mais uma parte de seu projeto de vida: montou e dirige sua própria central, a prestigiosa Embrionic, sediada em São João da Boa Vista/SP, onde também são oferecidos serviços de sexagem de embriões. Por sua competência, foi convidado em abril de 2005 pelo governo da República Popular da China, para coordenar um programa de tecnologia de embriões naquele país. Os membros da SBTE têm orgulho de participar da mesma sociedade do Jorge, um desbravador e um exemplo a ser seguido. Jorge é o colega carismático que nos agracia com sua presença nas reuniões da SBTE trazendo consigo senso de humor, experiência, humildade e princípios éticos.

Em 27 de maio de 1979, na fazenda Campo Verde Empreendimentos Rurais Ltda, no município de Antonio Gonçalves (Senhor do Bonfim), no estado da Bahia foram realizadas com sucesso as primeiras coletas e transferências de embriões da raça Nelore, que se tem notícia no mundo. Das dezessete gestações nasceram a termo, cinco bezerros [8,14]. Os veterinários Drs. Roberto Mozer de Abreu e Aurelino Menarim Junior, responsáveis pelo programas de TE, sob a supervisão dos Drs. Peter Elsdén (Austrália) e Larry Nelson (USA), compartilharam em 1980, o sucesso de suas atividades com o nascimento dos primeiros bezerros da raça Nelore no mundo* [25,26].

Na primavera de 1979, ainda sob a orientação do Prof. Dr. Hahn, a equipe da UFMS-Santa Maria/RS, liderada por Carlos Antonio Mondino Silva, da qual me orgulho de ter participado como estagiária, introduzia a técnica da TE no Rio Grande do Sul, em conjunto com a equipe da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, liderada por Ricardo Macedo Gregory. Na época, José Luis Rodrigues, recém-formado, também participava das atividades de TE. Todos nós, então ou mais tarde, concluímos o doutorado em Hannover-Alemanha e agradecemos nossos orientadores alemães pela dedicação e ensinamentos que contribuíram para nossa formação científica.

Prof. Hahn trouxe em 08/11/1979 15 embriões da raça Fleckvieh [25] que infelizmente, devido a

problemas de transporte, foram transferidos somente seis, após 36h da coleta na cidade de Neustadt a.d. Aisch E.V. Destes, obteve-se uma única gestação. Adicionalmente, a superovulação de dezoito doadoras de três diferentes raças resultou em treze gestações [22], sendo que o primeiro bezzero do RS nasceu em 05/08/1980 [33].

No estado de São Paulo, Roberto Jorge Chebel, de Campinas, contribuía também com seu espírito dinâmico e empreendedor para a aplicação da biotécnica de TE. Por sua grande experiência, foi orientador de inúmeros estudantes e colegas em estágios prático-profissionais, entre estes, vários colegas da SBTE. Chebel formou-se na USP em 1972 e foi um profissional competente do qual todos nós temos orgulho em tê-lo tido como conselheiro e amigo. Chebel era carismático, sua voz cativante e ao mesmo tempo firme, fazia a sala de nossas reuniões vibrar. Estava sempre rodeado pelos colegas que buscavam o seu conhecimento.

Em março de 1985, Brasília/DF sediava o Curso Internacional de Transferência de Embriões promovido pela “Stracta Genética e Reprodução” dirigida por Pedro Ivan Guimarães Rogêdo que tinha à sua frente, a competência de veterinários como Carlos Alberto Zanenga, Aurenilda Silva, Roberto Raulino Lamego e Aurelino Menarim Júnior. Estes profissionais, juntamente com pesquisadores do Cenargen/Embrapa: Assis Roberto de Bem e Theodoro Romano Vaske, conduziram durante alguns anos, trabalhos e pesquisas conjuntas, na Central de Transferência de Embriões.

Neste evento, o Dr. Peter Elsdén, na época em Fort-Collins, Colorado/USA e o Dr. Reuben J. Mapletoft, da Universidade de Saskatchewan/Canadá, proferiram palestras que abrilhantaram o curso. A experiência e as sugestões dos dois cientistas, membros da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) nos estimulou a reunir esforços para a criação da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões (SBTE) pelo que somos e seremos sempre gratos.

Entre os palestrantes brasileiros estavam Assis Roberto de Bem e os professores João Soares da Veiga (USP-São Paulo/SP), Francisco Megale (UFMG-Belo Horizonte/MG) e Cláudio Alves Pimentel (UFPEl-Pelotas/RS).

Assim, **em 25 de abril de 1985 nasceu a SBTE.**



Participantes do Curso de Transferência de Embriões
Fazenda Stracta Genética e Reprodução - Abril/1985. Brasília/DF

Na lista abaixo estão citados os participantes da primeira reunião, com o objetivo de organizar a SBTE. Nessa reunião o colega Assis Roberto de Bem foi eleito Presidente temporário da SBTE.

Quadro 1. Lista dos fundadores da SBTE (Abril, 1985)

Antonio Renato Pacheco	Nilson Antonio Azevedo
Assis Roberto de Bem – Presidente	Oziel Buzutti
Carlos M. Jaume Eggleton	Paulo Bayard Dias Gonçalves
Cezar Roberto Esper	Paulo Eymard Correa Loureiro
Evâneo Nogueira Coelho	Peter Elsdén
Guenter Kluge	Raul Gastão Muciolo
Jairo Pereira Neves	Roberto Raulino Lamego – Secretario
Jorge José Bangel Junior	Teodoro Romano Vaske**
Leônidas Antonio Chow Castilho	Tirzá Portela de Andrade
Luiz Eustáquio Lopes Pinheiro	Vicente Otávio Fonseca
Mara Iolanda Batistella Rubin	Antonio Carlos Batista**
Marc Roger Jean Marie Henry	Carlos Alberto Zanenga**
Marília Viviane de Oliveira-Simões	Francisco Aloisio Fonseca**
Nei Queiroz Silva	Heraldo Gomes Rangel**
Neuci Adalton Vinha	José Antonio Visintin**

**Colaboradores voluntários

Em 18 de Julho de 1985, por ocasião do VI Simpósio Nacional de Reprodução Animal, em Belo Horizonte/MG, ocorreu nova reunião na qual a criação da SBTE foi **referendada por 14 colegas** e a primeira diretoria empossada tendo como Presidente Luiz Eustáquio Lopes Pinheiro, da UNESP de Jaboticabal/SP.

Quadro 2. Lista dos participantes da reunião que referendou ata de fundação da SBTE (Julho, 1985).

Luiz Eustáquio Lopes Pinheiro - Presidente	Carlos Alberto Zanenga
Cezar Roberto Esper - Vice-presidente	Carlos Fernando Marins Rodrigues
Carlos Fernando Marins Rodrigues – Secretário	Carlos Alves Mendes
Irineu Machado Benevides Filho – Tesoureiro	Claudemir de Carvalho
Assis Roberto de Bem	Evâneo Nogueira Coelho
Aurelino Menarim Júnior	Mara Iolanda Batistella Rubin
Aurenilda Silva	Takeshi Morita

Um fato importante foi o primeiro relato de produtos caprinos nascidos no Brasil, feito por Jaume & Bruschi (1985), noticiado no “Jornal O Estado de Minas”, em 26 de Outubro do mesmo ano [17]. Ainda em 1985, Jose Luiz Rodrigues, da UFRGS-Porto Alegre/RS, recebeu o Prêmio de Jovem Cientista patrocinado pelo CNPq, graças aos trabalhos desenvolvidos com o colega Ricardo Macedo

Gregory. Mais tarde, José Luiz representou nossa sociedade junto a diversas instituições de ensino e pesquisa, no Brasil e no exterior.

A tecnologia de embriões no início da década de 80 ainda era utilizada por poucos produtores, no entanto o número de profissionais atuantes somados aos iniciantes na área, ultrapassava 20 em 1986, quando se realizou em Jaboticabal/SP, a primeira reunião da SBTE. Os fundadores da Sociedade e os seus convidados tiveram a oportunidade de apresentar experiências e artigos científicos destacando-se entre outros, os primeiros ensaios sobre a maturação *in vitro* de oócitos bovinos por Garcia JM (1986) e colaboradores da UNESP/Jaboticabal/SP.

Na época (1986), o Centro Nacional de Recursos Genéticos (Cenargen/Embrapa) em Brasília/DF, através dos colegas Theodoro Romano Vaske e Assis Roberto de Bem, além das atividades de pesquisa, torna-se referência no treinamento de colegas e acadêmicos. A equipe do saudoso De Bem obteve em 1986 os primeiros gêmeos idênticos da espécie bovina por bipartição, no Brasil. À medida que o tempo passou, as equipes foram consolidando seu trabalho na USP-São Paulo/SP, UNESP-Botucatu/SP, UFV-Viçosa/MG, ao lado da UNESP-Jaboticabal/SP, UFRGS-Porto Alegre/RS e UFSM-Santa Maria/RS.

Neste mesmo ano, Leônidas Chow Castilho e colaboradores [6], em Minas Gerais, realizaram experiências com embriões a fresco, em caprinos. Em seguida, no Paraná [11] e Pernambuco [31], foram desenvolvidos trabalhos similares. No Brasil, estes pesquisadores alcançaram pioneiramente o nascimento de produtos caprinos através da TE.

Em 1987, fomos para Belo Horizonte/MG. A SBTE tornava-se numerosa, adotava irmãos, como uma família. Realizamos intenso trabalho com a apresentação/discussão de artigos. Podemos relembrar o agradável ambiente dos jantares de confraternização. Conforme previamente estabelecido, houve eleição e a nova diretoria programou um evento internacional para 1988.

Em Concórdia/SC, na área de suínos, os colegas Ivo Wentz, Isabel Regina Scheid, Ingon Wentz e Joice Stein Stefani, sob orientação do Prof. Dr. Wolfgang H. Holtz de Göttingen/Alemanha desencadearam nova frente de pesquisa com coleta, TE e gestações, divulgada nos anais VII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal de Belo Horizonte/MG em 1987.

Sob nova gestão, em 1988, a cidade de Santa Maria/RS sediou a 3ª reunião, contando com a presença dos colegas Carlos Munar, da Argentina, e Blanca Rusiñol, do Uruguai. A inovação ficou por conta do uso da ultra-sonografia na avaliação de doadoras e receptoras bovinas, apresentada por Chebel. No Cenargen/Embrapa, Farinasso e colaboradores haviam transferido 10 hemi-embriões e congelado outros 20 embriões das raças Roraima selvagem e, em jumentos. Os embriões divididos produziram uma gestação e 17 dos 20 embriões congelados resultaram em 4 gestações [7], marcando o pioneirismo da equipe no Brasil, com o nascimento da potranca “Ânima” em novembro de 1988. Na UFRGS-Porto Alegre/RS, a equipe coordenada por Ricardo Macedo Gregory relatava suas primeiras coletas de embriões em ovinos. Deve-se ressaltar aqui que Selaive-Villaroel & Mies Filho, também da UFRGS-Porto Alegre/RS, já haviam, em 1979, obtido sucesso com a coleta e TE em ovelhas Corriedale [23].

Em 1989, a 4ª reunião ocorreu em Porto Alegre/RS, onde tivemos o privilégio da presença do Prof. Dr. David Whittingham, pioneiro no congelamento de embriões, que abordou aspectos da criopreservação em diferentes espécies de mamíferos. Destacaram-se nesta área os artigos na espécie

caprina, apresentados pelo colega Marco Antonio Lemos de Oliveira da UFRPE (PE) e, sobre TE na espécie equina por João Junqueira Fleury, de São José do Rio Pardo (SP).

Nessa reunião, foi contagiante a palestra do colega Fleury, formado em 1984 pela UNESP-Jaboticabal/SP. Em 1985, Fleury passou 6 meses com o Prof. Dr. Squires na Universidade do Colorado em Fort-Collins/USA atuando com TE em equinos. Em 1986, realizou as primeiras transferências no Brasil e dessa data até dezembro de 2002, realizou mais de 4.000 transferências, sendo considerado um dos profissionais com o maior número de coletas/TE nesta espécie no mundo, deixando uma marca de referência nacional e internacional. Mesmo enfermo repassou com empenho, à esposa Perla Fleury e seus colaboradores, grande parte da sua experiência, sendo responsável pelo treinamento de muitos profissionais que atuam com a TE em equinos no Brasil. De sua competência profissional nos fica um legado de exemplo e dedicação.

As atividades científicas da reunião em Porto Alegre foram compartilhadas com jantares preenchidos com atividades artísticas, principalmente musicais.

Em 1990, viajamos para Brasília/DF, onde fomos apresentados à clonagem por transferência nuclear, pelo colega Lawrence Smith que antevia seu uso em larga escala para a produção de animais geneticamente idênticos com aplicações na pesquisa científica e na área comercial.

No ano de 1991, na reunião em Curitiba/PR, sob a presidência de Menarim, a diretoria convidou o Dr. Robert K. Baker da "Select Embryos Inc". Sua palestra nos motivou a participar do exercício de avaliação de embriões bovinos frescos e congelados, apresentados em diapositivos. A ênfase temática foi a sexagem, a produção *in vitro* de embriões bovinos e o nascimento em 1990, da primeira bezerra por congelamento ultra-rápido no Brasil. Recordo-me das atividades sociais, intensas e muito animadas.

Na gestão seguinte, o colega Enoch Borges de Oliveira Filho (1992), como nosso Presidente, alertava para a globalização da economia. Ele acreditava que o mercado internacional de embriões indicava que deveríamos nos preocupar com estatísticas corretas para o planejamento de transações comerciais. Nesse evento, os temas apresentados orientaram-se na mesma direção, com destaque para a sexagem fetal em bovinos e para os embriões caprinos congelados, importados da França para o Ceará [30].

Em 1993, a cidade de Ribeirão Preto/SP sediou o encontro da SBTE. Na ocasião, foi comunicada a inclusão de nossa sociedade como co-filiada da IETS, o que nos garantiu a participação em todas suas atividades técnico-científicas. Também nesse ano, em outubro, a equipe da UNESP-Jaboticabal/SP, coordenada por Enoch de Oliveira Filho, consagrou-se mundialmente com as três primeiras gestações de *Bos taurus indicus* através da produção *in vitro*, resultando no nascimento de três bezerros, em outubro do mesmo ano. Com isso, nosso país colocou-se na vanguarda biotecnológica na espécie zebuína.

Enquanto isto, na UNESP-Botucatu/SP, os colegas Cezinande de Meira e Marco Antonio Alvarenga, consolidavam-se como referência na TE em equinos, com o relato do nascimento de potros em 1991, utilizando embriões congelados [12].

Em 1994, a reunião aconteceu em Campinas/SP, período em que a SBTE passou por dificuldades administrativas e financeiras. Mas graças à dedicação e à competência da equipe coordenada pelas colegas Sonia Maria Gaspar Paggiaro e Vera Fernanda Hossepian de Lima, nossa sociedade recuperou

a saúde financeira e administrativa, e foi reconduzida fortalecida, ao seu destino original de progresso e sucesso.

Nessa reunião, as equipes dos colegas Eunice Oba (UNESP-Botucatu/SP), Rubens Paes de Arruda (FMVZ-USP-Pirassununga/SP), José Fernando Garcia, Pietro Sampaio Baruselli e José Antonio Visintin (FMVZ-USP/SP) abrilhantaram o evento com um novo foco: a espécie bubalina. Em bovinos, o isolamento e cultivo de folículos pré-antrais de fetos, por José Ricardo Figueiredo, já indicava novas perspectivas para a pesquisa. Também em 1994, a equipe do Cenargen-Brasília/DF, anunciava o nascimento de “Vitro”, o primeiro bezerro puro de origem da raça Nelore [20], obtido através da PIV***.

Recordamos com saudade do colega Altino Pires de Almeida Filho que efetuou uma excelente palestra sobre “Mortalidade embrionária em vacas repetidoras de cio”. Altino estudou em Israel, onde realizou sua tese de doutorado. Ele desenvolveu atividades em 8 diferentes estados que lhe garantiram vasta experiência e reconhecimento, como um dos mais importantes profissionais da TE no Brasil.

Com 10 anos de idade, no final da infância e entrando na adolescência, fomos para a reunião de Águas de Lindóia/SP, em setembro de 1995. Pensávamos não somente nas atividades do campo, mas também na pesquisa básica, como a sexagem de espermatozoides por centrifugação em gradientes de densidade. Vera Fernanda Hossepian de Lima e sua equipe (UNESP-Jaboticabal/SP) levaram nossa imaginação ao futuro, nos colocando em contato com uma realidade até então distante.

Na reunião de 1996, em Canela/RS, tivemos o privilégio de ouvir as palestras do Dr. John F. Hasler sobre a OPU/PIV comercial nos Estados Unidos e do Dr. H. Niemann sobre criopreservação, em bovinos. Num ambiente típico europeu, também foram abordados os avanços alcançados na pesquisa da dinâmica folicular e da superovulação em bovinos por Gabriel Bo, nosso “membro honorário”, participante ativo de nossa Sociedade, contribuindo sempre com sua experiência e competência nos eventos.

Em fevereiro de 1997, quando do nascimento da Dolly, o Cenargen/Embrapa, já com suas metas estabelecidas, estava iniciando as atividades de clonagem, fruto em parte do trabalho do colega De Bem, que já tinha ao seu lado, muitos colegas que hoje compõem a grande equipe Cenargen. De Bem faleceu em setembro do mesmo ano, mas deixou o alicerce técnico-científico tanto como professor (Lages/SC) quanto como pesquisador, participando da implantação do projeto “Banco Brasileiro de Germoplasma Animal” no Cenargen. O seu questionamento sobre a vida retratava sua pessoa, De Bem expressava sempre seu amor pela família e pelos amigos.

Neste mesmo ano, José Luiz Rodrigues foi eleito membro do Comitê Diretor da IETS, sendo o primeiro brasileiro a ocupar esta posição. O evento, em Foz do Iguaçu/PR contou com as palestras dos Drs. M Wheeler (USA) e G Brem (Bavária-Alemanha) que nos presentearam com os mais recentes impactos da transgenia e das células tronco sobre a produção animal.

Um marco importante no evento de Atibaia/SP, em 1998, foi a apresentação do colega José Eduardo Portela Santos que demonstrou a importância da nutrição sobre a capacidade reprodutiva, ampliando nossos conhecimentos e provocando uma grande reflexão no manejo nutricional de doadoras e receptoras. Na Ilha de Marajó/PA, Otávio Mitio Ohashi e sua equipe definiram as diferenças ovarianas entre a vaca *Bos taurus indicus* e a *Bubalus bubalis*, ressaltando que a búfala apresenta menor população

folicular.

Continuando nossas viagens pelo Brasil, em 1999 fomos à Campos do Jordão/SP. A produção científica voltou-se para os avanços e limitações da produção *in vitro* de embriões eqüinos, com os trabalhos de Fernanda da Cruz Landim Alvarenga, que repassou sua experiência a partir da implantação desta área de pesquisa na UNESP-Botucatu/SP. Pela USP-Pirassununga/SP a equipe de Anneliese de Souza Traldi amplia o uso da criopreservação com embriões caprinos e ovinos produzidos *in vitro* x *in vivo* [27]. Em Sobral/CE, Simplicio e colaboradores relataram o interessante trabalho utilizando cabras pré-púberes como receptoras [24]. Nesta reunião, novas perspectivas surgiram com os trabalhos que abordaram o uso de éguas gestantes como doadoras de ovócitos e, de um novo protocolo de superovulação na égua, abordados pela equipe dos colegas da UNESP-Botucatu/SP [2], associados à equipe do Dr. Ed L. Squires da Universidade do Estado do Colorado. Esse novo protocolo poderá produzir importante expansão da TE em eqüinos. Um outro tópico interessante foi o estudo da dinâmica folicular em búfalas relatado pela equipe de Baruselli [4]. O clima, o ambiente da serra e do evento estiveram agradabilíssimos.

Em 2000, na reunião em Rio Quente/GO, constatou-se que com o incremento da aspiração folicular/produção *in vitro* de embriões bovinos, esta técnica passou da esfera laboratorial para a comercial, destacando-se em São Paulo, as atividades de Carlos Marins Rodrigues (Gertec Embriões Ltda) com a UNESP-Jaboticabal/SP; de Carlos Alberto Zanenga (MS); da VITROGEN dirigida pelos colegas André Dayan, Yeda e Michele Watanabe e, em Brasília, a equipe do Cenargen (Maurício Peixer, Margot A Nunes Dode e Rodolfo Rumpf), que desenvolveram uma série de novas investigações que contribuiram para o progresso nesta área.

Mais tarde, outras equipes e empresas passaram a atuar no setor como a Cenatte Embriões, In Vitro Brasil, Bio-Reprodução Animal, Klonembryo e Embryovitro, contribuindo para o melhoramento do rebanho brasileiro com recursos humanos integrantes da SBTE que tiveram sua formação, a grande maioria, aqui mesmo, no Brasil. Considerando essa nova realidade, nossa sociedade teve seu nome alterado, passando a chamar-se Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões. Esse evento em Goiás foi excelente, ao final do dia, as atividades passavam da esfera científica, para o lazer na estação das águas.

O século 21 iniciou com o importante avanço embasado no sucesso da Dolly (1997). As equipes do Cenargen-Brasília/DF, da UNESP-Jaboticabal/SP e USP-São Paulo/SP, alcançaram o objetivo a que se propuseram: a clonagem. Sob a coordenação do colega Rodolfo Rumpf, o Cenargen, definiu o início da clonagem no Brasil a partir de células embrionárias com o nascimento da bezerra Vitória, em 2001.

Na USP-Pirassununga/SP a equipe de Aníbal de Sant' Anna Moretti desenvolveu uma importante pesquisa de TE em suínos [10,29].

A reprodução assistida em caprinos recebeu um impulso alicerçado no trabalho pioneiro de Raimundo Pereira e colaboradores desenvolvido na Alemanha (1998), a coleta não-cirúrgica de embriões na cabra. O uso desta técnica se difundiu por todo o mundo. Também trabalham com caprinos e ovinos no Brasil, os colegas André Medeiros, Aurino Alves Simplício (CE), Carmen Iara Mazzoni González (PB), Joaquim Correa Andrade, Luiz Roberto D. de Medeiros, Oswaldo C. Gomes Neto, Orlando

Procópio e Gustavo Ferrer Carneiro (PE), Jefferson Ferreira da Fonseca (MG), Sérgio Nadal da Luz, Luiz Ernandes Kozicki (PR) [3], Jairo Pereira Neves (RS), Marcos Chalhoub C. Lima, Edimilson Almeida Machado e Alberto Lopes Gusmão (BA), que desenvolvem trabalhos de campo resultando na predominância do acesso não-cirúrgico na TE nessas espécies.

A implantação de novos laboratórios em diferentes instituições na década de 90, por Alceu Mezzalira da CAV-UDESC (Lages/SC) e Ligia M.C. Pegoraro da Embrapa Clima Temperado (Pelotas/RS) impulsionaram a criopreservação de oócitos/embriões e também de OPU/PIV em bovinos por Marcelo Marcondes Seneda (UEL-Londrina/PR). A continuidade das pesquisas desenvolvidas com zebuínos e búfalos desenvolvidas por Ciro Moraes Barros e José Luis M. de Vasconcelos (UNESP-Botucatu/SP) e Pietro Sampaio Baruselli (USP-Pirassununga/SP) estabeleceram conceitos e ganharam reconhecimento. Num passado recente, a equipe coordenada por José Carlos Deschamps (UFPel-Pelotas/RS), iniciou as atividades de TE em suínos.

Em janeiro de 2002, sob a presidência do colega Rodolfo Rumpf, a SBTE recebeu os membros da IETS na cidade de Foz de Iguaçu/PR. O trabalho e esforço conjunto da diretoria, com o presidente da IETS e do comitê local da IETS, coordenado por José Luiz Rodrigues, transformou o evento num marco importante nas reuniões da IETS. A opinião dos participantes sobre o simpósio foi unânime: congresso de altíssimo nível científico, grande número de participantes, excelente infra-estrutura, gastronomia variada e alto nível de programas turísticos. O evento revestiu-se de um fórum de discussão jamais visto, tanto na IETS quanto na SBTE. As equipes coordenadas por Rodolfo Rumpf e José Luiz Rodrigues, trabalharam muito, muito bem! Nesse evento, o maior de todos, tivemos a oportunidade de conhecer e/ou rever profissionais de renome, responsáveis por importantes pesquisas científicas como Ian Wilmut, KHS Campbell, WA Ritchie, RJ Mapletoft, S Leibo, J Hasler, P Bredbacka, B Avery, H Callesen, G Vajta, I Lewis, T Nagai, MB Wheeler, E Carnevale, EL Squires, CG Luvoni, BG Brackett, K Hinrichs, SJ Dieleman, H Niemann, E Wolf, G Seidel Jr., M Thibier, B Marquant-Le Guienne, P Humblot e G Bó, entre outros.

Ressaltando nossa evolução, pela USP/SP nasceu o clone “Marcolino”, o bezerro originado de células fetais diferenciadas [13] e a “Penta”, o primeiro clone obtido com células de um animal adulto na UNESP-Jaboticabal/SP [32]. No mesmo ano, a equipe de Mezzalira da CAV-UDESC-Lages/SC anunciou o nascimento de “Victra”, a primeira fêmea da América do Sul obtida com embrião vitrificado, produzido *in vitro* com oócito imaturo também vitrificado.

Em 2003, a equipe do Cenargen dava continuidade à clonagem gerando “Lenda”, bezerra holandesa obtida de células da granulosa. Na USP-São Paulo/SP, Maria Angélica Miglino desenvolvia estudos sobre a placenta de receptoras que gestaram embriões PIV e clones [15]. Neste ano, a SBTE convidou o colega Vilceu Bordignon que relatou o progresso e os desafios da clonagem animal por transferência nuclear. O evento e as praias de Beberibe/CE foram muito apreciados.

Em dezembro do mesmo ano, nasceu “Bela”, clone da raça Nelore obtida à partir de células adultas, produzida pela equipe da USP/SP. Em Porto Alegre, a colega Berenice de Ávila Rodrigues, pela UFRGS/RS, desenvolvia com pioneirismo a maturação e fecundação *in vitro* de oócitos de caninos domésticos no Brasil.

Em fevereiro de 2004, no Cenargen, nasceu a Vitoriosa, produzida a partir do clone Vitória e, em

setembro, a equipe da USP-Pirassununga/SP liderada por Flavio Vieira Meirelles, em parceria com a Vitrogen, anunciou o nascimento da bezerra Independência. Este resultado garantiu a continuidade do investimento técnico científico que, em março de 2005, resultou no nascimento dos três primeiros clones comerciais, mantendo nosso país na vanguarda da pesquisa biotecnológica. A equipe registrou até abril de 2005 o nascimento de 8 animais clonados [19].

Ainda em março de 2005, sob a coordenação de Rodolfo Rumpf, Leonardo Luiz da Silveira obteve para o Cenargen nova conquista: o nascimento de duas potrancas, Branca e Neve, por bi-partição embrionária. Este resultado, mais uma vez coloca o Brasil em evidência nos meios de comunicação mundial, provando cientificamente e transpondo mais uma, até então, limitante barreira reprodutiva na espécie equina. Nesta trajetória é importante ressaltar o trabalho do colega João Batista Figueiredo Costa Neto, nosso amigo “Bimbo”, que trabalhou com João Junqueira Fleury. Na atualidade, “Bimbo” é o colega com maior número de transferências no Brasil. Também é detentor de um protocolo eficiente para o congelamento de embriões equinos, obtendo mais de 55 gestações no período entre 1989 e 2005. O Brasil ocupa a segunda posição mundial no emprego da TE em equinos, com cerca de 3.500 transferências/ano [16]. Nos últimos 5 anos, algumas associações de raça reavaliaram seus critérios e modificaram os estatutos, permitindo a coleta e transferência de embriões. Este fato trouxe novas perspectivas para a pesquisa e para a “indústria do cavalo”.

Consolidando os métodos, em maio de 2005, na espécie bovina e por clonagem, nasceram Porã e Potira, as primeiras bezerras da raça Junqueira (Cenargen-Brasília/DF). Estes animais representam, além do avanço tecnológico, a chance de preservação da raça que se encontra em risco de extinção no Brasil, com rebanho inferior a 100 animais.

O nascimento dos dois primeiros búfalos (*Bubalis bubalus*) das Américas em Maio/2005, por OPU/PIV de embriões vitrificados obtido por Manoel Francisco de Sá Filho e colaboradores, coordenados pelo colega Pietro Sampaio Baruselli da USP-Pirassununga/SP, consolidou novas perspectivas para a pesquisa e comércio na espécie. Também por OPU/PIV a equipe obteve uma gestação com embriões frescos, cujo nascimento deverá ocorrer em Julho/2005.

O Brasil estabelece no presente século sua posição como líder mundial na produção de embriões bovinos por aspiração folicular (OPU) e fecundação *in vitro* (FIV).

A SBTE congrega profissionais de diversas áreas, envolvidos principalmente com a produção pecuária, que são solicitados por entidades governamentais de controle ou de pesquisa, bem como pela iniciativa privada, tanto para acompanhamento quanto para a execução de atividades técnicas e comerciais, atestando a eficiência de nosso trabalho. Membros de nossa Sociedade participam de comissões em diferentes instituições financiadoras da pesquisa nacional. Eles são responsáveis por importantes decisões que norteiam os rumos da pesquisa. Agindo com critério, honestidade e imparcialidade, deverão premiar os grupos que se dedicam à pesquisa direcionando os investimentos sem favorecimentos. Agindo assim, serão lembrados com o respeito e a admiração que merecem. Nossa comunidade também merece.

O sucesso não seria viável num período tão exíguo, não fosse a competência dos profissionais envolvidos e dos programas de investimentos desenvolvidos pelo Estado ou por empresas privadas, a exemplo do que ocorre na produção agrícola e na indústria farmacêutica. O desenvolvimento da

tecnologia de embriões, também não teria ocorrido sem o empenho, a dedicação e o espírito inovador encontrado nos nossos pioneiros: Jorge Nicolau Neto, Carlos Antonio Mondino Silva, Jorge Roberto Chebel, Walter de Pádua Becker, Teodoro Romano Vaske, Roberto Mozer de Abreu, Aurelino Menarim Júnior, Assis Roberto de Bem, Altino Pires de Almeida Filho, João Junqueira Fleury, João Roberto Basile e seus seguidores: Johannes Wopereis, Celso Martins de Medeiros, Múcio Teixeira Alvim, Evâneo Nogueira Coelho, José Luciano Reis Lara, Cyro da Porciuncula Dias da Costa, Douglas Brasil Gaeti, Carlos Fernando Marins Rodrigues, Aurenilda Silva, Carlos Alberto Zanenga, Milton Moreira, Célio Freitas, José Mendes de Oliveira, Sonia Maria Nogueira Gaspar Paggiaro, Jairo Luiz Ramos Neto, Agnaldo Barbosa Sena, José Abdo de Andrade Hellú, Takeshi Morita, Evandro Palhares Dias, Luis Felipe Cintra Mello, Merlison Figueiredo Pedroso, Miriam Vilela Duarte, Regivaldo Vieira de Sousa, Rubens César Pinto da Silva e Álvaro Leme, entre outros. Eles assentaram os alicerces da confiança e da credibilidade nas atividades da TE junto aos criadores e à comunidade científica, pavimentando o caminho da pesquisa básica e aplicada.

A SBTE chegou à maturidade pelo esforço de cada um de seus membros, de suas diretorias e assessores, consolidada no trabalho, na ética e no bom relacionamento entre os colegas que a fundaram e que a compõe. Dar oportunidade aos jovens de participar nos eventos foi uma decisão adequada que demonstra como resultado, a mente aberta da sociedade. A “Competição dos Estudantes”, apresentando seus primeiros passos na pesquisa, representa “O EMBRIÃO” dos pesquisadores do futuro, formando a base da comunidade científica que nos seguirá.

Por esta razão, acreditamos no crescimento da pesquisa científica no Brasil, especialmente através da continuidade do apoio e da dedicação dos profissionais, dos formandos, das empresas parceiras, das instituições governamentais e não governamentais, aos grupos emergentes, para que se possa, dessa forma, manter viva e atuante, no contexto científico e social, acima de tudo, preservando as relações humanas.

Dirigindo nosso olhar à foto dos anos 80, aos fundadores e aos que os seguiram com fascínio e paixão pelos animais, sintetizo, através desta imagem, todos os **estudos desenvolvidos com o congelamento de oócitos e embriões, com a OPU/PIV em *Bos taurus taurus*, *Bos taurus indicus* e *Bubalus bubalis*, com os novos conceitos sobre oócitos, embriões e superovulação em éguas, e mais recentemente, com a coleta não-cirúrgica de embriões ovinos e caprinos**, como resultado do “**conhecimento brasileiro**” que se agrega à ciência. Hoje podemos comemorar a maturidade da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões e, por este motivo, erguer um brinde ao sucesso de todas essas conquistas.

REFERÊNCIAS

1. AGRICULTURA DE HOJE. 1977. Bovinocultura: Rebanhos melhoram com a transferência de embriões. Bloch Editores S.A. **Revista Agricultura de Hoje**. Ano. III 27 (Jul): 55-57.
2. ALVARENGA M.A., CARNEVALE E.M., RAMIRES R.J., BOYAZOGLU S.E.A., LANDIM-ALVARENGA F.C., SQUIRES E.L. 1999. Utilização de éguas gestantes como doadoras de ovócitos. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**. 27 (Supl 1): 197.
3. ANDROUKOVITCH J.L., KOZICKI L.E., KOZEMJAKIM D.A., ABREU R.M., NUNEZ C. 2002.

- Coleta de embriões caprinos com sonda uretral humana. **Archives of Veterinary Science**. 7(1): 37-41.
4. BARUSELLI P.S., MADUREIRA E.H., VISINTIN J.A., OHASHI O.M., SOUZA J.S., PARMEGGIANI A., CAMPANILE G., ZICARELLI L. 1999. Resposta superovulatória e taxa de ovulação e de recuperação embrionária em Búfalas. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**. 27 (Suppl 1): 211.
 5. CANAL LAGO A. 2001. Pioneirismo e inovação. Perfil 30 anos. **Revista da Agropecuária Lagoa da Serra**. Sertãozinho/SP. Ano 4:11(Dez): 16. home page: www.lagoa.com.br
 6. CHOW L.A., VALLE M.A.G., COELHO S.G. 1986. Transferência de embriões em caprinos: relato de um caso. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. 10:279-290.
 7. FARINASSO A. DE FARIA C., MARIANTE A.D.A.S., DE BEM A.R. 1989. Embryo technology applied to the conservation of equids. In: Proceedings 2th International Symposium on Equine ET. (Banff:Canadá). **Equine Veterinary Journal** (Suppl 8):84-86.
 8. JORNAL DO BRASIL. 1979. Transferência de embrião já é rotina na Fazenda Campo Verde. In: *JORNAL DO BRASIL*. São Paulo/SP. 31/10/1979. 1º caderno: 16. homepage: jbonline.terra.com.br
 9. JORNAL DO BRASIL. 1984. Bezerro de um embrião congelado nasce em Sorocaba. São Paulo/SP **Caderno Negócios e Finanças**. 1º Caderno: 38. jbonline.terra.com.br
 10. LAGO V., VIANNA W.L., GAMA R.D., ROSSETO A.C., PINESE, M.E. MORETTI, A.S. 2005. Second estrus synchronization and precocious embryo viability in gilts by the use of gonadotrophin treatment. **Reproduction In Domestic Animals**. 40: 141-144.
 11. Manchete Rural. 1989. Multiplicação de cabras. 3(27): 55-56.
 12. MEIRA C. & ALVARENGA M.A. 1993. Potros nascidos de embriões congelados no Brasil. **ARS Veterinária**. 9(2): 181.
 13. MELLO M.R.B., CAETANO H.V.A., MARQUES M.G., PADILHA M.S., GARCIA J.F., MILAZZOTTO M., ASSUMPCÃO M.E.O.A., LIMA A.S., NICÁCIO A.C., MENDES C.M., OLIVEIRA V.P., VISINTIN J.A. 2003. Production of cloned calf from a fetal fibroblast cell line. **Brazilian Journal of Medical and Biology Research**. 36: 1485-1489.
 14. MENARIM Jr. A. 1992. Transferência de embriões – Uma longa Caminhada. In: **Anais da VII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões** (Jaboticabal. São Paulo, Brasil). 14-16 Ago: 2-4.
 15. MIGLINO M.A., VERECHIA F.T., VISINTIN J.A., MELLO, M.R.B., GARCIA J.M., YAMAZAKI W., AMBRÓSIO C.E., CARVALHO A.F., BRAGA F.C., SANTOS T.C., LEISER R., CARTER A.M. 2003. Placentação em bovinos clonados: arquitetura microvascular e estrutura. In: **Anais da XVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões** (Beberibe, Ceará). **Acta Scientiae Veterinariae**. 31(Supp): 484.
 16. O Embrião. 1997 a 2005. **Jornal da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões**: 1-22.
 17. O Estado de Minas. 1985. CABRAS sem limites. **Jornal. O Estado de Minas**. Belo Horizonte. 26 Out:6-7. home page: www.estaminas.com.br
 18. O Globo. 1979. Nasce em São Paulo, primeiro bezerro de embrião transplantado. **Jornal O Globo**. São Paulo/SP. 02 set.

19. Pecuária de Elite. 2005. Ed: Vitrogen. Os primeiros clones comerciais do Brasil. **Revista Pecuária de Elite**. Ano 4, 10 (Out): 19. home page: www.vitrogen.com.br
20. PEIXER M.A., SOUSA R.V., RUMPF R., BEM A.R. DE, NETO M.A.P. 1994. Nascimento dos primeiros produtos de FIV da Raça Nelore no Cenargen. **Zootecnia**, Nova Odessa, SP, 32(ún): 49.
21. PEREIRA R.J., SOHNREY B., HOLTZ W. 1998. Non-surgical embryo collection in goats treated with prostaglandin F₂ alfa and oxytocin. **Journal of Animal Science**, 76(2): 360-363.
22. RODRIGUES J.L., SILVA C.A.M., HAHN J., RUBIN M.I.B., COSTA C.P.D., PINTO C.S. 1980. Viabilidade do emprego da transferência de embriões bovinos a nível de campo no Rio Grande do Sul – Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. 4(3-4): 33-37.
23. SELAIVE-VILLAROEL A.B. & MIES FILHO A. 1979. Transferência de óvulos fecundados em ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. 3: 29-31.
24. SIMPLICIO A.A., SANTOS D.O., SOUZA T.E.F.de, WANDERLEY A.A.D. 1996. Inovulação a fresco e após criopreservação de embriões caprinos produzidos in vivo em fêmeas pré-púberes e púberes. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS. Porto Alegre**. 27(1): 296.
25. SNAD/SEFIS/DFIMA - Ministério da Agricultura. 1979. In: **Inseminação Artificial**. Transferência de Embriões: 87-90.
26. SNAD/SEFIS/DFIMA - Ministério da Agricultura. 1980. In: **Inseminação Artificial**. Transferência de Embriões: 85-86
27. TRALDI A.S., COGNIÉ Y., LEBOEUF B., BARIL G., MASSIP A., MERMILLOD P. 1999. Resultados de gestações e partições de embriões *in vivo* e *in vitro* vitrificados de caprinos e ovinos. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS. Porto Alegre**. 27(Suppl 1): 300.
28. Veja. 1979. Nasceu Eureka. **Revista Veja**. São Paulo/SP. 12 set: 92. home page: www.vejaonline.abril.com.br
29. VIANNA W.L, MENDES F.V., LAGO V., CANDINI P.H., KRIEGER J., MEIRELLES F.V., MERIGHE G.K.F., MORETTI A.S. 2004. Transferência de embriões em estágio precoce de desenvolvimento para receptoras minipig e suínas. In: *2º Congresso Latino Americano de Suinocultura e 4º Congresso de Suinocultura do Mercosul (Foz do Iguaçu). Anais do 2º Congresso Latino Americano de Suinocultura (Campinas, Brasil)*: Animalworld. 1: 326-326.
30. VIEIRA S.F. 1992. Implantação de um programa de transferência de embriões importados em cabras nativas no Estado do Ceará. In: *Anais... da VII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões (publ.avulsa)*. p.88.
31. WISCHRALLA., LIMA P.F., OLIVEIRA M.A.L., RIBEIRO V.M.F. 1989. Transferência de embriões caprinos. **Revista do Centro Ciências Rurais**. 19:
32. YAMAZAKI W., FERREIRA C.R., MÉO S.C., MEIRELLES F.V., GARCIA J.M. 2002. Clonagem e a bezerra “Penta”: primeiro clone produzido no Brasil a partir de células de um animal adulto. In: **O Embrião**.: 12(Jul-Set): 3-5.
33. ZERO HORA. 1980. Técnica do embrião em teste, para ser usada em seguida. In: **Jornal ZERO HORA**. Porto Alegre/RS. 05/09/1980. Caderno Especial Campo e Lavoura: 26.

DIRETORIAS DA SBTE (1985-2005)

Gestão Temporária (25/04 a 18/07/1985)		
Presidente:	Assis Roberto de Bem Fundação 25/04/1985	
Secretário	Roberto Raulino Lamego	
25 membros fundadores	Antonio Renato Pacheco Assis Roberto De Bem Carlos Miguel Jaume Eggleton César Roberto Esper Evaneo Nogueira Coelho Günther Kluge Jairo Pereira Neves Jorge José Bangel Júnior Leônidas Antonio Chow Castilho Luiz Eustáquio Lopes Pinheiro Mara Iolanda Batistella Rubin Marc Roger Jean Marie Henry Marília Viviane de Oliveira Simões Nei Queiroz Silva Neuci Adalto Vinha	Nilson Antonio Azevedo Oziel Buzutti Paulo Bayard Dias Gonçalves Paulo Eymard Correa Loureiro Peter Elsdén Raul Gastão Muciolo Roberto Raulino Lamego Theodoro Romano Vaske Tirzá Portela Andrade Vicente Otávio Fonseca Carlos Alberto Zanenga* Francisco Aloisio Fonseca* Heraldo Gomes Rangel* José Antonio Visintin*

* Colaboradores voluntários

Gestão 1985-1987		
Presidente:	Luiz Eustáquio Lopes Pinheiro	Eleição da primeira diretoria: 18/07/1985
Vice-Presidente:	Cesar Roberto Esper	
Secretário:	Carlos Fernando Marins Rodrigues	
Tesoureiro:	Irineu Machado Benevides Filho	
Conselho Fiscal	Evanio Nogueira Coelho Douglas Brasil Gaethi Marc Roger Jean Marie Henry	
Suplentes	Jose Luciano Reis Lara Aginaldo Barbosa Sena	
Comissão Científica (CC)	I Reunião Jaboticabal/SP 01- 02/07/1986	II Reunião: Belo Horizonte/MG 18/06/1987
	José Luiz Rodrigues Ricardo Macedo Gregory Assis Roberto de Bem Roberto Jorge Chebel Jorge Nicolau Neuci Adalto Vinha Walter Antonio de Pádua Becker Mara Iolanda Batistella Rubin Claudemir de Carvalho Theodoro Romano Vaske	José Luiz Rodrigues Ricardo Macedo Gregory Assis Roberto de Bem Roberto Jorge Chebel Jorge Nicolau Neuci Adalto Vinha Walter Antonio de Pádua Becker Mara Iolanda Batistella Rubin Claudemir de Carvalho Theodoro Romano Vaske

Gestão 1987-1989		
Presidente:	Mara Iolanda Batistella Rubin	
Vice-Presidente:	Cyro da Porciúncula Dias da Costa	
Secretário:	Jairo Pereira Neves	
Tesoureiro:	Gabriel Antonio de Moraes Neto	
Conselho Fiscal	Aurelino Menarim Júnior Assis Roberto de Bem Carlos Alberto Zanenga	
Suplentes	Silvia T. S. J. Ribeiro Takeshi Morita	
Comissão Científica	III Reunião: Santa Maria/RS 01 - 02/09/1988	IV Reunião: Porto Alegre/RS 04 - 05/09/1989
	Mara I B Rubin – Presidente CC Isabel Regina Scheid Luiz Eustáquio Lopes Pinheiro	Mara I B Rubin – Presidente CC José Carlos Ferrugem de Moraes Rodrigo Costa Mattos

Gestão 1989-1991		
Presidente:	Aurelino Menarim Júnior	
Vice-Presidente:	Carlos Alberto Zanenga	
Secretário:	Vera Fernanda Hossepian de Lima	
2º Secretário:	Assis Roberto de Bem	
Tesoureiro:	Rui Fernando Félix Lopes	
2º Tesoureiro	Silvia Tereza S J Ribeiro	
Conselho Fiscal	Sandra Gesteira Coelho Rodrigo Costa Mattos Altino Pires de Almeida Filho	
Comissão Científica	V Reunião: Brasília/DF 19-21/08/1990	VI Reunião: Curitiba/PR 25-27/08/1991
	Assis Roberto de Bem - Presidente CC Ligia Elizabeth Pegoraro-Rumpf	Assis Roberto de Bem -Presidente CC Célia Maria de Almeida Pepe Regivaldo Vieira de Sousa

Gestão 1991-1993		
Presidente:	Enoch Borges de Oliveira Filho	
Vice-Presidente:	José Antonio Visintin	
Secretário:	Rafael Herrera Alvarez	
2º Secretário:	Jean Pierre Massat	
Tesoureiro:	Raysildo Barbosa Lôbo	
2º Tesoureiro	Carlos Fernando Marins Rodrigues	
Conselho Fiscal	Agnaldo Barbosa Sena Celso Martins de Medeiros Jorge Nicolau Neto	
Comissão Científica	VII Reunião: Jaboticabal/SP 14-16/08/1992	VIII Reunião: Ribeirão Preto/SP 13-15/08/1993
	Rafael Herrera Alvarez - Presidente CC Enoch Borges de Oliveira Filho	Rafael Herrera Alvarez-Presidente CC Enoch Borges de Oliveira Filho

Gestão 1993-1994	
Presidente:	Claudemir de Carvalho
Vice-Presidente:	Cláudia Lima Verde Leal
Secretário:	Sonia Maria Nogueira Gaspar Paggiaro
2° Secretário:	Sara Yamaguishi Tomita
Tesoureiro:	Vera Fernanda Hossepian de Lima
2° Tesoureiro	Rubens Paes de Arruda
Conselho Fiscal	Aurelino Menarim Junior Carlos Alberto Zanenga Luiz Carlos Capovilla

Gestão 1994-1995 (Provisória)		
Presidente:	Sônia Maria Nogueira Gaspar Paggiaro e Vera Fernanda Hossepian de Lima	
Secretário:	Sônia Maria Nogueira Gaspar Paggiaro	
2° Secretário:	Sara Yamaguishi Tomita	
Tesoureiro:	Vera Fernanda Hossepian de Lima	
2° Tesoureiro	Rubens Paes de Arruda	
Conselho Fiscal	Aurelino Menarim Junior Luiz Carlos Capovilla Carlos Alberto Zanenga	
Comissão Científica	IX Reunião: Campinas/SP 16-18/09/1994	X Reunião: Águas de Lindóia/SP 21-24/09/1995
	Rafael Herrera Alvarez- Presidente CC	Vera Fernanda Hossepian de Lima Sônia Maria Nogueira Gaspar Paggiaro

Gestão 1995-1997		
Presidente:	José Luiz Rodrigues	
Vice-Presidente:	José Antonio Visintin	
Secretário:	Sônia Maria Nogueira Gaspar Paggiaro	
Tesoureiro:	José Fernando Garcia	
Conselho Fiscal	Cezinande Meira Aurelino Menarim Junior Agnaldo Barbosa Sena	
Suplentes	José Abdo de Andrade Hellu José Renato Chiari	
Comissão Científica	XI Reunião: Canela/RS 30/08-01/09/1996	XII Reunião: Foz do Iguaçu/PR 28-31/08/1997
	Altino P Almeida Filho- Presidente CC Enoch Borges de Oliveira Filho Assis Roberto de Bem Mara Iolanda Batistella Rubin Paulo Bayard Dias Gonçalves Rui Fernando Félix Lopes José Luiz Rodrigues Marc Roger J. M. Henry José Fernando Garcia	Paulo B D Gonçalves-Presidente CC Assis Roberto de Bem Cláudio Alves Pimentel José Antônio Visintin José Fernando Garcia José Luiz Rodrigues José Ricardo de Figueiredo Mara Iolanda Batistella Rubin Rui Fernando Félix Lopes Vicente José de Figueiredo Freitas

Gestão 1997-1999		
Presidente:	José Antonio Visintin	
Vice-Presidente:	Rodolfo Rumpf	
Secretário:	Sônia Maria Nogueira Gaspar Paggiaro	
Tesoureiro:	José Fernando Garcia	
Conselho Fiscal	Cezinande de Meira José Luiz Rodrigues José Ricardo de Figueiredo	
Comissão Científica	XIII Reunião: Atibaia/SP 27-30/08/1998	XIV Reunião: Campos do Jordão/SP 26-29/08/1999
	Paulo B D Gonçalves – Presidente CC Carlos José Hoff de Souza Ciro Moraes Barros João Junqueira Fleury João Francisco Coelho de Oliveira José Antônio Visintin José Carlos Ferrugem de Moraes José Fernando Garcia José Luiz Rodrigues José Ricardo de Figueiredo Mara Iolanda Batistella Rubin Marcos A. Lemos de Oliveira Rodolfo Rumpf Vicente José de Figueiredo Freitas	Paulo B D Gonçalves – Presidente CC Cezinande de Meira Fernanda da Cruz Landim-Alvarenga João Junqueira Fleury Joaquim Mansano Garcia José Carlos Ferrugem de Moraes José Luiz Rodrigues José Ricardo de Figueiredo Luis Fabiano Santos da Costa Mara Iolanda Batistella Rubin Marcelo Marcos Montagner Marco Antônio Alvarenga Marcos Antonio Lemos de Oliveira Rafael Gianella Mondadori Silvia Ferreira Carámbula Vicente José de Figueiredo Freitas

Gestão 1999-2001		
Presidente:	Rodolfo Rumpf	
Vice-Presidente:	José Ricardo de Figueiredo	
Secretário:	Margot Nunes Dode	
2º Secretário:	Regivaldo Vieira de Sousa	
Tesoureiro:	Amílcar Gasparin Barreto	
2º Tesoureiro	Maurício Antônio Silva Peixer	
Conselho Fiscal	José Antônio Visintin Elmo Gomes Diniz Álvaro Leme	
Comissão Científica	XV Reunião: Caldas Novas/GO 24-27/08/2000	XVI Reunião: Foz do Iguaçu/PR 12-15/01/2002
	Joaquim Mansano Garcia - Presidente Anneliese de Souza Traldi César Roberto Esper Flávio V Meirelles Francisco G Leite José Antônio Visintin José L de Vasconcelos André Buck Alexandre Wolf Christina R Ferreira	Karina Beloti Avelino José R de Figueiredo Mara I B Rubin Margot Nunes Dode Paulo B D Gonçalves Vera F H de Lima Raquel Zaneti Puelker Ricardo A Figueiredo Sandra H Gabaldi Simone Cristina Méo Walt Yamazaki

Gestão 2001-2003			
Presidente:	José Ricardo de Figueiredo		
Vice-Presidente:	Paulo Bayard Dias Gonçalves		
Secretário:	Regiane Rodrigues dos Santos		
2º Secretário:	João Francisco Coelho de Oliveira		
Tesoureiro:	Ana Paula Ribeiro Rodrigues		
2º Tesoureiro	José Fernando Garcia		
Conselho Fiscal	Rodolfo Rumpf Reginaldo da Silva Fontes Carlos Antonio Carvalho Fernandes		
	XVII Reunião: Beberibe/CE 25-31/08/2003		
Comissão Científica	<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> Joaquim Mansano Garcia - Presidente Alexandre Wolf Amílcar Gasperin Barreto Andrea C Basso Anneliese de Souza Traldi C. A. de M. Bonfim César Roberto Esper Cezinande de Meira Christina Ramires Ferreira Ciro Moraes Barros Claudia Lima Verde Leal Edson Guimarães Lo Turco Felipe Perecin Fernanda da Cruz Landim-Alvarenga Flávio Vieira Meirelles Gisele Socal Mingoti Guilherme de Paula Nogueira João Carlos Pinheiro Ferreira Joaquim Mansano Garcia José Antonio Visintin José Buratini Jr José Fernando Garcia José Luiz M Vasconcelos </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> José Luiz Rodrigues J. M. B. Duarte José Ricardo de Figueiredo Karina Beloti Avelino Luiz Altamiro G Nogueira Leticia Siqueira de Sá Barreto Lia de Alencar Coelho Mara Iolanda B Rubin Marcelo Marcondes Seneda Marcelo Roncoletta Marco Antônio Alvarenga Marco A Lemos de Oliveira Margot A Nunes Dode Maria Angélica Miglino Maria Clara Caldas Bussiere M D Lopes Mário Binelli Otávio Mitio Ohashi Paulo Bayard Dias Gonçalves Pietro Sampaio Baruselli Rodolfo Rumpf Rubens Paes Arruda Sandra Helena Gabaldi Simone Cristina Méo Niciura </td> </tr> </table>	Joaquim Mansano Garcia - Presidente Alexandre Wolf Amílcar Gasperin Barreto Andrea C Basso Anneliese de Souza Traldi C. A. de M. Bonfim César Roberto Esper Cezinande de Meira Christina Ramires Ferreira Ciro Moraes Barros Claudia Lima Verde Leal Edson Guimarães Lo Turco Felipe Perecin Fernanda da Cruz Landim-Alvarenga Flávio Vieira Meirelles Gisele Socal Mingoti Guilherme de Paula Nogueira João Carlos Pinheiro Ferreira Joaquim Mansano Garcia José Antonio Visintin José Buratini Jr José Fernando Garcia José Luiz M Vasconcelos	José Luiz Rodrigues J. M. B. Duarte José Ricardo de Figueiredo Karina Beloti Avelino Luiz Altamiro G Nogueira Leticia Siqueira de Sá Barreto Lia de Alencar Coelho Mara Iolanda B Rubin Marcelo Marcondes Seneda Marcelo Roncoletta Marco Antônio Alvarenga Marco A Lemos de Oliveira Margot A Nunes Dode Maria Angélica Miglino Maria Clara Caldas Bussiere M D Lopes Mário Binelli Otávio Mitio Ohashi Paulo Bayard Dias Gonçalves Pietro Sampaio Baruselli Rodolfo Rumpf Rubens Paes Arruda Sandra Helena Gabaldi Simone Cristina Méo Niciura
Joaquim Mansano Garcia - Presidente Alexandre Wolf Amílcar Gasperin Barreto Andrea C Basso Anneliese de Souza Traldi C. A. de M. Bonfim César Roberto Esper Cezinande de Meira Christina Ramires Ferreira Ciro Moraes Barros Claudia Lima Verde Leal Edson Guimarães Lo Turco Felipe Perecin Fernanda da Cruz Landim-Alvarenga Flávio Vieira Meirelles Gisele Socal Mingoti Guilherme de Paula Nogueira João Carlos Pinheiro Ferreira Joaquim Mansano Garcia José Antonio Visintin José Buratini Jr José Fernando Garcia José Luiz M Vasconcelos	José Luiz Rodrigues J. M. B. Duarte José Ricardo de Figueiredo Karina Beloti Avelino Luiz Altamiro G Nogueira Leticia Siqueira de Sá Barreto Lia de Alencar Coelho Mara Iolanda B Rubin Marcelo Marcondes Seneda Marcelo Roncoletta Marco Antônio Alvarenga Marco A Lemos de Oliveira Margot A Nunes Dode Maria Angélica Miglino Maria Clara Caldas Bussiere M D Lopes Mário Binelli Otávio Mitio Ohashi Paulo Bayard Dias Gonçalves Pietro Sampaio Baruselli Rodolfo Rumpf Rubens Paes Arruda Sandra Helena Gabaldi Simone Cristina Méo Niciura		

Gestão 2003-2005		
Presidente:	Marco Antônio Alvarenga	
Vice-Presidente:	João Henrique Moreira Viana	
Secretário:	José Buratini Jr.	
2º Secretário:	Flavio Vieira Meirelles	
Tesoureiro:	Cezinande de Meira	
2º Tesoureiro	Carlos Antônio Carvalho Fernandes	
Conselho Fiscal	José Luiz Rodrigues / Maria Angélica Miglino / Alceu Mezzalira	
Suplentes	Carlo Alberto Zanenga / Otávio Mitio Ohashi	
	Reunião 26-29/08/2004 Barra Bonita/SP	Reunião 25-28/08/2005 Angra dos Reis/RJ
Comissão Científica	Fernanda C Landim-Alvarenga - Presidente CC Alberto Gusmão Alceu Mezzalira Alicia Martins Jr. Anneliese de Souza Traldi Carlos Eurico dos Santos Fernandes Carlos Antonio Carvalho Fernandes César Roberto Esper Cezinande de Meira Ciro Moraes Barros Eduardo Paulino da Costa Elen Silvia C. Siquiera-Pyles Fabiana Ferreira de Souza Frederico Ozanan Papa Gustavo Ferrer Carneiro João Carlos Pinheiro Ferreira João Henrique Moreira Viana Joaquim Mansano Garcia José Antonio Visintin José Buratini Jr. José Luis Moraes Vasconcelos José Ricardo Figueiredo Mara Iolanda Batistella Rubin Marcelo Nogueira Marcelo Marcondes Seneda Marco Antônio Alvarenga Marco Antonio Coutinho da Silva Maria Angélica Miglino Maria Denise Lopes Mario Binelli Nereu C. Prestes Pércles A. Hassun Pietro Sampaio Baruselli Roberto Sartori Rodolfo Rumpf Rubens Paes de Arruda Sony Dimas Bicudo Vera Fernanda Hossepian de Lima	Fernanda C L Alvarenga – Presidente CC Alberto Gusmão Alceu Mezzalira Alicia Martins Jr. Anneliese de Souza Traldi Carlos Antonio Carvalho Fernandes Cezinande de Meira Ciro Moraes Barros Claudia Barbosa Fernandes Claudia Lima Verde Leal Ed Hoffinan Madureira Eunice Oba Flávio Vieira Meirelles Frederico Ozanan Papa Gabriel Bó Gisele Soccal Mingoti Guilherme de Paula Nogueira João Carlos Deschamps João Carlos Pinheiro Ferreira João Henrique Moreira Viana José Antonio Visintin José Buratini Jr. José Ricardo de Figueiredo Ligia Mota Mara Iolanda Batistella Rubin Marcelo Marcondes Seneda Marcelo F. Gouveia Nogueira Marco A Lemos de Oliveira Marco Antônio Alvarenga Marco Antonio Coutinho da Silva Marco Chalhoub Maria Angélica Miglino Maria Denise Lopes Mario Binelli Mayra Elena Ortiz A. Assumpção Nereu C. Prestes Paulo Bayard Dias Gonçalves Pietro Sampaio Baruselli Roberto Sartori Filho Rubens Paes de Arruda Sony Dimas Bicudo Vera Fernanda Hossepian de Lima Walt Yamazaki Yeda Watanabi

Gestão 1987-1989		
Presidente:	Mara Iolanda Batistella Rubin	
Vice-Presidente:	Cyro da Porciúncula Dias da Costa	
Secretário:	Jairo Pereira Neves	
Tesoureiro:	Gabriel Antonio de Moraes Neto	
Conselho Fiscal	Aurelino Menarim Júnior	Assis Roberto de Bem Carlos Alberto Zanenga
Suplentes	Silvia T. S. J. Ribeiro	Takeshi Morita
Comissão Científica	III Reunião: Santa Maria/RS 01 - 02/09/1988	IV Reunião: Porto Alegre/RS 04 - 05/09/1989
	Mara I B Rubin – Presidente CC Isabel Regina Scheid Luiz Eustáquio Lopes Pinheiro	Mara I B Rubin – Presidente CC José Carlos Ferrugem de Moraes Rodrigo Costa Mattos

Gestão 2003-2005		
Presidente:	Marco Antônio Alvarenga	
Vice-Presidente:	João Henrique Moreira Viana	
Secretário:	José Buratini Jr.	
2º Secretário:	Flavio Vieira Meirelles	
Tesoureiro:	Cezinande de Meira	
2º Tesoureiro	Carlos Antônio Carvalho Fernandes	
Conselho Fiscal	José Luiz Rodrigues Maria Angélica Miglino Alceu Mezzalira	
Suplentes	Carlo Alberto Zanenga Otávio Mitio Ohashi	
Comitê Científico	Reunião: Angra dos Reis/RJ 25-28/08/2005	
	Fernanda C L Alvarenga – Presidente CC Alberto Gusmão Alceu Mezzalira Alicio Martins Jr. Anneliese de Souza Traldi Carlos Eurico dos Santos Fernandes Carlos Antonio Carvalho Fernandes César Roberto Esper Cezinande de Meira Ciro Moraes Barros Eduardo Paulino da Costa Elen Silvia C. Siquiera-Pyles Fabiana Ferreira de Souza Frederico Ozanan Papa Gustavo F. Carneiro João Carlos Pinheiro Ferreira João Henrique Moreira Viana Joaquim Mansano Garcia José Antonio Visintin	José Buratini Jr. José Luis M. Vasconcelos José Ricardo Figueiredo Mara Iolanda Batistella Rubin Marcelo Nogueira Marcelo Marcondes Seneda Marco Antônio Alvarenga Marco Antonio Coutinho da Silva Maria Angélica Miglino Maria Denise Lopes Mario Binelli Nereu C. Prestes Péricles A. Hassun Pietro Sampaio Baruselli Roberto Sartori Rodolfo Rumpf Rubens Paes de Arruda Sony Dimas Bicudo Vera Fernanda Hossepian de Lima

AVANÇOS NO ENTENDIMENTO DA FISIOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO FOLICULAR

Buratini Jr. J.¹; Castilho A.C.S.¹; Teixeira A.B.³; Costa I.B.³; Pinto M.G.L.³; Giometti I.C.³; Glapinski V.F.²; Nogueira, M.F.G.³; Barros, C.M.²; Price, C.A.⁴

Departamentos de ¹Fisiologia e ²Farmacologia, IB, UNESP, Botucatu, SP, Brasil; ³Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ, UNESP, Botucatu, SP, Brasil; ⁴Centre de Recherche en Reproduction Animale, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, St. Hyacinthe, Qc, Canada. buratini@ibb.unesp.br

Resumo

Esta revisão sumariza os principais mecanismos reguladores do desenvolvimento folicular pré-antral e antral. Atenção especial é dada aos mecanismos reguladores parácrinos na fase pré-antral e à seleção do folículo dominante na fase antral. Evidências da participação de fatores de crescimento fibroblásticos (FGFs) na regulação do desenvolvimento folicular são destacadas.

Introdução

A maioria dos oócitos presentes no ovário ao nascimento não atinge a ovulação (Yang et al., 1998). Portanto, técnicas de reprodução assistida como a superovulação/TE e MIV/FIV têm sido desenvolvidas e aperfeiçoadas a fim de maximizar o potencial reprodutivo de fêmeas superiores ou ameaçadas de extinção. Em bovinos, protocolos hormonais que controlam o desenvolvimento folicular e a função lútea permitem IA em momento pré-determinado e sincronização de receptoras para TE, potencializando a eficiência reprodutiva (Barros & Ereno, 2004; Bó et al, 2004). Contudo, avanços nas técnicas de reprodução assistida requerem melhor entendimento da fisiologia ovariana. Apesar da enorme quantidade de informações produzidas durante as duas últimas décadas, o entendimento completo dos mecanismos controladores do desenvolvimento folicular ainda não foi atingido. A regulação do desenvolvimento folicular é complexa e envolve fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos, que são orquestrados de maneira estágio-específica a fim de controlar vários processos incluindo proliferação e diferenciação de células foliculares, esteroidogênese, angiogênese/vascularização, remodelagem da membrana basal e matriz extracelular e atresia/apoptose (Webb et al., 2003; Silva & Price et al., 2000; Acosta & Miyamoto, 2004; Rodgers et al., 2003; Fortune et al., 2004). O objetivo desta revisão é sumarizar os principais mecanismos reguladores do desenvolvimento folicular pré-antral e antral, destacando evidências do envolvimento dos fatores de crescimento fibroblásticos (FGFs). Com relação à regulação do desenvolvimento folicular antral, atenção especial é dada ao controverso papel dos receptores de LH (LHR) na seleção do folículo dominante.

Desenvolvimento folicular pré-antral

O papel das gonadotrofinas no controle do desenvolvimento folicular pré-antral é controverso. Receptores de FSH (FSHR) podem ser detectados em folículos primários bovinos (Wandji et al., 1992) e estimulação do desenvolvimento folicular pré-antral pode ser alcançado pela adição de FSH ao meio de cultura. Entretanto, considera-se que o FSH desempenha um papel permissivo ao invés de regulador neste estágio de desenvolvimento (Gutierrez et al., 2000; McNatty et al., 1999; Webb et al., 2003). Alternativamente, o início e a regulação do desenvolvimento folicular pré-antral são predominantemente conduzidos por fatores produzidos localmente (McNatty et al., 1999). O oócito tem um papel ativo na coordenação da proliferação e diferenciação das células da granulosa ao seu redor (Gilchrist et al., 2004). Comunicação intercelular é proporcionada por processos citoplasmáticos trans-zonais (TZP), que são extensões das células da granulosa que penetram através da zona pelúcida e atingem a membrana do oócito, onde junções do tipo gap permitem transporte bidirecional de íons, metabólitos, aminoácidos e pequenas moléculas reguladoras (Albertini et al., 2001). Interessantemente, este tipo de comunicação entre o oócito e células somáticas parece ser regulada durante o desenvolvimento, uma vez que as TZPs retraem quando o folículo atinge o estágio antral, o que se acredita ser, pelo menos em parte, um efeito da ação do FSH (Albertini et al., 2001).

A comunicação entre o oócito e as células somáticas também ocorre por sinalização parácrina. Dentre vários fatores de crescimento produzidos pelo oócito ou células da granulosa, o fator de células tronco (SCF; também conhecido como kit-ligante) e membros da família dos fatores de crescimento transformantes- (TGF-), particularmente o fator de crescimento diferencial-9 (GDF-9) e a proteína morfogenética óssea-15 (BMP-15, também conhecida como GDF-9B) têm recebido a maior parte da atenção recentemente. Em ovelhas, o receptor do KL, conhecido como c-kit, está localizado em oócitos de folículos em crescimento, enquanto que o KL é produzido por células da granulosa de folículos primordiais e primários (McNatty et al., 1999). Em camundongos, a imunização contra o c-kit aboliu a transição de folículos primordiais a primários e uma mutação no gene c-kit comprometeu a ativação de folículos primordiais (Kissel et al., 2000; Yoshida et al., 1997), o que destaca o absoluto requerimento da interação c-kit/KL para o desenvolvimento folicular pré-antral. Interessantemente, o KL estimula a síntese de DNA em células da granulosa, o que se acredita ser mediado por mitógenos de origem oocitária, uma vez que as células da granulosa não expressam o receptor c-kit (Yoshida et al., 1997; Otsuka & Shimasaki, 2002). Assim, sob estímulo do KL, o oócito dispararia um sinal bastante precoce para promover a proliferação das células da granulosa. Além disso, o sistema c-kit/KL também pode estar envolvido na diferenciação de células do estroma em células da teca, já que o receptor c-kit é expresso por células da teca e a expressão do KL aumenta em células da granulosa no momento da formação da camada da teca (Parrot & Skinner, 2000).

Na maioria das espécies, o GDF-9 e BMP-15 ovarianos são exclusivamente expressos pelo oócito (revisado por Juengel et al., 2004 e Shimasaki et al., 2003), embora ambos tenham sido detectados por PCR em células da granulosa de folículos antrais em cabras (Silva et al., 2005). A expressão do GDF-9 é detectável a partir do estágio primordial (em ruminantes; Bodensteiner et al., 1999) ou primário (em camundongos; McGrath et al., 1995) do desenvolvimento folicular e é essencial para o desenvolvimento

de folículos secundários, uma vez que camundongos com deleção do gene mostraram-se inférteis e com desenvolvimento folicular interrompido no estágio (Dong et al., 1996). Além disso, o GDF-9 estimulou o crescimento folicular pré-antral de ratas *in vivo*, provavelmente pela potencialização da proliferação das células da granulosa (Vitt et al., 2000ab). Como o GDF-9, a BMP-15 também estimula a proliferação das células da granulosa e é crucial para o desenvolvimento folicular pré-antral, já que ovelhas imunizadas contra a BMP-15 tiveram os folículos bloqueados no estágio primário (Otsuka et al., 2000; Juengel et al., 2002). Mutações espontâneas em ovelhas têm contribuído para esclarecer o papel da BMP-15. Ovelhas Inverdale com um único gene BMP-15 inativo são férteis e mostram taxa ovulatória aumentada, enquanto que ovelhas homozigotas para a mutação inativadora são estéreis e apresentam desenvolvimento folicular bloqueado no estágio (Galloway et al., 2000). Foi sugerido que níveis reduzidos de BMP-15 em ovelhas heterozigotas potencializariam o desenvolvimento folicular devido a um aumento na sensibilidade ao FSH. De fato, demonstrou-se que a BMP-15 suprime a expressão de receptores para FSH (FSHR) e de genes responsivos ao FSH incluindo a StAR (proteína reguladora aguda da esteroidogênese), P450scc (P450 clivadora de cadeia lateral), 3-HSD (3-hidroxi-esteróide desidrogenase), LHR e inibina (Otsuka et al. 2001; Shimasaki et al., 2003).

O GDF-9 e a BMP-15 ativam um complexo receptor formado por dois subtipos de receptores de (I e II). Em mamíferos, sete receptores tipo I e cinco tipo II foram caracterizados. O BMPR-II é o receptor tipo II ativado por ambos GDF-9 e BMP-15, enquanto que o BMPR-IB e o TGF R-I são os receptores tipo I ativados pela BMP-15 e GDF-9, respectivamente. O BMPR-II e -IB foram localizados em células da granulosa e oócitos de folículos pré-antrais ovinos, em concordância com a hipótese de que o GDF-9 e a BMP-15 regulam as funções das células da granulosa e dos oócitos em estágios iniciais do desenvolvimento folicular (revisado por Juengel et al., 2004). Uma alça de "feedback" negativo pode existir entre a BMP-15 e o KL. A BMP-15 estimula a expressão do KL, que, por sua vez, inibe a expressão da BMP-15. Contudo, a interrupção da sinalização c-kit/KL num sistema de co-cultivo (células da granulosa com oócitos) suprimiu a proliferação das células da granulosa induzida pela BMP-15, sugerindo que a interação entre a BMP-15 e o KL é importante para o crescimento folicular (Otsuka & Shimasaki, 2002; Shimasaki et al., 2003). Distintamente, o GDF-9 inibiu a expressão do KL em células da granulosa de camundongos (Joyce et al., 2000). Embora os padrões temporais de secreção desses fatores de crescimento sejam ainda desconhecidos, propôs-se a hipótese de que o desenvolvimento folicular inicial seria conduzido pela interação do KL com a BMP-15, enquanto que o GDF-9 seria secretado um pouco mais tarde por oócitos inteiramente crescidos para promover proliferação das células da granulosa e modular a função do KL (Shimasaki et al., 2003).

O fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) também parece contribuir para a regulação do crescimento folicular pré-antral por meio de mecanismos endócrinos. Apesar do IGF-I e II não estarem expressos em folículos pré-antrais, eles expressam receptores de IGF (tipo 1) e proteínas ligantes de (IGFBP-2 e 3), que se acredita regular a biodisponibilidade de IGFs extra-ovarianos (Webb et al., 2003). Os efeitos dos IGFs sobre o desenvolvimento folicular pré-antral têm variado com o sistema de cultivo, mas estimulação foi obtida quando doses de insulina próximas às fisiológicas foram utilizadas (Gutierrez et al., 2000; Fortune et al., 2004). Além disso, a importância dos IGFs para os estágios iniciais do desenvolvimento folicular foi claramente demonstrada por experimentos em que

o nocaute do gene resultou em comprometimento severo da foliculogênese pré-antral e antral inicial em camundongos (Elvin & Matzuk, 1998).

O papel dos FGFs

Vários outros fatores de crescimento também estão envolvidos na sinalização parácrina/endócrina pré-antral incluindo ativina, folistatina, inibina, fator de crescimento (EGF) e FGFs (McNatty et al., 1999). O FGF-2 (FGF básico) é certamente o FGF investigado mais extensivamente com relação ao desenvolvimento folicular. No ovário bovino, o FGF-2 foi localizado nos oócitos de folículos primordiais e primários e em células da granulosa e da teca de folículos pré-antrais em crescimento e antrais (Van Wezel et al., 1995). Estudos de ligação revelaram que os receptores para FGF-2 estão principalmente localizados na camada de células da granulosa (Wandji et al., 1992). Demonstrou-se que o FGF-2 é capaz de estimular a ativação de folículos primordiais em culturas de fragmentos de ovários de ratas e de promover proliferação de células da granulosa (Nilsson et al., 2001; Gospodarowicz et al., 1989). Entretanto, o FGF-2 não teve efeito sobre a ativação espontânea de folículos primordiais, que é comumente observada em cultura de explantes ovarianos bovinos (Derrar et al., 2000).

Outro membro desta família potencialmente interessante é o FGF-8, primeiramente descrito como um fator sinalizador crucial para o desenvolvimento embrionário e oncogênese (Crossley & Martin, 1995; Tanaka et al., 1992). No ovário de camundongas, a expressão gênica do FGF-8 mostrou-se restrita ao oócito (Valve et al., 1997), sugerindo sua participação na sinalização às células foliculares a partir do oócito. Há cinco genes codificadores de receptores para FGFs (FGFR; Kim et al., 2001; Sleeman et al., 2001), sendo que o FGF-8 ativa preferencialmente o FGFR-4 e o subtipo 'c' do FGFR-3 (Ornitz et al., 1996). Contudo, o RNAm que codifica o FGFR-4 ou -3c não foram consistentemente detectados no ovário de roedores (Asakai et al., 1994; Puscheck et al., 1997). Recentemente, a expressão gênica do FGF-8, FGFR-3c e -4 foi detectada em "pools" de folículos primordiais, primários e secundários obtidos a partir de ovários fetais (Buratini et al., 2005a). Os sinais de expressão do FGF-8 e FGFR-3c mostraram-se simultâneos e foram mais freqüentes em folículos secundários do que primordiais. O padrão de expressão gênica observado sugere que a expressão do FGF-8 e de seus receptores é regulada ao longo do desenvolvimento e que o FGFR-3c é o receptor predominante para o FGF-8 em folículos pré-antrais bovinos (Buratini et al., 2005a).

Nós também detectamos os RNAm codificadores do FGF-7 e -10, também conhecidos como fatores de crescimento dos queratinócitos 1 e 2 (KGF-1 e -2), respectivamente, em folículos pré-antrais primordiais, primários e secundários obtidos de fetos bovinos, sugerindo a participação desses FGFs nos mecanismos controladores da foliculogênese pré-antral (dados não publicados).

Desenvolvimento folicular antral

Diferentemente do estágio pré-antral, o desenvolvimento folicular antral é criticamente dependente do suporte das gonadotrofinas. Em várias espécies domésticas, os folículos antrais são recrutados e crescem simultaneamente em uma onda folicular sob o controle das gonadotrofinas. (Fortune et al.,

2001; Ginther et al., 2001). Entretanto, também se tornou evidente que fatores de crescimento produzidos localmente constituem moléculas estimuladoras/reguladoras chave para os folículos antrais, atuando por meio de mecanismos parácrinos e endócrinos (Fortune et al., 2004; Ginther et al., 2001; Web et al., 2003). Uma elevação nas concentrações plasmáticas de FSH estimula o recrutamento folicular e a emergência da onda folicular (Adams et al., 1992; Fortune, 1994). Em espécies monovulatórias, um folículo é selecionado do grupo de recrutados e adquire capacidade ovulatória, enquanto os folículos subordinados entram em atresia. O folículo selecionado é conhecido como folículo dominante e desempenha um papel ativo na supressão do crescimento dos subordinados pela secreção de estradiol e inibina (Fortune, 1994; Ginther et al., 1996). Em bovinos, os folículos podem atingir o diâmetro de 8mm independentemente do suporte do LH, mas o crescimento além de 9mm requer LH endógeno ou FSH exógeno (Gong et al., 1996). Portanto, os folículos são considerados dependentes de FSH até a ocorrência da dominância, após o que eles se tornam dependentes de LH (reviewed by Fortune et al., 2001, Ginther et al., 2001).

Os receptores de LH (LHR) das células da granulosa parecem estar relacionados à dominância folicular. A comparação dos padrões de expressão gênica observados por hibridização *in situ* em folículos antrais bovinos recrutados e selecionados indicou que a seleção está associada ao início da expressão do gene LHR em células da granulosa (Bao & Garverick, 1998). Isto é apoiado pelo aumento dos níveis de RNAm do LHR detectado por RT-PCR em células da granulosa de futuros folículos dominantes comparados com seus subordinados, que ocorre no momento ou imediatamente antes do desvio (Beg 2001). Contudo, isto contradiz o relato de níveis indetectáveis de LHR à hibridização *in situ* em células da granulosa durante a seleção folicular (Evans & Fortune, 1997) e de níveis constantes de ligação do hCG a células da granulosa durante o ciclo estral (Ireland & Roche, 1983). Há também certa controvérsia sobre quando o LHR aparece em células da granulosa. O RNAm do LHR foi detectado por RT-PCR em células da granulosa de folículos com diâmetro entre 7 e 8mm (Beg et al., 2001) e em células da granulosa de folículos <5mm (Robert et al., 2003), mas não foi detectado antes dos 9mm de diâmetro por hibridização *in situ* (Xu et al., 1995).

Diferenças na sensibilidade da técnica utilizada para avaliar a expressão gênica podem contribuir para as discrepâncias descritas acima. Contudo, outro aspecto a ser considerado é o comportamento transcricional do gene LHR. O gene LHR está sujeito a "splicing" alternativo, resultando em várias isoformas de RNAm (transcritos alternativos) cujos padrões de expressão folicular e propriedades de ligação e funcionais ainda não foram completamente elucidadas. Vários transcritos foram detectados por PCR em ovinos e bovinos (Robert et al., 2003; Abdennebi et al., 2002), sendo que quatro transcritos alternativos foram recentemente detectados por nosso laboratório em células da granulosa de folículos antrais bovinos por PCR da região compreendida entre os finais dos exons 9 e 11, revelando deleção alternativa do exon 10 e parte do exon 11. Interessantemente, todas as isoformas foram detectadas em células da granulosa de folículos 8mm, de mas apenas um dos seis folículos de 7mm analisados apresentou expressão do LHR em células da granulosa (Nogueira et al., 2005a). Considerando-se que os folículos utilizados neste experimento foram predominantemente obtidos de fêmeas Nelore e que o desvio folicular ocorre aos 6mm de diâmetro nesta raça (Sartorelli et al., 2005), nós assumimos que a expressão do gene LHR nas células da granulosa foi detectada após a seleção do folículo dominante em nossos

estudos. Além disso, os níveis de RNAm do LHR em células da granulosa mostraram-se positivamente correlacionados com o diâmetro folicular e concentrações intra-foliculares de progesterona (Nogueira et al., 2005a), e o FSH aumentou a expressão dos quatro transcritos do LHR em células da granulosa em cultura (dados não publicados) indicando que o FSH induz sensibilidade ao LH. Nós também demonstramos a existência de um transcrito alternativo do LHR bovino com deleção do exon 3 (Nogueira et al., 2005a), conforme previamente relatado em ratos (Aatsinki et al., 1992).

Qual é o interesse prático na expressão das isoformas do LHR? Há evidências de que isoformas diferentes exibem propriedades funcionais e de ligação diferentes. A proteína LHR completa ("full length") se liga a ambas as moléculas LH e hCG, enquanto que a isoforma truncada sem o exon 10 se liga exclusivamente ao hCG (Gromoll et al., 2000) e a deleção parcial do exon 11 leva à inatividade aparente do receptor (Kawate et al., 2002). Baseando-se nessas informações, nós testamos a hipótese de que em vacas Nelore superestimuladas a administração conjunta de LH e hCG, como uma tentativa de estimular diferentes isoformas do LHR nos folículos, afetaria a qualidade do oócito e/ou aumentaria a taxa de ovulação, mas nenhuma diferença foi observada quanto ao número de embriões viáveis ou taxa de prenhez em vacas tratadas com LH apenas ou LH e hCG (Nogueira et al., 2005b). Estudos adicionais são necessários para esclarecer o significado biológico do "splicing" alternativo do LHR em bovinos.

Há fortes evidências de que o sistema IGF desempenha um papel crítico na seleção do folículo dominante. Os IGFs são sinérgicos ao FSH na promoção de crescimento folicular e produção de estradiol (Fortune et al., 2004). Apesar da expressão gênica do IGF-I e -II ter sido localizada em células da granulosa e da teca, respectivamente, o IGF-II tem sido apontado como o principal IGF intraovariano, enquanto que o IGF-I atuaria de uma maneira endócrina (Armstrong et al., 2000; Yuan et al., 1998, Webb et al., 1999). O IGF-I e -II ativam os receptores de IGF tipo I e II, ambos presentes em células da granulosa e da teca (Spicer et al., 2004). Os níveis de IGF total não foram diferentes no fluido folicular de folículos dominantes em relação a folículos subordinados (de la Sota et al., 1996), mas os níveis de IGF-I livre foram maiores no fluido folicular do maior folículo comparado ao segundo maior da mesma onda, antes da observação de diferenças na concentração de estradiol ou diâmetro (Beg et al., 2002). Esta observação está de acordo com um papel regulador para as IGFBPs mediante modulação da biodisponibilidade de IGF. A IGFBP-2, -3, -4 e -5 estão presentes no fluido folicular bovino e a expressão gênica da IGFBP-2 e -4 foi localizada em células da granulosa e da teca, respectivamente (revisado por Fortune, et al. 2001 e Webb et al., 1999). Níveis reduzidos da IGFBP-4 foram encontrados em folículos dominantes bovinos comparados com os dois maiores folículos subordinados apenas 1,5 dias após a emergência da onda (Mihm et al. 2000). Há fortes evidências sugerindo que a redução dos níveis de IGFBP-4 no folículo selecionado é consequência de um aumento da degradação proteolítica das IGFBPs pela proteína plasmática associada à gestação (PAPP-A), recentemente detectada no folículo (Mazerbourg et al., 2001). De fato, a degradação não apenas da IGFBP-4, mas também da IGFBP-5, foi mais alta no maior folículo antes do momento esperado do desvio folicular (Fortune et al., 2004). Por outro lado, os níveis intra-foliculares de IGFBP-2 parecem diminuir com o desenvolvimento do folículo dominante, mas posteriormente em relação à IGFBP-4 e -5 (Fortune et al., 2004). Distintamente da IGFBP-4 e -5, as concentrações de IGFBP-2 parecem ser reguladas no nível transcricional pelo FSH, uma vez que o

RNAm da IGFBP-2 não foi detectado em células da granulosa de folículos dominantes grandes e o FSH inibiu a expressão gênica da IGFBP-2 em células da granulosa bovinas cultivadas (Armstrong et al., 1998; Webb et al., 2003).

O papel dos FGFs

Fortes evidências indicam o envolvimento dos FGFs nos mecanismos parácrinos que regulam o desenvolvimento folicular antral. Conforme mencionado acima, o FGF-2 é o FGF mais extensivamente investigado no desenvolvimento folicular. Dados sobre expressão gênica e protéica revelaram que o principal sítio da produção de FGF-2 é a camada da teca (Berisha et al., 2000). Embora estudos de ligação tenham sugerido que o principal alvo do FGF-2 é a camada da granulosa (Wandji et al., 1992), receptores para o FGF-2 também são expressos em células da teca (Berisha et al., 2004; Buratini et al., 2005b). De fato, ambos os tipos celulares parecem responder ao FGF-2, já que ele induziu a proliferação e inibiu a esteroidogênese tanto em cultivo de células da granulosa (Lavranos et al., 1994; Vernon & Spicer, 1994) quanto de células da teca (Nilsson et al., 2001; Spicer & Stewart, 1996). Uma vez que os níveis de RNAm do FGF-2 aumentam com o desenvolvimento folicular em células da teca, supõe-se que o FGF-2 esteja principalmente envolvido no controle do crescimento final de folículos pré-ovulatórios mediante estimulação da angiogênese e proliferação e sobrevivência das células da granulosa (Berisha et al., 2004).

Assim com o FGF-2, o FGF-1 também é predominantemente expresso por células da teca mas de forma estável ao longo do desenvolvimento folicular antral. Contrariamente ao FGF-2, a proteína FGF-1 foi localizada principalmente na camada da granulosa, onde ele está provavelmente está ligado aos seus receptores e a vasos sanguíneos. A função reguladora do FGF-1 ainda não foi bem caracterizada, mas os dados de expressão combinados a efeitos previamente descritos em outros tecidos sugerem um papel anti-apoptose/pró-sobrevivência em vasos sanguíneos e células da granulosa (Berisha et al., 2004).

Dados que sustentam um papel regulador para o FGF-7 também já foram relatados. Em conjunto, os relatos sobre expressão gênica e protéica do FGF-7 indicam que a camada da teca é o principal sítio de produção do FGF-7 (Parrot et al., 1994; Berisha et al., 2004). Assim como para o FGF-2, demonstrou-se que o FGF-7 promove proliferação das células da granulosa e inibe a esteroidogênese *in vitro* (Parrot et al., 1994; Parrot & Skinner, 1998), o que está de acordo com a localização predominante do RNAm do seu receptor (FGFR2b) na camada da granulosa (Parrot & Skinner, 1998; Berisha et al., 2004). Estas ações parácrinas parecem ser moduladas no nível do receptor já que os níveis de RNAm do FGF-7 parecem não variar durante o desenvolvimento folicular antral, enquanto que a expressão gênica do FGFR-2b aumenta com as concentrações intra-foliculares de estradiol (Berisha et al., 2004). A fim de melhorar a compreensão sobre a regulação do FGFR-2b, nós demonstramos recentemente que o FSH, mas não o IGF-I, estimula a expressão gênica do FGFR-2b em células da granulosa bovinas em cultura (Buratini et al., 2005c).

Nós detectamos recentemente a expressão do RNAm do FGF-10 em oócitos e células da teca de folículos antrais bovinos. Interessantemente, apesar da similaridade entre o FGF-7 e o FGF-10, nossos estudos indicam alta expressão do RNAm do FGF-10 e ausência do FGF-7 em oócitos bovinos (Buratini

et al., 2004). Como as células da granulosa expressam receptores para o FGF-10 (FGFR-2b; Berisha et al., 2004), nossos resultados sugerem o envolvimento do FGF-10 na sinalização parácrina oriunda do oócito e células da teca alvejando as células da granulosa. Além disso, os níveis de RNAm do FGF-10 diminuíram com as concentrações intra-foliculares de estradiol em células da teca, indicando que ele é regulado ao longo do desenvolvimento (Buratini et al., 2004). Isto, combinado à observação de que o FSH estimula a expressão do FGFR-2b em células da granulosa (Buratini et al., 2005c), sugere que o FGF-10 de origem tecal regula especificamente as células da granulosa murais de folículos antrais recém-recrutados.

Dados de expressão gênica também sugerem a participação do FGF-8 e seus receptores cognatos (FGFR-3c e FGFR-4) no controle do desenvolvimento folicular antral. Em folículos antrais bovinos, nós detectamos a expressão do RNAm do FGF-8 não apenas em oócitos mas também em células da granulosa e da teca (Buratini et al., 2005b), em contraste com estudos prévios em camundongos em que o FGF-8 foi considerado oócito-específico (Valve et al., 1997). A expressão gênica do FGFR-4 foi exclusivamente detectada em células da teca bovinas, o que contradiz dados obtidos em camundongos que mostraram expressão apenas em células da granulosa (Buratini et al., 2005b; Puscheck et al., 1997). Os níveis de RNAm do FGFR-4 diminuíram com o aumento do diâmetro folicular, sugerindo que a sinalização pelo FGFR4 pode ter um papel no desenvolvimento/diferenciação inicial das células da teca (Buratini et al., 2005b). A expressão gênica do FGFR-3c foi observada em células da granulosa e da teca em folículos antrais bovinos. Enquanto a expressão do FGFR-3c em células da teca mostrou-se relativamente estável, ela aumentou durante o desenvolvimento folicular em células da granulosa (baseado no diâmetro folicular e conteúdo de estradiol), de forma consistente com um papel para a sinalização do FGFR-3c no crescimento folicular antral. Estudos funcionais revelaram que a expressão do FGFR-3c é especificamente estimulada pelo FSH em células da granulosa bovinas em cultura, mas não está sob o controle do IGF-I (Buratini et al., 2005b). Estas observações importantes sugerem que o FSH pode sensibilizar as células da granulosa a um ou mais FGFs durante o crescimento inicial de folículos antrais e permitir o crescimento continuado do folículo no ambiente pobre em FSH que se instala após o desvio folicular. Os ligantes que ativam o FGFR-3c e -4 nos folículos ainda devem ser melhor caracterizados já que, além do FGF-8, o FGF-1, -2, -4, -9 e -13 também ativam eficientemente o FGFR-3c e -4 (Greene et al., 1998, Ornitz et al., 1996).

Conclusões

Esta revisão focalizou duas áreas da pesquisa atual que deverão aumentar grandemente nosso entendimento sobre o desenvolvimento folicular e levar a melhorias no controle da fertilidade. É sabido que a aquisição de receptores de LH pelas células da granulosa é essencial para a maturação folicular, mas agora sabemos que nem todos os receptores "foram criados iguais": "splicing" alternativo do gene LHR produz várias isoformas do LHR que respondem diferentemente ao LH e hCG. Considerando-se o uso disseminado do LH/hCG em protocolos de manejo reprodutivo, a compreensão da biologia molecular do LHR tem potencial uso prático. Os fatores de crescimento são modificadores potentes do crescimento folicular, sendo a família IGF a melhor conhecida. Nesta revisão nós propomos que a

família FGF também desempenha papéis vitais e, no futuro, a manipulação destas proteínas pode levar a melhorias no controle do crescimento folicular e qualidade do ócito.

References

- Abdennebi L, Lesport AS, Remy JJ, Grebert D, Pisselet C, Monniaux D, Salesse R. Differences in splicing of mRNA encoding LH receptor in theca cells according to breeding season in ewes. *Reproduction*. v.123, p.819-826, 2002.
- Acosta TJ, Miyamoto A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Anim. Reprod. Sci.* v.82-83, p.127-140, 2004.
- Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP, Ko JCH, Ginther OJ. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J. Reprod. Fertil.* v.94, p.177-188, 1992.
- Albertini DF, Combelles CMH, Benecchi E, Carabatsos MJ. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction*. v.121, p.647-653, 2001.
- Armstrong DG, Baxter G, Gutierrez CG, Hogg CO, Glazyrin AL, Campbell BK, Bramley TA, Webb R. Insuline-like growth factor binding protein-2 and -4 messenger ribonucleic acid expression in bovine ovarian follicles: effect of gonadotropins and development status. *Endocrinology*. v.139, p.2146-2154, 1998.
- Asakai R, Song S, Itoh N, Yamakuni T, Tamura K, Okamoto R. Differential gene expression of fibroblast growth factor receptor isoforms in rat ovary. *Mol. Cell. Endocrinol.* v.104, p.75-80, 1994.
- Bao B, Garverick HA. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *J. Anim. Sci.* v.76, p.1903-1921, 1998.
- Barros CM, Ereno RL. Avanços em tratamentos hormonais para a inseminação artificial com tempo fixo (IATF) em bovinos de corte. *Acta Scientiae Veterinariae*. v.32, p. 23-34, 2004.
- Beg MA, Bergfelt DR, Kot K, Guinther OJ. Follicle selection in cattle: dynamics of follicular fluid factors during development of follicle dominance. *Biol. Reprod.* v. 66, p. 120-126, 2002.
- Berisha B, Shams D, Kosmann M, Amselgruber W, Einspanier R. Expression and localization of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor during the final growth of bovine ovarian follicles. *J. Endocrinol.* v.167, p.371-382, 2000.
- Berisha B, Sinowatz F, Schams D. Expression and localization of fibroblast growth factor (FGF) family members during the final growth of bovine ovarian follicles. *Mol. Reprod. Dev.* v.67, p.162-171, 2004.
- Bó GA, Moreno D, Cuiata L, Baruselli PS, Reis EL. Manipulação hormonal do ciclo estral em doadoras

- e receptoras de embrião bovino. *Acta Scientiae Veterinariae*. v.32, p.1-22, 2004.
- Bodensteiner KJ, Clay CM, Moeller CL, Sawyer HR. Molecular cloning of de ovine growth/differentiation factor-9 gene and expression of growth differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. *Biol. Reprod.* v.60, p.381-386, 1999.
- Buratini J Jr, Pinto MGL, Giometti IC; Costa, I.B.;Teixeira, A.B.; Barros, C.M.; Price, C.A. Fibroblast growth factor 10 gene expression in bovine antral follicles. *Biol. Reprod. (special issue)*, p.269-70, 2004.
- Buratini J Jr, Glapinski VF, Giometti IC, Teixeira AB, Costa IB, Avellar MCW, Barros CM, Price CA. Expression of fibroblast growth factor-8 and its cognate receptors, fibroblast growth factor receptor (FGFR) -3c and -4, in fetal bovine preantral follicles. *Mol. Reprod. Dev.*, v.70, p.255-61, 2005a.
- Buratini J Jr, Teixeira AB, Costa IB, Glapinski VF, Pinto MGL, Giometti IC, Barros CM, Cao M, Nicola ES, Price CA. Expression of fibroblast growth factor-8 and regulation of cognate receptors, fibroblast growth factor receptor-3c and -4, in bovine antral follicles. *Reproduction*, 2005b (no prelo).
- Buratini J Jr, Castilho AC, Cao M, Nicola ES, Price CA. Regulation of fibroblast growth factor receptor-2b (FGFR-2b) gene expression in cultured bovine granulosa cells. *Biol. Reprod. (special issue)*, 2005c (resumo aceito).
- Crossley PH, Martin GR. The mouse *Fgf8* gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development*. v.121, p.439-451, 1995.
- de la Sota RL, Simmen FA, Diaz T, Thatcher WW. Insulin-like growth factor system in bovine first-wave dominant and subordinate follicles. *Biol. Reprod.* v. 55, p.803-812, 1996.
- Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*. v.383, p.531-535, 1996.
- Elvin JA, Yan C, Matzuk MM. Oocyte-expressed TGF-beta superfamily members in female fertility. *Mol. Cell. Endocrinol.* v.25, p.1-5, 2000.
- Fortune JE. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol. Reprod.* v.50, p.225-232, 1994.
- Fortune JE, Rivera GM, Evans ACO, Turzillo AM. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biol. Reprod.* v.65, p.648-654, 2001.
- Fortune JE, Rivera GM, Yang MY. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Anim. Reprod. Sci.* v.82-83, p.109-126, 2004.
- Galloway SM., McNatty KP, Cambridge LM, Ritvos O. Mutation in an oocyte derived growth factor gene (BMP-15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat.*

Genet. v.25, p.279-283, 2000.

Gilchrist RB, Ritter LJ, Armstrong DT. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Anim. Reprod. Sci.* v.82-83, p.431-446, 2004.

Ginther OJ, Wiltbank MC, Fricke PM, Gibbons JR., Kot K. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol. Reprod.* v.55, p.1187-1194, 1996.

Ginther OJ, Beg MA, Donadeu FX, Bergfelt DR. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Anim. Reprod. Sci.* v.78, p.239-257, 2003.

Gong JG, Campbell BK, Bramley TA, Gutierrez CG, Peters AR, Webb R. Suppression in the secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Biol. Reprod.* v.55, p.68-74, 1996.

Gospodarowicz D, Plouet J, Fujii DK. Ovarian germinal epithelial cells respond to basic fibroblast growth factor and express its gene: implications for early folliculogenesis. *Endocrinology.* v.125, p.1266-1276, 1989.

Greene JM, Li YL, Yourey PA, Gruber J, Carter KC, Shell BK, Dillon, PA, Florence C, Duan DR, Blunt A, Ornitz DM, Ruben SM, Alderson RF. Identification and characterization of a novel member of the fibroblast growth factor family. *Euro J. Neurosci.* v.10, p.1911-1925, 1998.

Gutierrez CG, Ralph JH, Telfer EE, Wilmut I, Webb R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in vitro. *Biol. Reprod.* v.62, p.1322-1328, 2000.

Herrlich A, Kühn B, Grosse R, Schmid A, Schultz G, Gudermann T. Involvement of Gs and Gi proteins in dual coupling of the luteinizing hormone receptor to adenylyl cyclase and phospholipase C. *J. Biol. Chem.* v.271, p.16764-16772, 1996.

Joyce IM, Clark AT, Pendola FL, Eppig JJ. Comparison of recombinant growth factor-9 and oocyte regulation of Kit ligand messenger ribonucleic acid expression in mouse ovarian follicles. *Biol. Reprod.* v.63, p.1669-1675, 2000.

Juengel JL, Hudson NL, Heath DA, McNatty, KP. Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. *Biol. Reprod.* v.67, p.1777-89, 2002.

Juengel JL, Bondenstein DA, Heath NL, Hudson NL, Moeller CL, Smith P, Galloway SM, Davis GH, Sawyer HR, MacNatty KP. Physiology of GDF9 and BMP15 signaling molecules. *Anim. Reprod. Sci.* v.82-83, p.447-460, 2004.

Kim I, Moon S, Yu K, Kim U, Koh GY. A novel fibroblast growth factor receptor-5 preferentially expressed in the pancreas. *Biochim. Biophys. Acta.* v.1518, p.152-156, 2001.

Kissel H, Timokhina I, Hardy MP, Rothschild G, Tajima Y, Soares V, Angeles M, Whitlow SR, Manova

- K, Besmer P. Point mutation in kit receptor tyrosine kinase reveals essential roles for kit signaling in spermatogenesis and oogenesis without affecting other kit responses. *Embo J.* v.19, p.1312-1326, 2000.
- Lavranos TC, Rodgers HF, Bertonecello I, Rodgers RJ. Anchorage-independent culture of bovine granulosa cells: the effects of basic fibroblast growth factor and dibutyryl cAMP on cell division and differentiation. *Exp. Cell. Res.* v.211, p.245-251, 1994.
- Mazerbourg S, Overgaard TM, Oxvig C, Christiansen M, Conover AC, Laurendeau I, Vidand M, Tosser-Klopp G, Zapf J, Monget P. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) in ovine, bovine, porcine and equine ovarians follicles: involvement in IGF binding protein-4 proteolytic degradation and mRNA expression during follicular development. *Endocrinology.* v.142, p. 5243-5253, 2001.
- McGrath SA, Esquela AF, Lee S. Oocyte-specific expression of growth differentiation factor 9. *Mol. Endocrinol.* v.9, p.131-136, 1995.
- McNatty KP, Heath DA, Lundy T, Fidler AE, Quirke L, O'connell A., Smith P, Groome N, Tisdall DJ. Control of early ovarian follicular development. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* v.54, p.3-16, 1999.
- Mihm M, Austin EJ, Good TEM, Ireland JLH, Knight PG, Roche JF, Ireland JJ. Identification of potential intrafollicular factors involved in selection of dominant follicles in heifers. *Biol. Reprod.* v. 63, p. 811-819, 2000.
- Mihm M, Crowe MA, Knight PG, Austin EJ. Follicle Wave Growth in Cattle. *Reprod. Domest. Anim.* v.37, p.191-200, 2002.
- Nilsson E, Parrott JA, Skinner MK. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* v.175, p.123-130, 2001.
- Nilsson E, Skinner MK. Cellular interactions that control primordial follicle development and folliculogenesis. *J. Soc. Gynecol. Invest.* v.8, p.17-20, 2001.
- Nogueira MFG, Pinto MLG, Rainho CA, Avellar MCW, Price CA, Buratini Jr J, Barros CM. Expressão das isoformas do gene codificador do receptor de LH em células da teca e da granulosa de folículos antrais bovinos. *Acta Scientiae Veterinariae*, 2005a (resumo aceito).
- Nogueira MFG, Buratini Jr J, Barros CM. Tratamento com HCG e LH, como indutores da ovulação em doadoras superestimuladas da raça nelore, não altera a produção embrionária ou a taxa de prenhez. *Acta Scientiae Veterinaria*, 2005b (resumo aceito).
- Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, Mcewen DG, Macarthur GA, Coulier F, Gao G, Goldfarb M. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J. Biol. Chem.* v.271, p.15292-15297, 1996.
- Otsuka F, Yao Z, Lee T, Yamamoto S, Erickson GF, Shimasaki S. Bone morphogenetic protein-15: identification of target cells and biological functions. *J. Biol. Chem.* v.275, p. 39523-8, 2000.

- Otsuka F, Yamamoto S, Erickson GF, Shimasaki S Bone morphogenetic protein-15 inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action by suppressing FSH receptor expression. *J. Biol. Chem.* v.276, p. 11387-11392, 2001.
- Otsuka F, Shimasaki S. A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein-15 and granulosa cell kit ligand: its role in regulating granulosa cell mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v.89, p.8060-8065, 2002.
- Parrott JA, Vigne JL, Chu BZ, Skinner MK. Mesenchymal-epithelial interactions in the ovarian follicle involve keratinocyte and hepatocyte growth factor production by thecal cells and their action on granulosa cells. *Endocrinology.* v.135, p.569-575, 1994.
- Parrott JA, Skinner MK. Thecal cell-granulosa cell interactions involve a positive feedback loop among keratinocyte growth factor, hepatocyte growth factor and kit-ligand during ovarian follicular development. *Endocrinology.* v.139, p.2240-2245, 1998.
- Parrot JA, Skinner MK. Kit ligand actions on ovarian stromal cells: effects on theca cell recruitment and steroid production. *Mol. Reprod. Dev.* v.55, p.55-64, 2000.
- Puscheck EE, Patel Y, Rappolee DA. Fibroblast growth factor receptor (FGFR-4), but not FGFR-3c is expressed in the pregnant ovary. *Mol. Reprod. Dev.* v.132, p.169-76, 1997.
- Sartori R, Fricke PM, Ferreira JCP, Ginther OJ, Wiltbank MC. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biol. Reproduction.* v.65, p.1403-1409, 2001.
- Sartorelli E, Carvalho L, Bergfelt D, Ginther O, Barros C. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. *Theriogenology.* v.63, p.2382-2394, 2005.
- Sleeman M, Fraser J, Mcdonald M, Yuan S, White D, Grandison P, Kumble K, Watson JD, Murison JG. Identification of a new fibroblast growth factor receptor, FGFR-5. *Gene.* v.271, p.171-182, 2001.
- Silva JM, Price CA. Insulin and IGF-I are necessary for FSH-induced cytochrome P450 aromatase but not cytochrome P450 side-chain cleavage gene expression in oestrogenic bovine granulosa cells in vitro. *J. Endocrinol.* v.174, p.499-507, 2002.
- Silva JR, Van den Hurk R, Van Tol HT, Roelen BA, Figueiredo JR. Expression of growth differentiation factor 9 (GDF9), bone morphogenetic protein 15 (BMP15), and BMP receptors in the ovaries of goats. *Mol. Reprod. Dev.* v. 70, 2005. Abstract.
- Shimasaki S, Moore RK, Erickson GF, Otsuka F. The role of bone morphogenetic proteins in ovarian function. *Reproduction.* v. 61, p. 323-337, 2003.
- Spicer LJ. Proteolytic degradation of insulin-like growth factor binding proteins by ovarian follicles: a control mechanism for selection of dominant follicles. *Biol. Reprod.* v. 70, p. 1223-1230, 2004.
- Tanaka A, Miyamoto K, Minamino M, Takeda M, Sato B, Matsuo H, Matsumoto K. Cloning and characterization of androgen-induced growth factor essential for the androgen-dependent growth of

- mouse mammary carcinoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. v.89, p.8928-8932, 1992.
- Valve E, Penttilä T, Paranko J, Härkönen P. FGF-8 is expressed during specific phases of rodent oocyte and spermatogonium development. Biochem. Biophys. Res. Commun. v.232, p.173-177, 1997.
- Van Wezel IL, Umaphysivam K, Tilley WD, Rodgers RJ. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in bovine ovarian follicles. Mol. Cell. Endocrinol. v.115, p.133-140, 1995.
- Vernon RK, Spicer LJ. Effects of basic fibroblast growth factor and heparin on follicle-stimulating hormone-induced steroidogenesis by bovine granulosa cells. J. Anim. Sci. v.72, p.2696-2702, 1994.
- Vitt UA, Mcgee EA, Hayashi M, Hsueh AJW. In vivo treatment with GDF-9 stimulates primordial and primary follicle progression and theca cell marker CYP17 in ovaries of immature rats. Endocrinology. v.141, p.3814-3820, 2000a.
- Vitt UA, Hayashi M, Klein, C., Hsueh, A.J.W. Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles. Biol. Reprod. v.62, p.370-377, 2000b.
- Wandji SA, Pelletier G, Sirard MA. Ontogeny and cellular localization of 125I-labeled basic fibroblast growth factor and 125I-labeled epidermal growth factor binding sites in ovaries from bovine fetuses and neonatal calves. Biol. Reprod. v.47, p.807-813, 1992.
- Webb R, Nicholas B, Gong JG, Campbell BK, Gutierrez CG, Garverick, HA, Armstrong DG. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. Reprod. Suppl. v.61, p.71-90, 2003.
- Yang X, Kubota C, Suzuki H, Taneja M, Bols PEJ, Presicce, GA. Control of oocyte maturation in cows - biological factors. Theriogenology. v.49, p.471-482, 1998.
- Yoshida H, Takakura N, Kataoka H, Kunisada T, Okamura H, Nishikawa S. Stepwise requirement of c-Kit tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development. Dev. Biol. v.184, p.122-37, 1997.
- Yuan W, Bao B, Garverick HA, Youngquist RS, Lucy MC. Follicular dominance in cattle is associated with divergent patterns of ovarian gene expression for insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-II binding protein-2 in dominant and subordinate follicles. Domes. Anim. Endocrinol. v. 15, p.55-63, 1998.

PERSPECTIVAS PARA O USO DE BIOTECNOLOGIAS NA REPRODUÇÃO EQUINA

Edward L. Squires

Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory
Colorado State University - Fort Collins, CO 80523 USA - esquires@colostate.edu

Introdução

O uso da transferência de embrião e o desenvolvimento da tecnologia de embriões têm crescido dramaticamente durante a década passada. Atualmente, a coleta e a transferência de embriões transportados frescos e resfriados é comum na maioria das raças eqüinas. Os Estados Unidos e o Brasil são líderes mundiais no número de transferências de embriões em eqüinos. Desde 2002, a maior associação eqüina, a Associação Americana do Cavalo Quarto de Milha e a Associação Americana do Paint Horse têm permitido um número ilimitado de potros registrados por égua durante um determinado ano utilizando-se a transferência de embriões. Isso tem sido responsável pela duplicação do número de transferência de embriões realizadas a cada ano nos Estados Unidos. O registro múltiplo de potros por determinada égua também tem aumentado dramaticamente o preço de éguas geneticamente superiores. Além disso, tem existido uma demanda a respeito do desenvolvimento de técnicas visando a melhoria da performance reprodutiva de éguas e garanhões mais idosos.

Isso tem estimulado mais pesquisas utilizando-se técnicas como a superovulação, congelamento de embriões, fertilização *in vitro*, injeção intracitoplasmática de espermatozóides, transferência de oócitos, clonagem e congelamento de oócitos. Esta revisão dará uma perspectiva sobre o status de cada uma dessas técnicas e sobre a sua praticidade na indústria eqüina.

Palavras chave: eqüino, embrião, tecnologias

Superovulação

Atualmente, a maioria dos embriões recuperados são oriundos de ovulações simples espontâneas, resultando em uma taxa de coleta de embriões de 50% por tentativa. Um dos maiores custos da transferência de embriões é a manutenção das éguas receptoras quando não há embriões disponíveis para transferência. Um método que diminui substancialmente este custo é o aumento do número de embriões recuperados por doadora através da indução de múltiplas ovulações. Outras vantagens relativas ao aumento do número de folículos em desenvolvimento seriam a coleta de oócitos para utilização na fertilização *in vitro* ou na transferência de oócitos. A maioria dos estudos sobre indução da superovulação em éguas tem utilizado o extrato de pituitária eqüina (EPE), contendo altas concentrações de (FSH). O trabalho inicial utilizando-se EPE para a indução da ovulação foi conduzido

em éguas pôneis em Wisconsin durante ambos os períodos de anestro e estação de monsta. Douglas[5] relatou uma taxa de ovulação de 2.3 por égua recebendo EPE, uma vez ao dia, durante sete dias versus uma ovulação obtida em éguas controle não tratadas.

Uma média de 3 ovulações por égua foi relatada por Woods e Ginther [27] utilizando-se EPE. Squires et al.[23] relataram 3.8 ovulações por égua tratada com EPE e 2 embriões recuperados por égua, sendo comparado a 1.2 ovulações, em éguas controle não tratadas e 0.65 embriões por ciclo.

Inúmeros estudos têm sido conduzidos na Colorado State University durante as últimas duas décadas, avaliando a resposta das éguas ao EPE. A taxa de ovulação tem variado de 2.3 a 3.9 ovulações por égua. Baseando-se em 170 éguas tratadas com EPE na Colorado State University, uma média de 3.2 ovulações foi detectada e 1.96 embriões foram recuperados por égua comparados a 0.56 embriões recuperados de éguas controle não tratadas. As éguas responderam melhor ao EPE quando a administração foi realizada no início do ciclo (dia 5 versus dia 12) [4].

Recentemente, um produto comercial a base de extrato de pituitária purificado (eFSH) tornou-se disponível pela empresa Bioniche Animal Health (Athens, GA, USA). Uma série de estudos estão sendo conduzidos em nosso laboratório avaliando as respostas de éguas recebendo o eFSH. No primeiro experimento preliminar, 12 mg de eFSH foram administrados duas vezes ao dia, seguindo-se a administração de hCG uma vez que as éguas apresentassem folículos pré-ovulatórios, resultando em 3.4 ovulações por égua e aos 14 dias após inseminação, resultando em uma taxa de prenhes de 1.8 por égua versus 0.6 de prenhes por égua controle não tratada [8]. No Brasil, 16 éguas foram utilizadas durante 2 ciclos[22]. O primeiro ciclo foi considerado como sendo ciclo controle e no segundo ciclo, as éguas receberam eFSH (12,5 mg, duas vezes ao dia). A recuperação de embriões foi realizada 7 dias após a ovulação. No ciclo controle, um folículo por égua foi ovulado, recuperando-se 0,5 embriões por égua.

Ao contrário, éguas recebendo eFSH apresentaram 3,6 ovulações e 1.9 embriões recuperados por égua. Squires et al. [24] relataram sobre o efeito do atraso na administração do hCG por aproximadamente 1,5 dias após o final do tratamento com eFSH. Também testaram o uso de 12,5 mg duas vezes ao dia versus 25 mg uma vez ao dia. Um quarto tratamento avaliou os possíveis benefícios do efeito da adição do LH ao FSH durante a última parte do período de tratamento. A média do número de dias que as éguas foram tratadas foi similar entre os grupos (ex; aproximadamente 6 dias). No entanto, o número de folículos pré-ovulatórios, após o tratamento com o eFSH foi mais alto em éguas onde o hCG foi atrasado, do que nos outros grupos. A taxa de ovulação foi menor para as éguas recebendo eFSH uma vez ao dia versus duas vezes ao dia, e não percebeu-se vantagens na adição do LH ao tratamento com eFSH.

Com base nos 73 ciclos, aproximadamente 85% das éguas tiveram ≥ 2 ovulações. No geral, a taxa de recuperação embrionária não diferiu entre os grupos e foi aproximadamente de 2 embriões por lavado.

Estudos em andamento na Colorado State University estão designados para a avaliação do efeito da administração de progesterona e estradiol antes do início do eFSH. A recuperação embrionária foi maior nas éguas que não foram tratadas com progesterona e estradiol, antes do início do eFSH versus aquelas que foram tratadas com progesterona e estradiol antes do eFSH (2,7 embriões por

lavado vs 1 embrião por lavado, respectivamente). Um segundo estudo avaliou a possibilidade dos efeitos deletérios no tratamento de éguas com eFSH durante três ciclos consecutivos. Essas éguas foram comparadas àquelas recebendo a administração de eFSH durante ciclos alternados. Nenhum efeito adverso parece ter ocorrido no tratamento de éguas com o eFSH durante três ciclos consecutivos.

Uma das limitações na utilização do eFSH é o custo da administração da droga durante 6 a 7 dias. Desta maneira, um estudo foi conduzido para que fosse investigado, se o tratamento durante 3 dias seria capaz de fornecer a mesma resposta do tratamento durante um longo período de tratamento. Embora utilizando-se apenas 10 éguas, a taxa de ovulação e a taxa de recuperação embrionária pareceu similar entre os dois grupos. Nossas estratégias atuais quanto ao uso do eFSH consistem em examinar a égua com ultra-sonografia iniciando-se 5 a 7 dias após a ovulação. Uma vez que as éguas tenham adquirido folículos entre 20 e 25 mm, o eFSH seria iniciado. O tratamento é continuado diariamente até que a maioria dos folículos atinjam de 32 to 33 mm. O tratamento com o eFSH é então interrompido e o hCG é administrado aproximadamente 36 a 40 horas mais tarde.

Com a estratégia citada, a média do número de dias que a égua deve ser submetida ao tratamento é de apenas aproximadamente 4 dias.

Uma outra maneira de diminuir a quantidade de eFSH necessária para a superovulação é a utilização de doses mais baixas do que a recomendada, de 12 mg duas vezes ao dia. Baseando-se em estudos conduzidos por Alvarenga et al. (não publicado), uma dose de 6 a 9 mg administrada duas vezes ao dia, talvez fosse o suficiente para induzir a superovulação na maioria das éguas. A intenção de se utilizar uma dose baixa de tratamento, seria fornecer duas ou três ovulações acompanhadas de um a dois embriões por lavado.

O cenário ideal seria melhorar a recuperação embrionária sem incorrer em custos tremendos. Através do uso de tratamentos curtos de três a quatro dias ou possivelmente de tratamentos utilizando-se baixas doses, a quantidade de eFSH poderia ser minimizada. Além disso, a maioria dos criadores não estão interessados na obtenção de quatro ou cinco embriões provenientes de uma determinada combinação égua-garanhão.

A maioria dos criadores está satisfeita com a obtenção de um ou dois embriões por ciclo, desta maneira podendo mudar o garanhão no ciclo subsequente tendo uma combinação genética diferente dentro de uma determinada estação de monta.

Alguns dos problemas com o uso da eFSH são: falha na ovulação dos folículos, uma vez atingindo o tamanho pré- ovulatório, estimulação exagerada do ovário acompanhada por uma pobre recuperação embrionária por ovulação. Idealmente, a recuperação de um embrião a cada duas ovulações (50% de recuperação por ovulação) seria o que gostaríamos de alcançar. No entanto, em algumas situações as éguas ovulam um grande número de folículos, mas a recuperação é bem baixa. Em outras situações, as éguas desenvolvem inúmeros folículos grandes, mas nenhum dos folículos responde ao hCG ou ao GNRH através da ovulação.

Estudos adicionais são necessários para investigar a causa dos folículos anovulatórios nas éguas superestimuladas e a pobre recuperação embrionária por ovulação em alguns casos.

Vitrificação de embriões

O número de embriões eqüinos congelados e transferidos até a presente data é uma pequena porcentagem do total de embriões transferidos. Geralmente, uma baixa taxa de recuperação embrionária em éguas de clientes, não disponibiliza embriões extra, para o congelamento. Ao contrário do que ocorre com a indústria bovina, onde aproximadamente metade dos embriões bovinos coletados são congelados para uma transferência subsequente. O uso do eFSH para a indução de ovulação fornece embriões que poderiam ser usados para o congelamento e subsequente transferência.

Existem muitas vantagens na congelação de embriões eqüinos. A habilidade em importação e exportação de embriões eqüinos poderia grandemente reduzir os custos de se introduzir uma nova genética em um país.

Outra vantagem inclui a preservação do material genético de uma égua superior para o congelamento de embriões. O congelamento reduziria também o número de receptoras necessárias nos programas de transferência de embriões. Se o número de receptoras ficasse reduzida, então o embrião poderia ser congelado e transferido mais tarde, quando as receptoras estivessem disponíveis. Similarmente, se as receptoras estivessem não sincronizadas com a égua doadora, o embrião poderia ser congelado e transferido mais tarde.

Yamamoto [29] relatou o nascimento do primeiro potro originado de um embrião congelado. Takeda et al. [26] na Colorado State University obtiveram uma taxa de prenhes de 50% de embriões D6 transferidos a receptoras. Um estudo subsequente no nosso laboratório demonstrou claramente o efeito do tamanho do embrião na taxa de prenhez. Dezesete embriões congelados em 10% de glicerol foram cirurgicamente transferidos dentro do útero de éguas receptoras. Nove de dezessete resultaram em prenhez viável. No entanto, oito de nove receptoras, que tornaram se prenhes receberam blastocistos iniciais, embora apenas um de sete blastocistos expandidos transferidos, resultaram em vesícula embrionária. Sabendo-se que embriões eqüinos grandes não sobrevivem a criopreservação, muitos dos estudos subsequentes focaram-se nos protocolos de congelamento de embriões pequenos. Meira et al. [17] compararam a eficiência de 11% de glicerol, e 11% de 1,2 propanodiol utilizando-se embriões coletados no dia 6 ou 7. Seis de 15 (40%) de mórulas, e blastocistos iniciais criopreservados em glicerol resultaram em prenhez. Nenhuma das 15 mórulas e blastocistos iniciais congelados em 1,2 propanodiol desenvolveram-se após a transferência. Adicionalmente, nenhum dos 15 blastocistos expandidos criopreservados em glicerol resultaram em prenhez.

Na Argentina, veterinários têm sucesso com a comercialização de embriões congelados [13] relatando uma taxa de prenhez de 56% em embriões eqüinos pequenos. Maclellan et al. [14] relataram uma taxa de prenhez similar entre embriões pós- descongelamento e embriões não congelados, medindo $<300 \mu$. Doze dos 17 embriões eqüinos congelados resultaram em prenhez aos 16 dias pós – transferência comparado a 14 de 20 embriões controle não congelados.

Um protocolo típico para o resfriamento-congelamento lento de embriões pequenos inclui a adição de glicerol em duas etapas, 5% de glicerol por 10 minutos e 10% de glicerol por 20 minutos. Os embriões são colocados dentro de palhetas plásticas de 0.25 ml e estas são colocadas em uma máquina de congelamento programada. Eles são resfriados partindo-se de uma temperatura ambiente

de -6°C a 4°C/min, por 10 minutos e então resfriados a -33°C, com uma velocidade de 0.3 to 0.5°C/min, antes de ser emergidos em nitrogênio líquido. O método de resfriamento lento para embriões congelados requer o uso de freezer programável.

Um outro método de congelamento que tem sido utilizado com sucesso em outras espécies é a vitrificação. O método é definido como sendo a solidificação de uma solução através de uma elevação extrema da viscosidade durante o resfriamento, mas não durante a cristalização. O procedimento de vitrificação elimina a necessidade de equipamentos dispendiosos e reduz o tempo associado aos métodos convencionais de resfriamento lento na criopreservação. Oberstein et al. [19] compararam o resfriamento lento convencional com o a vitrificação utilizando-se embriões medindo 150 to 300 µ em diâmetro.

Não foram encontradas diferenças no grau de classificação embrionária ou na porcentagem de células vivas entre os tratamentos. Recentemente, Eldridge-Panuska [6] avaliaram a taxa de prenhez de embriões vitrificados, previamente congelados e descongelado. Nesse estudo, embriões pequenos (>300 µ), mórulas ou blastocistos iniciais e blastocistos grandes (>300 µ) foram vitrificados. Os embriões foram coletados 8 dias após a administração de hCG visando a recuperação de embriões pequenos. Os embriões foram inicialmente colocados em uma solução 1 de vitrificação, contendo 1.4 M de glicerol em salina fosfatada. Após 5 minutos, os embriões foram colocados em uma segunda solução de vitrificação contendo 1.4 M de glicerol+ 3.6 M de etilenoglicol. Após 5 minutos na solução citada, o embrião foi colocado em uma solução final de vitrificação contendo 3.4 M de glicerol e 4.6 M de etilenoglicol. O embrião permaneceu nesta solução final por <1 min antes de ser colocado dentro da palheta de 0.5- ml. Esta palheta foi lacrada pelo calor e colocada dentro de um globete de plástico resfriado e suspensa verticalmente no nitrogênio líquido dentro de uma caixa de isopor. O nitrogênio líquido fica ao redor do globete, embora apenas o vapor de nitrogênio tem contato com a palheta. Após 1 minuto, o globete e a palheta foram emergidos no nitrogênio líquido. Os embriões foram descongelados a temperatura ambiente por 10 segundos antes de serem colocados em contato com água a 22°C por 10 segundos. A transferência dos blastocistos >300µ não levou a obtenção de prenhez. A transferência de mórulas ou blastocistos iniciais vitrificados em PBS, resultaram em 4 prenhez de 6 transferências. Em um segundo experimento os embriões foram vitrificados em PBS com etilenoglicol e glicerol, de acordo com os procedimentos do primeiro experimento. A taxa de prenhez aos 16 dias, foi de (54%), sendo 26 prenhez de 48 transferências.

Recentemente em nosso laboratório, Hudson et al. [11] conduziram um estudo para a determinar se o resfriamento por 12 a 19 horas antes da vitrificação resultaria em taxas de prenhez similares aos embriões vitrificados imediatamente após a coleta, sendo provenientes de éguas superovuladas. Quarenta éguas foram superovuladas utilizando-se o eFSH. Os embriões foram recuperados aos 6.5 dias pós – ovulação ou 8 dias após o hCG. Quarenta mórulas e blastocistos iniciais com um grau de 1 a 2, sendo <300 µ em diâmetro, foram aleatoriamente distribuídos entre dois tratamentos: Grupo 1 – embriões lavados 4 vezes em um meio de manutenção comercial e então vitrificados; Grupo 2- embriões lavados 3 vezes e então mantidos no mesmo meio de manutenção entre 5 e 8°C, dentro de um container de resfriamento passivo (Equitainer, Hamilton Thorne, Beverly, MA, USA) entre 12 e 19 horas antes da vitrificação. Os embriões foram vitrificados de acordo com o procedimento descrito

por Eldridge-Panuska et al. [6]. Durante o descongelamento, os embriões foram aquecidos mantendo-se as palhetas em temperatura ambiente por 10 segundos, sendo então emergidas em banho-maria a 22°C durante 10 segundos adicionais. O conteúdo das palhetas foi transferido diretamente para uma receptora que havia ovulado previamente entre 4 a 6 dias. Não houve diferenças no diâmetro do embrião, grau ou classificação morfológica entre os grupo tratados antes da vitrificação. As taxas de prenhez não diferiram entre embriões vitrificados imediatamente após a coleta (15 de 20, 75%) e embriões resfriados entre 12 e 19 horas antes da vitrificação (13 de 20, 65%). Baseado nesses resultados, embriões pequenos podem ser armazenados entre 5 a 8°C durante 12 a 19 horas antes da vitrificação, sem perda de viabilidade.

Baseado nesses dois resultados recentes, embriões eqüinos pequenos foram vitrificados, resultando em altas taxas de prenhez após a transferência não cirúrgica. O esquema mais simples para obtenção de embriões pequenos, como mórulas ou blastocistos iniciais consiste em lavar o útero da égua 8 dias após a administração de hCG. É bem provável, que assim que, as associações aprovarem o registro dos potros oriundos de embriões eqüinos descongelados, então a vitrificação de embriões se tornará um procedimento comum devido aos benefícios do congelamento de embriões.

Congelamento de Oócitos

A preservação do material genético proveniente de éguas valiosas que morrem inesperadamente ou daquelas que devem ser submetidas à eutanásia seria bem propícia. No entanto, técnicas têm sido publicadas para a criopreservação de oócitos provenientes de uma variedade de espécies, com uma taxa de prenhez relativamente baixa após a inseminação desses oócitos.

Estudos envolvendo a criopreservação de oócito eqüinos são limitados. As taxas de sobrevivência de 16% foram relatadas para oócitos eqüinos criopreservados em etilenoglicol utilizando-se o protocolo de resfriamento lento [9] e 17% com a utilização do procedimento de vitrificação [10]. Hurtt et al. [12] comparam a viabilidade de oócitos maduros e imaturos das espécies eqüinas e bovinas, vitrificados em etilenoglicol, sendo suplementado com Ficoll e sucrose. O oócitos foram armazenados em palhetas. Esses oócitos foram coletados de ovários oriundos de abatedouros, sendo vitrificados imediatamente ou maturados por 36 a 48 horas e então vitrificados. Após a vitrificação, oócitos eqüinos mostraram taxas de maturação até o estágio de MII de 30, 40 e 45% para os oócitos imaturos, maduros e controle, respectivamente. Isso foi comparado com 60, 70 e 77% para oócitos bovinos submetidos aos mesmos tratamentos. Oócitos imaturos sobreviveram à vitrificação assim como os oócitos maduros.

Baseado nas determinações de vivos e mortos, os oócitos eqüinos apresentaram 36, 33 e 43% de células vivas quando comparados com oócitos bovinos com taxas de 46, 50 e 70% para os três grupo tratados, respectivamente. Oitenta e um por cento dos oócitos eqüinos imaturos maturaram até MII após a vitrificação. As porcentagens de oócitos eqüinos que apresentaram ambos os núcleos e citoplasmas maturados para os três grupos foram de 20, 30 e 45%. Esses autores concluíram que, ambos os oócitos eqüinos, maduros e imaturos sobrevivem a criopreservação utilizando-se vitrificação e palhetas “open -pulled”. No entanto, a taxa de sobrevivência foi menor para oócitos eqüinos do

que para oócitos bovinos.

Maclellan et al. [16], em nosso laboratório, avaliaram os efeitos benéficos da adição de sucrose ou trealose às soluções de vitrificação antes da vitrificação de oócitos eqüinos maduros e imaturos. Após o descongelamento, os oócitos foram submetidos ao cultivo durante 14 horas (oócitos imaturos) ou 2 horas (oócitos maduros) e então realizou-se a injeção intra-citoplasmática do espermatozóide (ICSI). Controles não vitrificados foram cultivados por 26 horas e então a ICSI foi realizada. Todos os oócitos foram cultivados por 20 horas após a ICSI. As taxas de fertilização foram similares para vitrificados e controle-não vitrificados, não havendo maiores diferenças entre os dois açúcares. Estes mesmos autores [15] transferiram oócitos vitrificados em éguas receptoras que haviam sido inseminadas, sendo que, dos 26 oócitos vitrificados, sete foram determinados como anormais após o descongelamento e não foram transferidos. Três gestações foram obtidas com dois potros vivos produzidos desses oócitos vitrificados.

É provável, que assim que, a vitrificação de oócitos em outras espécies evolua, os mesmos procedimentos serão aplicados ao cavalo. Seria uma grande vantagem coletar oócitos de éguas que morrerem e preservar esses oócitos, assim como coletar oócitos de éguas jovens para a obtenção de um banco de material genético de éguas valiosas.

Transferência de oócitos

A transferência de oócitos é frequentemente utilizada como um método para a obtenção de embriões provenientes de éguas problemas. Essas éguas, uma vez tendo falhado no fornecimento de embriões ou nas prenhez oriundas da transferência de embriões, talvez tenham problemas ovulatórios, infecção uterina persistente, piometra e / ou cervix lacerada. A transferência de oócitos envolve a coleta de um oócito de uma égua doadora e a transferência deste oócito para o oviduto de éguas receptoras. O oócito é então maturado *in vivo*. A receptora é inseminada, de maneira que fertilização e o desenvolvimento embrionário inicial ocorram dentro do oviduto.

A demanda por transferência de oócitos tem crescido durante os últimos anos. Carnevale and Ginther [1] relataram altas taxas de desenvolvimento embrionário (11 of 12, 92%) após a coleta de oócitos de doadoras jovens sob condições experimentais, sendo esses oócitos submetidos à cultura *in vitro* antes da transferência para o oviduto de receptoras inseminadas. O uso clínico da transferência de oócitos para a obtenção de produtos oriundos de éguas problemas não ocorreu até 1990.

Carnevale et al. [2] conduziram recentemente uma análise retrospectiva do programa comercial de transferência de oócitos na Colorado State University de 2000 até 2004. Os objetivos foram revisar o sucesso da transferência de oócitos no aspecto clínico e determinaram-se os fatores potenciais que afetam as taxas de prenhez.

Oócitos foram coletados por aspiração folicular guiada por ultra-sonografia utilizando-se um transdutor linear 5-mHz. A maioria dos oócitos foram coletados entre 20 e 24 horas após a administração do hCG nas doadoras e cultivados *in vitro* para que completassem a maturação antes da transferência. As receptoras de oócitos eram cíclicas ou não cíclicas. As receptoras cíclicas foram sincronizadas com a doadora e receberam hCG no mesmo dia das doadoras. Os oócitos das receptoras

foram coletados através de aspiração folicular do folículo dominante. Éguas não cíclicas apresentaram mínima atividade, incluindo anestro, transição e éguas com folículos suprimidos. Os oócitos foram transferidos cirurgicamente através da abordagem pelo flanco com as éguas em estação.

As receptoras foram inseminadas antes e / ou diretamente após a transferência de oócitos com sêmen fresco, resfriado ou congelado. De 2000 a 2004, oócitos foram coletados em 86 éguas de várias raças. A média de idade das doadoras foi de 19.2 ± 0.4 anos de idade. Comparações foram feitas entre éguas com <20 anos de idade e aquelas com ≥ 20 anos de idade. Em média, doadoras apresentaram 4.8 folículos aspirados por estação de monta, com 3.7 oócitos recuperados por doadora. Oócitos foram coletados de 96% dos ciclos e de 77% dos folículos. A taxa de desenvolvimento embrionário por oócito transferido foi de 38% (207/548 aos 16 dias). Em 44 éguas, 2 oócitos foram transferidos para a mesma receptora. Quarenta e três por cento dessas receptoras tornaram-se prenhez. Prenhezes gemelares foram detectadas, em 14% das receptoras que receberam dois oócitos e uma vesícula foi destruída manualmente.

Aos 16 e 50 dias, 40% (201/504) e 32% (159/504) das receptoras com um ou dois oócitos transferidos foram diagnosticadas como prenhes. A taxa geral de perda embrionária entre 16 e 50 dias foi de 21%. O número de doadoras com pelo menos uma receptora prenhe aos 16 dias não diferiu para éguas com <20 e ≥ 20 anos de idade (39 de 45, 87% e 34 de 45, 76%, respectivamente). As taxas de prenhez foram similares para receptoras cíclicas e não cíclicas. A utilização de receptoras não cíclicas permite o uso de um menor número de éguas e melhor sincronização de receptoras e doadoras. Este estudo identificou dois fatores que demonstraram efeitos possivelmente negativos nas taxas de prenhez: qualidade e número de espermatozóide e idade das doadoras. Os resultados desses estudos e de estudos previamente publicados por nosso laboratório confirmam que gestações podem ser obtidas de éguas com anormalidades reprodutivas, as quais são consideradas inférteis, quando submetidas a procedimentos padrões de cobertura, como a inseminação artificial e a transferência de embriões.

Fertilização In Vitro

A fertilização in vitro é utilizada como um procedimento para a produção de embriões in vitro em diversas espécies, assim como para o tratamento da subfertilidade. Infelizmente, pouco progresso tem sido obtido no desenvolvimento de técnicas para a fertilização in vitro utilizando-se oócitos e espermatozoides eqüinos. De fato, é difícil encontrar relatos recentes sobre tentativas de realização da fertilização in vitro em cavalos. Disponibilidade limitada de oócitos, assim como uma tendência ao uso da injeção intracitoplasmática do espermatozóide (ICSI) como um método de fertilização, têm dificultado o progresso da fertilização in vitro.

Obviamente, os dois componentes da fertilização in vitro são: maturação oocitária e capacitação espermática. Durante muitos anos, foi difícil determinar se a falha da produção in vitro de embriões eqüinos ocorria devido a pobre maturação oocitária ou a falta de capacitação espermática. Com o desenvolvimento das técnicas para a transferência de embriões, podemos agora avaliar efetivamente os sistemas de maturação in vitro para oócitos eqüinos. Sabemos que, se oócitos maturados in vivo

forem coletados de éguas jovens e transferidos para o oviduto de receptoras que tenham sido inseminadas, uma taxa de prenhez de 70-80% pode ser obtida.

Scott et al. [2] coletaram oócitos de ovários obtidos em abatedouros e oócitos maturados in vitro durante aproximadamente 24 horas, antes da transferência para ovidutos de éguas inseminadas. A taxa de desenvolvimento embrionário foi de apenas 10%. Um estudo subsequente [20] comparou as taxas de desenvolvimento para oócitos transferidos de ovários transportados entre 18 a 24 horas utilizando-se duas temperaturas (12°C vs 22°C). Neste estudo, oócitos foram cultivados em meio EMM1 contendo 10 ng/ml de IGF, 100 ng/ml de EGF, 1 µg/ml de LH, 15 ng/ml de FSH, 1 µl/ml de E2, 200 ng/ml de progesterona de 10% soro fetal bovino. Após 24 horas de cultivo, oócitos múltiplos foram selecionados para cada temperatura relativa ao grupo e transferidos em receptoras.

Para cada transferência, entre 9 e 15 oócitos de cada grupo foram colocados dentro do oviduto de éguas em estro, utilizando-se a laparotomia pelo flanco, em estação. Os úteros das receptoras foram examinados para que se determinasse o número de embriões em desenvolvimento. A porcentagem de oócitos que se desenvolveram até vesículas embrionárias no dia 16 não foi diferente entre os grupos transportados (22°C = 13 de 73, 18% vs 12°C = 11 de 73, 15%).

Esses estudos indicam que os procedimentos para a maturação in vitro de oócitos eqüinos não tem sido otimizados. Estudos são necessários, nos quais os oócitos maturados in vivo seriam fertilizados in vitro, utilizando-se técnicas comprovadas de capacitação espermática. O uso de oócitos coletados in vivo poderia garantir que o oócito é capaz de ser fertilizado. O desenvolvimento de técnicas que assegurem a capacitação espermática de maneira adequada in vitro é desesperadamente necessária.

Injeção intracitoplasmática do espermatozóide (ICSI)

Embora a técnica padrão de fertilização in vitro não seja eficiente em cavalos, a fertilização in vitro de oócitos eqüinos utilizando-se a injeção intracitoplasmática do espermatozóide (ICSI) está se tornando cada vez mais comum. A ICSI está sendo utilizada para avaliar a habilidade do oócito maturado in vitro em ser fertilizado, assim como em produzir embriões para a avaliação dos sistemas de cultivo de embriões eqüinos. Clinicamente, a ICSI tem sido utilizada na produção de potros provenientes de garanhões que apresentam números baixos de espermatozoides. A injeção intracitoplasmática do espermatozóide requer oócitos maduros. Isso pode ser obtido por aspiração do folículo pré ovulatório ou obtido possivelmente por maturação in vitro de oócitos coletados de folículos pequenos, imaturos, de ovários de abatedouro ou pela aspiração de pequenos folículos imaturos utilizando-se a probe ultra-sonográfica de aspiração transvaginal.

A tremenda vantagem da ICSI é que, apenas um número pequeno de espermatozoides são requeridos e o espermatozóide pode ser fresco, resfriado ou congelado. Durante a ICSI, um espermatozóide é pego com uma micro pipeta e a membrana espermática é quebrada assegurando sua imobilidade e a liberação dos fatores citosólicos importantes para a ativação do oócito. O espermatozóide é então injetado dentro do citoplasma do oócito maturo. Squires et al. [25] relataram sobre o primeiro potro nascido através de ICSI em eqüinos. Quatro oócitos maturados in vitro

foram injetados com espermatozoides e transferidos para o oviduto de éguas receptoras. Uma prenhez foi obtida a qual resultou em um potro vivo saudável.

O sucesso da ICSI tem sido melhorado dramaticamente durante os últimos anos. Choi et al. [3] utilizando o sistema Piezo de injeção para a realização da ICSI, relataram uma taxa de clivagem de 80% para a injeção de oócitos maturados *in vitro*. Em nosso laboratório, a ICSI é utilizada para a obtenção de gestações oriundas de garanhões apresentando uma pobre qualidade de sêmen ou sêmen limitado. Recentemente, oócitos maturados *in vivo* foram obtidos de éguas experimentais e injetados com sêmen descongelado de garanhões mortos. Três embriões desenvolveram-se *intra-uterinamente* até o estágio de vesícula embrionária, sendo oriundos de quatro embriões colocados cirurgicamente no oviduto de uma receptora.

A ICSI tem sido utilizada rotineiramente em nosso laboratório para a produção de gestações a partir de garanhões sub-férteis. A maioria do nosso trabalho tem sido feita utilizando-se o sêmen congelado, sendo que alguns garanhões já se encontram mortos. Em outras ocasiões, os garanhões ainda estão vivos, mas a quantidade de sêmen é bem limitada. Geralmente, 30 a 40% dos oócitos injetados que são transferidos dentro dos ovidutos resultam em gestações viáveis que culminam com a produção de potros saudáveis e normais. Idealmente, os oócitos injetados deveriam ser submetidos a cultivo *in vitro* até o estágio de blastocisto, e então transferidos para a receptora através da transferência não cirúrgica. Pesquisadores da Texas A&M University [8] demonstraram que o cultivo de embriões produzidos pela ICSI- em DMEM/F12, em um ambiente com mistura de gases pode levar a um desenvolvimento de >35% blastocistos. O desenvolvimento de blastocistos provenientes de oócitos da ICSI varia de 23 a 42% utilizando-se o sistema DMEM/F12. Infelizmente, no entanto eles obtiveram uma taxa de prenhez de 50% após a transferência de embriões produzidos *in vitro*, com aproximadamente metade desses embriões sendo perdidos no início da gestação. Estudos adicionais são necessários para a otimização dos sistemas de cultivo de embrião necessários à produção de embriões *in vitro*.

Clonagem

A transferência nuclear (clonagem) permite a produção de potros com a mesma genética do doador. Desta maneira, é um método que preserva a genética de éguas extremamente valiosas. A demanda pela clonagem parece aumentar para aqueles clientes que possuem éguas e / ou garanhões valiosos. Um outro uso da clonagem é proporcionar uma cópia genética de um animal castrado. O clone nasceria com testículos e desta maneira, produzirá espermatozoides que irão carrear as mesmas características genéticas do animal clonado, originalmente castrado.

As técnicas de clonagem são bem similares às utilizadas na injeção intracitoplasmática do esperma. Os oócitos podem ser coletados de animais que morreram ou de animais vivos através da aspiração folicular guiada por ultra-sonografia. A coleta de oócitos de animais vivos pode tanto ser feita em folículos pequenos (oócitos imaturos) ou em folículos pré-ovulatórios (oócitos maduros).

Utilizando-se o mesmo material de micromanipulação, o oócito é enucleado e as células somáticas da doadora genética são injetadas dentro dos oócitos enucleados. Essas células podem ser

tanto células da pele, quanto células do feto ou do cumulus. A célula somática da doadora é selecionada e combinada com o oócito enucleado tanto através da fusão de duas células, usando pulso elétrico ou pela quebra da membrana da célula doadora, injetando-se a célula diretamente dentro do citoplasma do oócito. O oócito recombinante contendo o núcleo da doadora genética é então artificialmente ativado. O núcleo transferido é então descondensado e o oócito inicia o desenvolvimento embrionário.

Em 2003, três potros de mulas clonadas foram produzidos [28] e um potro equino clonado nasceu [7]. Três outros potros clonados nasceram em 2005 na Itália e dois na Texas A&M University [28]. De maneira contrária ao que se observa em bovinos, os potros clonados não necessitam de assistência e essencialmente todos os potros clonados até atualmente, nasceram normais. Infelizmente, muitos dos embriões reconstruídos que foram transferidos em receptoras resultaram em perda embrionária. Woods et al. [28] relataram o estabelecimento de 7 gestações de 62 oócitos transferidos, embora todas as gestações foram perdidas antes dos 80 dias. Este grupo utilizou oócitos maturados in-vitro e células de fetos de mula, e não de mulas adultas. O cavalo clonado produzido na Itália em 2003 [7] foi produzido utilizando-se fibroblastos adultos, oócitos maturados in vitro e cultivo embrionário até o estágio de blastocisto, antes da transferência transcervical ao útero de éguas receptoras. Naquele relato, 841 oócitos combinados foram cultivados, com o desenvolvimento de 22 blastocistos (3%). Dezessete blastocistos foram transferidos resultando em 4 prenhez (24% de taxa de prenhez após a transferência)

Das 4 prenhez, duas foram perdidas ao redor dos 30 dias, uma foi perdida aos 6 meses de gestação e uma foi levada a termo culminado com um nascimento normal. Para os potros nascidos na Itália em 2005, 200 oócitos recombinados foram cultivados, resultando em 34 embriões (17%) e 3 gestações (9% de taxa de prenhez), dos quais um produziu um potro viável. Na Texas A&M University em 2005 [8], 423 oócitos recombinados resultaram em 6 blastocistos (6%). Cinco foram transferidos e 3 prenhez foram obtidas (60%), das quais um potro viável foi produzido.

A taxa de desenvolvimento in vitro de blastocisto é obviamente muito mais baixa do que para embriões de ICSI (1 a 17% vs 25 a 30%). Os potros equinos clonados têm sido relatados como sendo saudáveis ao nascer, e tendo um desenvolvimento normal após o nascimento. Há pelo menos uma companhia comercial que tenta clonar equinos para clientes. Com a eficiência da clonagem equina tornando-se melhor, é bem provável que haverá uma maior demanda para este serviço. Será interessante saber se as associações irão permitir o registro de animais clonados. Atualmente, a Associação Americana do Cavalo Quarto de Milha, sendo a maior nos Estados Unidos, têm considerado como não legais os registros de potros nascidos através da clonagem. Nosso conselho para clientes é de que, as células de animais valiosos sejam obtidas e armazenadas para uso subsequente. O banco de células permite aos clientes decidirem no futuro, utilizar ou não essas células para a produção de potros clonados.

Como exatamente um potro clonado é em relação ao cavalo original, ainda necessita ser verificado. Embora os embriões reconstruídos tenham um DNA nuclear da doadora genética, a mitocôndria do DNA do oócito da receptora pode talvez ter algum efeito nas características do potro. Além do mais, o fenótipo do novo potro será afetado pelo ambiente, ambos no útero e no pós natal. Concluindo, o desenvolvimento genético do potro será influenciado pela expressão gênica. O

cliente deve saber dessas possibilidades antes de decidir investir o capital tremendo necessário para a clonagem de seus cavalos.

Referências

- 1 Carnevale E.M. & Ginther O.J. 1995. Defective oocytes as a cause of subfertility in old mares. **Biology of Reproduction Monogram**. 1:209-214.
- 2 Carnevale E.M., Coutinho da Silva M.A., Panzini D., Stokes J.E. & Squires E.L. 2005. Factors affecting the success of oocyte transfer in a clinical program for subfertile mares. **Theriogenology**. In Press.
- 3 Choi Y.H., Love C.C., Love L.B., Varner D.D., Brinsko S.P. & Hinrichs K. 2002. Developmental competence in vivo and in vitro of in vitro-matured equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection with fresh or frozen-thawed sperm. **Reproduction**. 123:455-465.
- 4 Dippert K.D., Hofferer S., Palmer E., Jasko D.J. & Squires E.L. 1992. Initiation of superovulation in mares 5 or 12 days after ovulation using equine pituitary extract with or without GnRH analog. **Theriogenology**. 38:695-710.
- 5 Douglas R.H. 1979. Review of induction of superovulation and embryo transfer in the equine. **Theriogenology**. 11:33-46.
- 6 Eldridge-Panuska W.D., Caracciolo di Brienza V., Seidel G.E. Jr., Squires E.L. & Carnevale E.M. 2005. Establishment of pregnancies after serial dilution or direct transfer by vitrified equine embryos. **Theriogenology**. 63:1308-1319.
- 7 Galli C., Lagutina I., Crotti G., Colleoni S., Turini P. & Ponderato N. 2003. A cloned horse born to its dam twin. **Nature**. 424:635.
- 8 Hinrichs K. 2005. Update on equine ICSI and cloning. **Theriogenology**. In Press.
- 9 Hochi S., Fujimoto T., Choi Y., Braun J. & Oguri N. 1994. Cryopreservation of equine oocytes by two-step freezing. **Theriogenology**. 42:1085-1094.
- 10 Hochi S., Kozawa M., Fujimoto T., Honda E., Yamada J., Oguri N. 1996. In vitro maturation and transmission electron microscope observation of horse oocytes after vitrification. **Cryobiology**. 33:300-310.
- 11 Hudson J., McCue P.M., Carnevale E.M., Welch S. & Squires E.L. 2005. The effects of cooling and vitrification of embryos from eFSH-treated mares on pregnancy rates after nonsurgical transfer. **Journal of Equine Veterinary Science**. Submitted.
- 12 Hurtt A.E., Landim-Alvarenga F., Seidel G.E. Jr. & Squires E.L. 2000. Vitrification of immature

- and mature equine and bovine oocytes in an ethylene glycol, Ficoll and sucrose solution using open pulled straws. **Theriogenology**. 54:119-128.
- 13 Lascombes F.A. & Pashen R.L. 2000. Results from embryo freezing and postovulation Cryopreservation of equine embryos using glycerol and 1,2 propanediol as cryoprotectants. **Equine Veterinary Journal**. Suppl 15:64-66.
- 14 Maclellan L.J., Carnevale E.M., Coutinho da Silva M.A., McCue P.M., Seidel G.E. Jr. & Squires E.L. 2002. Cryopreservation of small and large equine embryos pre-treated with cytochalasin B and/or trypsin. **Theriogenology**. 58:717-721.
- 15 Maclellan L.J., Carnevale E.M., Coutinho da Silva M.A., Scoggin C.F., Bruemmer J.E. & Squires E.L. 2002. Pregnancies from vitrified equine oocytes collected from superovulated and non-stimulated mares. **Theriogenology**. 58:911-919.
- 16 Maclellan L.J., Lane M., Simms M.M. & Squires E.L. 2001. Effect of sucrose or trehalose on vitrification of equine oocytes 12 or 24 hours after the onset of maturation. **Theriogenology**. 55:310.
- 18 Niswender K.D., Alvarenga M.A., McCue P.M., Hardy Q.P. & Squires E.L. 2003. Superovulation in cycling mares using equine follicle stimulating hormone (eFSH). **Journal of Equine Veterinary Science**. 23:497-500.
- 19 Oberstein N., O'Donovan M.K., Bruemmer J.E., Seidel G.E. Jr., Carnevale E.M. & Squires E.L. 2001. Cryopreservation of equine embryos by open pulled straw, cryoloop or conventional slow cooling methods. **Theriogenology**. 55:607-613.
- 20 Preis K.A., Carnevale E.M., Coutinho da Silva M.A., Caracciolo di Brienza V., Gomes G.M., Maclellan L.J. & Squires E.L. 2004. In vitro maturation and transfer of equine oocytes after transport of ovaries at 12 or 22°C. **Theriogenology**. 61:1215-1223.
- 21 Scott T.J., Carnevale E.M., Maclellan J., Scoggin C.F. & Squires E.L. 2001. Embryo development rates after transfer of oocytes matured in vivo, in vitro or within oviducts of mares. **Theriogenology**. 55:705-715.
- 22 Squires E.L., McCue P.M., Niswender K. & Alvarenga, M. 2003. A review on the use of eFSH to enhance reproductive performance. **Proceedings**, Annual Convention American Association of Equine Practitioners. 49:360-362.
- 23 Squires E.L., McKinnon A.O., Carnevale E.M., Morris R.P. & Nett, T.M. 1987. Reproductive characteristics of spontaneous single- and double-ovulating mares and superovulated mares. **Journal of Reproduction and Fertility**. Suppl. 35:399-403.
- 24 Squires E.L., Welch S.A., Denniston D.J., Bruemmer J.E. & McCue P.M. 2005. Evaluation of several eFSH treatments for superovulation in mares. **Proceedings**, Society for Theriogenology

Annual Meeting. In Press.

- 25 Squires E.L., Wilson J.M. & Blaszcyk A. 1996. A pregnancy after intracytoplasmic sperm injection into equine oocytes matured in vitro. **Theriogenology**. 45:306 (abstract).
- 26 Takeda T., Elsdon R.P. & Squires E.L. 1984. In vitro and in vivo development of frozen-thawed equine embryos. **Proceedings**, 10th International Congress on Animal Reproduction and AI. 2:246-247.
- 27 Woods G.L. & Ginther O.J. 1983. Induction of multiple ovulation during an ovulatory season in mares. **Theriogenology**. 20:347-355.
- 28 Woods G.L., White K.L., Vanderwall D.K., Li G.-P., Astin K.I. & Bunch T.D. 2003. A mule clone from fetal cells by nuclear transfer. **Science**. 301:1063.
- 29 Yamamoto Y., Oguri N. Tsutsumi Y. & Hachinohe Y. 1982. Experiments in freezing and storage of equine embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**. Suppl. 32:399-405.

EVOLUÇÃO DOS ANIMAIS DE PRODUÇÃO TRANSGÊNICOS

H. Niemann, W. Kues & J. W. Carnwath

Department of Biotechnology, Institute for Animal Breeding (FAL), Mariensee, 31535 Neustadt, Germany, niemann@tzv.fal.de

Este artigo foi publicado previamente na Rev. Sci. Tech Off Int. Epic. 24(1), 2005, com o título: “Transgenic farm animals - present and future” (Animais de produção transgênicos- presente e futuro).

Sumário

A microinjeção nuclear de ácido desoxirribonucléico (DNA) tem sido um método padrão para a produção de animais transgênicos. Esta técnica está sendo substituída por um protocolo mais eficiente, baseado na transferência nuclear somática, permitindo também detectar modificações genéticas. Os vetores lentivirais e a tecnologia de pequenos ácidos ribonucléicos de interferência (siRNA) estão também tornando-se importantes ferramentas para transgênesis. Animais de produção transgênicos são importantes na medicina humana, como fontes de proteínas biologicamente ativas, como doadores de xenotransplantes, e para pesquisas relacionadas à terapia celular e à terapia de genes. Aplicações típicas na agricultura incluem: a melhoria na composição de carcaça, a performance lactacional e a produção de lã, assim como o aumento da resistência a doenças e a redução do impacto ambiental. A segurança dos produtos pode ser garantida pela padronização de procedimentos e monitorada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e por tecnologias de arranjos. Enquanto informações sobre o sequenciamento e mapas genômicos de animais de produção são refinados, torna-se cada vez mais prático remover ou modificar genes individuais.

Palavras-chave: Aplicação na agricultura, benefício ambiental, animais de produção, “gene pharming”, vetor lentiviral, microinjeção, transferência nuclear, pequeno ácido ribonucléico de interferência, transgênico e xenotransplante.

Introdução: evolução das tecnologias transgênicas

Os primeiros animais transgênicos de produção foram criados à quase 20 anos atrás, utilizando-se a microinjeção de ácido desoxirribonucléico (DNA) dentro do pró-núcleo dos zigotos [33]. No entanto, assim como as microinjeções têm muitas desvantagens - incluindo a baixa eficiência, integração aleatória e expressão de padrões variáveis ao local da integração - as pesquisas têm se focado em metodologias alternativas para aumentar a eficiência na criação de animais de produção transgênicos (Tabela 1). Estas metodologias incluem:

- transferência de DNA mediadas por espermatozoides [12, 54, 55]

- injeção intracitoplasmática da cabeça do espermatozóide carreando um inserto de DNA [71, 72]
- injeção ou infecção de oócitos e/ou embriões por diferentes tipos de vetores virais [11, 35, 37]
- tecnologia de ácido ribonucléico (RNA) de interferência (pequeno RNA de interferência: siRNA) [14]
- transferência nuclear [5, 13, 21, 53, 86].

Tabela 1. A valiação da metodologia de transferência gênica

	Micro-injeção	NT Somáticas	TG espermatogônia	Lentivirus	SMGT
Uso Animal	alta	baixa	baixa	baixa	baixa
Sítio de Integração	aleatória	pré-“screened”	aleatória	aleatória	aleatória
Integração Pré-“screening”	não	sim	sim	não	não
Recombinação dos Homólogos	não	possível	ainda não	não	não
Transgenes Múltiplos	ineficiente	sim	Ainda não	sim	Ineficiente
Max. Construção Limite de tamanho	Cromossomos artificiais	transfecção limitada/cromos . Artificial	Transfecção limitada	~5 kb	?
Mosaicismo	sim	não	não	sim	não/?
Dificuldade Técnica	☺	☹	☹	☺	☺

TG: transgênico; Todas as classificações são baseadas em tecnologia completamente estabelecidas.

Até o presente momento, a transferência nuclear somática, tem sido bem sucedida em dez espécies – embora com baixa eficiência [47, 103] – sendo uma técnica que promete uma melhoria significativa na geração de animais de produção transgênicos (Tabela.1). Melhorias qualitativas podem ser atingidas através de tecnologias que permitam as modificações precisas do genoma, incluindo integração do cromossomo alvo por DNA recombinases sítio-específicas, como a Cre ou a Flippase (FLP), ou através de métodos que permitam o controle da expressão transgênica temporal e/ ou espacial [9, 45]. Os primeiros genomas de animais de produção (vaca e galinha) foram seqüenciados e descritos em 2004 [2, 3]. Deste modo, após aproximadamente 7.000 anos de seleção dos animais domésticos [16] baseada em mutações aleatórias causadas por radiação e injúrias oxidativas ao genoma, a tecnologia para introdução ou remoção de genes com funções conhecidas encontra-se disponível. Apesar das ineficiências inerentes à tecnologia de microinjeções, um amplo espectro de grandes animais geneticamente modificados tem sido gerado com aplicações na agricultura e biomedicina (Tabela 2). O uso de animais de produção transgênicos para a produção de fármacos “gene pharming”, tem atingido níveis de exploração comercial [47]. Este artigo fornece um breve resumo do status atual da produção de animais transgênicos e traz futuras implicações. Os autores têm como foco, espécies domésticas relativas a grandes animais e não cobrem desenvolvimentos recentes em reprodução de aves ou peixes.

Tabela 2. Status atual da transgênese na pecuária

	Fase inicial de exp.	Estágio exp.	Estágio exp. avançado	Transição uso prático.	Uso prát.
Biomedicina					
“Gene Pharming”					
Produção de Anticorpo					
Xenotransplante					
- órgãos sólidos					
- células/tecido					
Substituição sanguínea					
Modelo de Doenças					
Agricultura					
Composição de carcaça					
- carne magra					
- lipídeos saudáveis					
Performance de lactação					
Impacto Ambiental					
Produção de Lã					
Resistência a doenças					
Fertilidade					

Aplicações de animais domésticos transgênicos na biomedicina

Produção farmacêutica na glândula mamária de animais transgênicos

Entende-se por “gene pharming”, a produção de proteína humanas biologicamente ativas na glândula mamária de animais transgênicos. Esta tecnologia supera as limitações dos sistemas de produção de proteínas farmacêuticas por métodos convencionais e recombinantes [63, 82] e tem avançado até o estágio de aplicação comercial [27, 107]. A glândula mamária é o local preferido para a produção, principalmente por causa das quantidades de proteínas que podem ser produzidas neste órgão, utilizando-se elementos promotores específicos e estabelecendo métodos para a extração e purificação de proteínas [63, 82]. Regras desenvolvidas pelo FDA (Food and Drug Administration), o órgão governamental americano responsável pela regulamentação de drogas e de alimentos, requerem a monitoração da saúde dos animais, validação da seqüência da construção gênica, caracterização de proteínas recombinantes isoladas e o monitoramento da estabilidade de genes dos animais transgênicos durante

várias gerações. Isso tem necessitado, por exemplo, o uso de animais provenientes de países livres de Scrapie (Nova Zelândia) e a manutenção de animais de produção sob condições rigorosas de higiene. Produtos derivados das glândulas mamárias de cabras ou ovelhas transgênicas, como a anti-trobina III (ATIII), a-anti-tripsina, ativador de tecido plasminogênico (tPA), têm chegado até a fase de testes clínicos [47]. A fase de testes III, para a ATIII humana recombinante está completa e a sua regulamentação foi encaminhada visando autorização pelo mercado Europeu. Existem expectativas de que esta proteína seja registrada e esteja disponível no mercado até o final de 2005. O produto é empregado para o tratamento de pacientes resistentes a heparina que são submetidos a procedimentos envolvendo o uso de pontes cardio-pulmonares. Na mesma companhia que fabrica este produto, 11 proteínas transgênicas têm sido expressas nas glândulas mamárias de cabras com mais de um grama por litro. A enzima do leite de coelhos transgênicos, a- glucosidase, atingiu o status de “orphan drug” (o termo “orphan drug”, nos Estados Unidos se refere ao produto que trata doenças raras afetando um pouco mais de 200.000 americanos), sendo utilizada com sucesso para o tratamento da doenças de Pompe [94]. Similarmente, o inibidor recombinante C1 que é produzido pelo leite de coelhos transgênicos completou a fase III de testes, devendo ser registrado dentro dos próximos meses. Um antibiótico tópico contra o *Streptococcus mutans*, utilizado para a prevenção e tratamento da cárie dental, completou a fase III e deve ser liberado brevemente. O mercado global de proteínas recombinantes de animais domésticos espera exceder US\$1 bilhão em 2008 e alcançar US\$18.6 bilhões em 2013.

Apesar dessas conquistas marcantes, algumas construções gênicas têm falhado na produção de quantidades significativas no leite de animais transgênicos, indicando que essa tecnologia necessita ser refinada para que se chegue a um alto nível de expressão. Isso é particularmente verdadeiro para genes que têm uma regulação complexa, como aqueles marcados para eritropoietina ou fator de coagulação humano VIII [36, 41, 62, 67]. Com o avanço das proteínas farmacologicamente ativas, produzidas a partir de produtos agrícolas transgênicos, existe agora uma série de tecnologias recombinantes que permitem a seleção de sistemas de produção mais apropriados para cada proteína requerida [58]. A produção de vacinas em plantas contra por exemplo, a aftosa pode se tornar de importante aplicação para a saúde animal [102].

Anticorpos produzidos em animais transgênicos

Inúmeros anticorpos monoclonais são produzidos nas glândulas mamárias de cabras transgênicas [63]. Vacas clonadas transgênicas produzem anticorpos recombinantes bi específicos na sua corrente sanguínea[31]. Uma vez purificado do soro, o anticorpo é estável e atua como mediador na estimulação de células T alvo -restrita e na morte de células tumorais. Um novo desenvolvimento interessante é a geração de animais transcromossomais. Um cromossomo humano artificial contendo as seqüências completas dos loci das cadeias leve e pesada da imunoglobulina humana foi introduzido dentro do fibroblasto bovino, o qual foi então usado para a transferência nuclear. Produtos de gerações transcromossomais bovinas expressando imunoglobulinas humanas em seu sangue, foram obtidos, sendo um avanço significativo na produção de anticorpos monoclonais humanos [51]. Estudos mostrarão se o cromossomo adicional será mantido durante as gerações futuras e quão estável será a sua expressão.

Substituição sanguínea

Hemoglobinas humanas funcionais têm sido produzidos em suínos transgênicos. As proteínas transgênicas foram purificadas a partir do sangue de porcos e mostraram características similares a hemoglobina natural humana. O principal obstáculo foi de que apenas uma pequena proporção de glóbulos vermelhos contém a forma de hemoglobina encontrada em humanos [90]. Maneiras alternativas relacionadas a produção de substitutos para o sangue humano têm se focado na ligação-cruzada da hemoglobina ao sistema superóxido-desmutase [20].

Xenotransplantes de órgãos suínos em pacientes humanos

Atualmente, mais de 250.000 pessoas estão vivas apenas devido aos transplantes bem sucedidos de um órgão humano apropriado (allo-transplante). No entanto, a tecnologia de transplantes tem levado a uma escassez de órgãos adequados, e doações de órgãos vivos ou provenientes de cadáveres não correspondem às demandas da sociedade ocidentais. Para se fechar a crescente lacuna entre a demanda e a disponibilidade de órgãos humanos, o xenotransplante de porcos domésticos são considerados como sendo a melhor alternativa [47, 77]. Pré-requisitos essenciais para o sucesso de xenotransplantes são:

- superar os obstáculos imunológicos
- prevenir a transmissão de patógenos de um animal doador para um receptor humano
- assegurar a compatibilidade dos órgãos dos doadores com a anatomia e fisiologia humana
- Os maiores obstáculos imunológicos nos xenotransplantes de suínos para humanos são:
 - rejeição hiperaguda
 - rejeição vascular aguda
 - rejeição celular e eventualmente,
 - rejeição crônica [101]

A rejeição hiperaguda ocorre dentro de segundos ou minutos, quando no caso de um órgão discordante (ex: em transplantes de suínos para humanos), anticorpos pré-existent reagem com as estruturas antigênicas na superfície das células suínas e ativam a cascata do complemento; em outras palavras, o complexo antígeno- anticorpo inicia a formação do complexo de membrana de ataque. Anticorpos xenoreativos induzidos são considerados como sendo responsáveis pela rejeição vascular aguda, a qual ocorre dentro de alguns dias após o transplante de um xenoenxerto, sendo a coagulação intra-vascular disseminada, a característica predominante da rejeição vascular aguda [17, 52]. A trombomodulina humana e as heme-oxigenases 1 estão crucialmente envolvidas na etiologia da coagulação intra-vascular disseminada, sendo alvos para futuras modificações transgênicas, melhorando desta maneira a sobrevivência dos xenoenxertos suínos através da criação de porcos multi- transgênicos. Quando se utiliza uma espécie doadora discordante como a suína, superar a coagulação intra-vascular disseminada e a rejeição hiperaguda são objetivos preliminares. Duas estratégias principais vêm sendo bem exploradas com sucesso para a supressão da rejeição hiperaguda: síntese de reguladores da

atividade do complemento em porcos transgênicos [18, 77] e os “knockouts” do epítipo α -gal, estruturas antigênicas na superfície das células suínas que causam a rejeição hiperaguda [52, 74, 105]. Taxas de sobrevivência, após os transplantes cardíacos ou renais de suínos expressando as proteínas transgênicas reguladoras da atividade do complemento em primatas não humanos imuno-suprimidos, alcançaram 23 a 135 dias, indicando que a rejeição hiperaguda pode ser superada de uma maneira clinicamente aceitável [4]. O sucesso do xenotransplante dos órgãos de suínos dotado de gene knockout 1,3- α -galactosiltransferase, eliminando o epítipo 1,3- α -gal produzido pela enzima 1,3- α -galactosiltransferase foi demonstrado recentemente. A partir do transplante cardíaco e renal de suínos originados de porcos α -gal- “knockout” em Baboons, as taxas de sobrevivência atingiram dois a seis meses [52, 105]. Uma estratégia particularmente promissora para aumentar a tolerância ao transplante por um longo período de tempo é a indução permanente do quimerismo via injeção intra-portal em células tronco embrionárias (ES) ou o co-transplante de tecido do timo vascularizado [105]. Achados recentes revelaram que o risco de transmissão endógena de retrovírus suíno é desprezível e mostra que este perigo crítico poderia ser eliminado, construindo um caminho para testes clínicos relacionados aos xenoenxertos [47]. Apesar dos desafios encontrados, linhagens de porcos transgênicos estarão disponíveis dentro dos próximos cinco a dez anos, assim como os doadores de órgãos. As regras para aplicação clínica dos xenotransplantes suínos já estão disponíveis nos Estados Unidos e estão sendo atualmente desenvolvidas em outros países. O consenso geral dos debates no mundo todo é de que, esta tecnologia é eticamente aceitável, desde que o bem-estar do indivíduo não comprometa a saúde pública. Economicamente, o xenotransplante será viável, já que o custo enorme de manutenção poderá ser reduzido através do uso de um rim funcional ou de um xenoenxerto cardíaco; nos casos de pacientes sofrendo de doenças renais severas, utilizando a diálise, ou naqueles que sofrem de doença cardíaca crônica.

Animais de produção como modelo para doenças humanas

A fisiologia do camundongo, anatomia e longevidade de vida são significativamente diferentes dos humanos, fazendo dos roedores um modelo inapropriado para muitas doenças humanas. Animais de produção, como os suínos, ovelhas ou até mesmo as vacas, seriam talvez modelos mais apropriados ao estudo de terapias potenciais para as doenças humanas que requerem um longo período de observação, no que diz respeito ao que possivelmente se observa em ratos, ex: arteriosclerose, diabetes não dependentes da insulina, fibrose cística, câncer e desordens neuro-degenerativas [34, 56, 70, 92]. A doença cardiovascular é um problema de saúde crescente nas atuais sociedades ocidentais, onde as doenças da artéria coronária são apontadas como responsáveis pela maioria das mortes. Camundongos geneticamente modificados não manifestam infarto do miocárdio ou derrame como resultado de arteriosclerose; novos modelos animais, como os suínos, que exibem essas patologias são necessários para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas efetivas [32, 80]. Um importante modelo suíno tem sido o modelo desenvolvido para uma rara doença humana, como a rinite pigmentosa (RP) [73]. Pacientes com (RP) sofrem de cegueira noturna, logo cedo durante a vida, sendo uma condição atribuída à perda de fotoreceptores. Porcos transgênicos que expressam uma mutação do gene rodopsina, mostram grande similaridade ao fenótipo humano, desenvolvendo-se tratamentos efetivos [61]. O porco pode ser um

modelo útil para se estudar os defeitos na liberação dos hormônios de crescimento (GHRH), os quais estão relacionados a uma variedade de condições como a síndrome de Turner, hipocondroplasia, doença de Crohn, retardo no crescimento intra-uterino ou insuficiência renal. A aplicação do GHRH recombinante e a sua expressão miogênica têm mostrado aliviar estes problemas em modelos suínos [26] estando a caminho, o desenvolvimento de modelos suínos e ovinos [29]. Um importante aspecto da transferência nuclear, utilizando-se grandes animais como modelo para doenças humanas e para o desenvolvimento de terapias regenerativas é que o clone somático por si só, não resulta em encurtamento dos telômeros e desta maneira, não necessariamente leva ao envelhecimento precoce [85]. Telômeros são seqüências de DNA altamente repetitivas localizadas no final dos cromossomos, cruciais para a sua integridade estrutural/funcional e sendo relacionados ao tempo de vida. O encurtamento dos telômeros é usualmente correlacionado a limitações severas da capacidade regenerativa das células, início de câncer, envelhecimento e doenças crônicas com um impacto significativo na longevidade de vida dos humanos [85]. A expressão da enzima telomerase, a qual é primeiramente responsável pela formação de telômeros re-construídos, é suprimida na maioria dos tecidos somáticos no período pós-natal. Recentes estudos têm revelado que o comprimento dos telômeros é estabelecido bem cedo, na fase de desenvolvimento durante a pré-implantação, através de um programa genético específico, correlacionando-se com a atividade da telomerase [84].

Animais transgênicos na agricultura

Composição de carcaça

Porcos transgênicos portando uma construção do gene do hormônio do crescimento contendo um promotor suíno com a metalotioneína humano mostrou uma significativa melhoria em características economicamente importantes, como taxa de crescimento, conversão de alimentos, taxa corporal de gordura/ músculo, sem o fenótipo patológico conhecido a partir de outras construções do hormônio de crescimento previamente descritas [69, 78]. Similarmente, porcos transgênicos para o fator I de crescimento, semelhante à insulina têm ~30% mais massa muscular, ~10% mais tecido de carcaça e ~20% menos gordura total de carcaça [79]. A comercialização desses porcos tem sido adiada devido a atual falta de aceitação pública de alimentos geneticamente modificados. Recentemente, um passo importante em direção à produção de porcos mais saudáveis, tem sido dado através da criação dos primeiros porcos transgênicos para o gene “spinach desaturase”, o qual produz maiores quantidades de ácidos graxos não saturados. Esses porcos têm uma maior taxa de ácidos graxos não saturados, com relação à saturados em músculo estriado, o que significa mais carne saudável. Sabe-se que uma dieta rica em ácidos graxos não saturados pode ser correlacionada a redução do risco de infarto e doenças coronárias [66, 83].

Lactação

As propriedades psicoquímica do leite são essencialmente ligadas à taxa de variação da caseína, fazendo disso, o alvo principal para a melhoria da composição do leite. Camundongos transgênicos têm

sido desenvolvidos com várias modificações, demonstrando a possibilidade de se obter alterações significativas na composição do leite de grandes animais, mas ao mesmo tempo, mostrando que efeitos adversos não desejados podem ocorrer [50, 89].

A produção de leite é uma área atraente para as modificações genéticas [44, 106]. Talvez seja possível se produzir leite com uma composição líquida modificada através da modulação de enzimas envolvidas no metabolismo de lipídeos, ou ainda aumentar a produção de coalho ou queijo através da amplificação da expressão da família do gene da caseína na glândula mamária. A taxa de caseína bovina tem sido alterada pela super-expressão da beta e kappa caseína, claramente definindo o potencial de melhoramento das propriedades funcionais do leite bovino [8]. Além disso, a obtenção de leite hipoalergeno seria possível através do “knockout” ou “knockdown” do gene da β -lactoglobulina, para a criação do leite sem lactose através do “knockout” ou “knockdown” do locus da a-lactoalbumina, a qual é a chave para a síntese de açúcar no leite, para a produção de leite para crianças, no qual a lactoferrina humana é responsável pelo aumento da lisozima.

O leite com lactose reduzida, ou mesmo livre de lactose renderia produtos lácteos consumíveis por um grande número de adultos, os quais não possuem um sistema ativo de enzimas de lactose intestinal. Embora a lactose seja a principal substância osmoticamente ativa no leite e a sua ausência possa interferir com a secreção do leite, a construção dos componentes da lactase tem sido testada na glândula mamária de camundongos transgênicos. Nos camundongos hemizigóticos, a redução dos componentes da lactose em 50% a 85% não altera a secreção do leite [43]. Infelizmente, camundongos homozigóticos com “knockout” para a a-lactoalbumina não podem amamentar suas crias devido a alta viscosidade do seu leite [89]. Esses achados demonstram a possibilidade de obtenção de alterações significativas na composição do leite através da aplicação de estratégias adequadas.

Em suínos, a expressão da construção transgênica da lactoalbumina bovina no leite de porcas tem resultado em altas composições de lactose e maior produtividade de leite, a qual se correlaciona com o aumento da sobrevivência e do desenvolvimento dos leitões [100]. Qualquer aumento na sobrevivência de leitões ao desmame forneceria uma vantagem comercial ao produtor.

Produção de lã

Ovelhas transgênicas, capazes de construir a keratina IGF-I mostram que a expressão na pele e a quantidade de lã limpa foi cerca de 6.2% maior nos animais transgênicos do que naqueles não transgênicos. Não foram observados efeitos adversos na saúde ou na reprodução [22, 23]. Maneiras de se alterar a produção de lã por meio das modificações transgênicas pelo caminho da cisteína foram atingidas apenas com sucesso limitado, embora se saiba que a cisteína é o fator bioquímico limitante para o crescimento de lã [96].

Animais de produção não agressores ao meio-ambiente

Porcos transgênicos “phytase” têm sido desenvolvidos para atender aos problemas da poluição ambiental relacionados à poluição ambiental provocada pelas fezes. Os porcos são dotados do gene

bacteriano da “phytase” sob o controle da transcrição do promotor específico da glândula salivar, o qual permite aos porcos digerir a planta phytate. Na ausência da enzima bacteriana a “phytate phosphorus” não é digerida, fazendo parte das fezes e poluindo o ambiente. A produção de fósforo fecal na presença da enzima bacteriana foi reduzida em até 75% [30]. Espera-se que esses porcos não agressores do ambiente entrem na produção comercial do Canadá dentro dos próximos anos.

Animais transgênicos e resistência a doenças

Estratégias transgênicas para o aumento da resistência a doenças

Na maior parte dos casos, a susceptibilidade a patógenos se origina das relações entre inúmeros genes; em outras palavras, a susceptibilidade a patógenos é poligênica por natureza. Apenas alguns “sítios”, os quais conferem resistência a doenças específicas são conhecidos. Estratégias transgênicas, para o aumento da resistência a doenças incluem: a transferência de genes do complexo de histocompatibilidade, genes receptores das células T, genes da imunoglobulina, genes que afetam linfocinas, os genes que conferem resistência a doenças específicas [64]. Um exemplo proeminente de genes, que confere resistência a doenças específicas é o gene Mx murino. A produção da proteína Mx 1 é induzida pelo interferon e foi descoberta em amostras de camundongos consanguíneos, os quais são resistentes a infecções pelos vírus da influenza [88]. Microinjeções de construtores de interferon e de Mx induzidos por vírus, em zigotos suínos resultaram em duas linhagens de porcos transgênicos que expressam RNA mensageiro Mx (mRNA). Infelizmente, nenhuma proteína Mx pode ser detectada [65]. Recentemente o gene bovino Mx 1 foi identificado e mostrou atividade anti-viral, como uma construção transgênica em células Vero [6].

Construções transgênicas dotados do gene da imunoglobulina-A (IgA) têm sido introduzidas com sucesso em porcos, ovelhas, e camundongos na tentativa de aumentar a resistência contra infecções [57].

O gene IgA de murinos foi expresso em duas linhagens de porcos transgênicos, mas apenas as cadeias leves foram detectadas e as moléculas de IgA ligaram-se somente às porções terminais das fosforilcolinas [57]. Altos níveis de anticorpos murinos monoclonais, com uma alta afinidade de ligação aos antígenos específicos têm sido produzidos em porcos transgênicos [97].

Tentativas em aumentar a resistência dos ovinos ao Visna têm sido relatadas [15]. As ovelhas transgênicas desenvolveram-se normalmente e expressaram o gene viral sem efeitos colaterais patológicos, embora o transgene não tenha sido expresso em monócitos, células alvo da infecção viral. Anticorpos foram detectados após a infecção artificial dos animais transgênicos [15]. Também tem sido possível se induzir a imunidade passiva contra a transmissão de gastroenterites (TGEV), uma doença economicamente importante em suínos utilizando o camundongo transgênico como modelo [10]. O camundongo transgênico secreta um anticorpo recombinante no leite que neutraliza o corona vírus responsável pela TGEV, o qual confere resistência ao TGEV. Uma forte expressão específica à glândula mamária foi obtida durante toda a lactação. Em um futuro próximo este trabalho será verificado em porcos transgênicos. O “knockout” da proteína prion é o único caminho seguro para a prevenção da infecção e transmissão de encefalopatias espongiformes, como a Scrapie [98]. A primeira abordagem

bem sucedida do locus do prion de ovinos também foi relatada [19]. Animais transgênicos, dotados de genes prion modificados serão modelos apropriados para o estudo das epidemiologias envolvendo as encefalopatias espongiformes em humanos, sendo cruciais para o desenvolvimento de estratégias na eliminação de carreadores do prion para populações de animais de produção.

Abordagens em transgênesis para o aumento da resistência a doenças da glândula mamária

Os níveis de lisozimas peptídicas e de lactoferrina anti-microbial no leite humano é muitas vezes maior do que no leite bovino. A expressão transgênica do gene da lisozima humana em camundongos foi associada a uma redução significativa da bactéria e diminuição da frequência de infecções, nas glândulas mamárias[59, 60]. A lactoferrina tem um efeito bactericida e bacteriostático adicionado ao fato de ser a principal fonte de ferro no leite. Essas proteínas provocam um aumento nos níveis de lactoferrina em transgênicos bovinos, sendo uma maneira prática de melhorar a qualidade do leite. A lactoferrina humana tem sido expressa no leite de camundongos e vacas transgênicas em altos níveis [46, 76] e está associada com um aumento da resistência contra doenças da glândula mamária [93]. A “lycostaphin” tem mostrado resistência específica contra a mastite causada por *Staphylococcus aureus*. Relatos recentes indicam que, a tecnologia dos transgênicos tem sido utilizada para a produção de vacas que expressam a construção gênica da “lycostaphin” na glândula mamária, fazendo desta maneira com que sejam resistentes à mastite [95].

Tecnologias emergentes em transgênesis

Transfecção com lentivírus de oócitos e zigotos

Pesquisas recentes têm mostrado que as lentiviroses podem superar as limitações prévias da transferência de genes mediada por vírus, as quais incluem o silenciamento de locus transgênicos e baixos níveis de expressão [104]. A injeção de vírus dentro do espaço perivitelínico de zigotos suínos resultou em uma alta proporção de leitões que expressaram a transgênesis. Linhagens transgênicas estáveis têm sido estabelecidas utilizando-se este método [36]. A geração de vacas transgênicas através de lentiviroses requer a microinjeção dentro do espaço perivitelínico de oócitos e tem uma baixa eficiência quando comparada a obtida em porcos [37]. A transferência do gene lentiviral em animais de produção promete ser eficiente nos animais de produção transgênicos. O fato da integração múltipla de lentivírus dentro do genoma ser ou não associada a efeitos colaterais indesejados, como a ativação do oncogene ou a mutagênese insercional ainda está por ser investigado.

Gerações de quimeras via injeção de células pluripotentes dentro do blastocisto

Células tronco embrionárias com características pluripotentes têm habilidade de participar no desenvolvimento de células de órgãos e de células germinativas após a injeção dentro de blastocistos ou através da agregação de mórulas [81]. Verdadeiras células ES (as quais são capazes de contribuir com as linhagens germinativas) estão atualmente disponíveis apenas para linhagens consanguíneas de

camundongos [48]. Na genética dos camundongos, as células ES tornaram-se uma importante ferramenta para geração de genes “knockouts”, genes “knockins” e de amplos re-arranjos cromossômicos [25]. Cultura de células tronco embrionárias e de células germinativas primordiais têm sido relatadas em várias espécies de animais de produção, e animais quimeras sem a contribuição da linhagem germinativa têm sido relatada em suínos [1, 87, 99] e em vacas [13]. Dados recentes indicam que, células tronco somáticas talvez tenham uma maior potência do que se imaginava anteriormente [42, 49]. O fato dessas células melhorarem a eficiência da geração de quimeras e da transferência nuclear somática em animais de produção, ainda está por ser mostrado [48].

Geração de Quimeras via injeção de células pluripotentes em blastocistos

Células tronco embrionárias com características pluripotentes têm a capacidade de participar no desenvolvimento de células de órgão e de células germinativas após injetadas dentro de blastocistos ou pela agregação com mórulas [81]. Células pluripotentes verdadeiras (aquelas capazes de contribuir com a linhagem de células germinativas) estão atualmente disponíveis apenas em linhagens de camundongo consangüíneas [48]. As células ES têm se tornado um instrumento importante para a criação de genes “knockouts”, genes “knockins” e de amplos rearranjos cromossomais [25]. Células tronco embrionárias e cultivo de células germinativas primordiais têm sido relatadas em várias espécies de animais de produção e animais quiméricos sem contribuição das linhagens germinativas, sendo relatadas em suínos [1, 87, 99] e em bovinos [13]. Dados recentes indicam que as células tronco somáticas tenham talvez, uma potência muito maior do que se acreditava anteriormente [42, 49]. O fato dessas células melhorarem a eficiência da geração de quimeras ou da transferência nuclear somática em animais de produção, ainda está por ser demonstrado [48].

Cultura de espermatogônias e transplante em machos receptores

O transplante de células germinativas primordiais geneticamente alteradas dentro dos testículos de um macho hospedeiro é uma maneira alternativa de se gerar animais transgênicos. Experimentos iniciais em camundongos mostraram que, a depleção endógena da espermatogênese pelo tratamento com “busulfan” antes do transplante é efetiva e compatível com a re-colonização pelas células doadoras. Recentemente, pesquisadores obtiveram sucesso na transmissão do doador haplóide para as futuras gerações após o transplante de células germinativas [38]. Os maiores obstáculos a essa estratégia são: a falta de eficiência dos métodos de cultura in vitro para as células primordiais germinativas pró-espermatogônias e as limitações que isto impõe nas técnicas de transferência de genes para estas células.

Ácido ribonucléico de interferência (si RNA)

Ácido ribonucléico de interferência é um gene pós-transcricional conservado que faz parte de um processo de regulação na maioria dos sistemas biológicos, incluindo os fungos, plantas e animais. Elementos mecânicos comuns incluindo os siRNA com 21 a 23 nucleotídeos, os quais se ligam

especificamente à seqüências complementares nos seus mRNA alvo e bloqueiam a expressão. Os mRNA alvo são degradados pelas exonucleases e as proteínas não são traduzidas [75]. O RNA de interferência parece estar envolvido na regulação de genes através do controle e supressão da tradução dos mRNA por elementos virais endógenos.

A relativa simplicidade dos siRNA ativos tem facilitado a adoção de mecanismos para a geração de “knockdown” permanentes ou transitórios à genes específicos. Para os genes “knockdown” de transição, os siRNA sintéticos podem ser transfectados dentro de células ou estágios embrionários. Para a supressão dos genes estáveis, as seqüências de siRNA devem ser incorporadas dentro das construções gênicas [14]. A tecnologia de junção do vetor lentiviral e do siRNA poderá fornecer brevemente um método com alta eficiência de transferência gênica e genes “knockdown” altamente específicos para a pecuária.

Aspectos de segurança e perspectivas

Produtos biológicos de qualquer fonte animal são únicos, e devem ser manipulados de maneira diferente quanto às drogas quimicamente sintetizadas, garantindo a sua segurança, pureza e potência. Proteínas derivadas dos sistemas vivos são suscetíveis ao calor, sujeitas à contaminação microbiana, podendo ser atingidas por forças cortantes e tendo desta maneira, o potencial de ser imunogênicas e alergênicas. Nos Estados Unidos, o FDA tem desenvolvido regras para garantir a comercialização segura de exploração dos produtos biológicos recombinantes. Uma consideração crucial com relação aos produtos derivados de animais, é a prevenção de transmissão de patógenos de animais para humanos [47]. Isso requer um diagnóstico sensível e confiável, como os métodos de “screening” para vários tipos de patógenos orgânicos. Além disso, deve-se manter em mente que todas as aplicações de animais de produção transgênicos vão requerer padrões rigorosos de segurança genética e confiáveis métodos para a caracterização molecular de produtos. A maior contribuição dirigida ao objetivo de se atingir produtos bem definidos virá das redes assistidas por laser para distorção/ionização e espectrometria de “time-of-flight” (MALDI-TOF) [40, 91]. Enquanto isso, melhorias no isolamento de RNA e da amplificação global não parcial de quantidades em picogramas de mRNA tornam possível a análise do RNA, mesmo em embriões únicos [7].

Conclusões

Durante a história, a reprodução animal tem contribuído significativamente com a saúde humana e o bem-estar. A convergência de recentes avanços em tecnologias reprodutivas (produção in vitro de embriões, sexagem espermática, transferência nuclear somática) utilizando-se as ferramentas da biologia molecular (gene alvo, análise de expressão gênica por “arrays”) engrandecem a reprodução animal [68]. Os mais importantes pré-requisitos para a segurança e sucesso serão o contínuo refinamento de biotecnologias reprodutivas e o término rápido de projetos envolvendo seqüências genômicas de animais de produção. Os autores antecipam que dentro dos próximos cinco a sete anos, animais geneticamente modificados irão assumir um papel significativo na área biomédica, em particular através da produção

de proteínas farmacêuticas e do fornecimento de xenoenxertos (Tabela 2). As aplicações na agricultura já estão sendo preparadas [39], muito embora a aceitação pública possa levar tanto tempo quanto, dez anos para ser conquistada. Quando a seqüência genética de todos os animais de produção tornar-se disponível, será possível lapidar-se as modificações genéticas alvo em reprodução animal e desenvolver estratégias que correspondam a futuros desafios na produção da agricultura global.

Referências

1. Anderson G.B. 1999. Embryonic stem cells in agricultural species. In: *Transgenic animals in agriculture* (J.D. Murray, G.B. Anderson, A.M. Oberbauer & M.M. McGloughlin, eds). CABI Publishing, New York, pp. 57-66.
2. Anon. 2004. Chicken genome. Genome Sequencing Center at Washington University in St Louis. Website: genome.wustl.edu/projects/chicken/ (accessed on 17 May 2005).
3. Anon. 2005. Bovine Genome Project. Human Genome Sequencing Center at Baylor College of Medicine Website: www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/bovine/ (accessed on 17 May 2005).
4. Bach F.H. 1998. Xenotransplantation: problems and prospects. *Annual Review of Medicine*. 49: 301-310.
5. Baguisi A., Behboodi E., Melican D., Pollock J.S., Destrempe M.M., Cammuso C., Williams J.L., Nims S.D., Porter C.A., Midura P., Palacios M.J., Ayres S.L., Denniston R.S., Hayes M.L., Ziomek C.A., Meade H.M., Godke R.A., Gavin W.G., Overström E.W. & Echelard Y. 1999. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nature Biotechnology*. 17: 456-461.
6. Baise E., Pire G., Leroy M., Gerardin J., Goris N., De Clercq K., Kerkhofs P. & Desmecht D. 2004. Conditional expression of type I interferon-induced bovine Mx1 GTPase in a stable transgenic vero cell line interferes with replication of vesicular stomatitis virus. *Journal of Interferon and Cytokine Research*. 24: 512-521.
7. Brambrink T., Wabnitz P., Halter R., Klocke R., Carnwath J.W., Kues W.A., Wrenzycki C., Paul D. & Niemann H. 2002. Application of cDNA arrays to monitor mRNA profiles in single preimplantation mouse embryos. *Biotechniques*. 33: 376-385.
8. Brophy B., Smolenski G., Wheeler T., Wells D., L'Huillier P. & Laible G. 2003. Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of b-casein and k-casein. *Nature Biotechnology*. 21: 157-162.
9. Capecchi M.R. 1989. The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends in Genetics*. 5: 70-76.
10. Castilla J., Pintado B., Sola I., Sánchez-Morgado J.M. & Enjuanes L. 1998. Engineering passive immunity in transgenic mice secreting virus-neutralizing antibodies in milk. *Nature Biotechnology*. 16: 349-354.
11. Chan A.W., Homan E.J., Ballou L.U., Burns J.C. & Bremel R.D. 1998. Transgenic cattle produced by reverse-transcribed gene transfer in oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 95: 14028-14033.
12. Chang K., Qian J., Jiang M., Liu Y.H., Wu M.C., Chen C.D., Lai C.K., Lo H.L., Hsiao C.T., Brown L., Bolen J. Jr, Huang H.I., Ho P.Y., Shih P.Y., Yao C.W., Lin W.J., Chen C.H., Wu F.Y.,

- Lin Y.J., Xu J. & Wang K. 2002. Effective generation of transgenic pigs and mice by linker based sperm-mediated gene transfer. *BMC Biotechnology*. 2: 5.
13. Cibelli J.B., Stice S.L., Golueke P.L., Kane J.J., Jerry J., Blackwell C., Ponce de Leon F.A. & Robl J.M. 1998. Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem like cells. *Nature Biotechnology*, 16: 642-646.
14. Clark J. & Whitelaw B. 2003. A future for transgenic livestock. *Nature Reviews Genetics*. 4: 825-833.
15. Clements J.E., Wall R.J., Narayan O., Hauer D., Schoborg R., Sheffer D., Powell A., Carruth L.M., Zink M.C. & Rexroad C.E. 1994. Development of transgenic sheep that express the Visna virus envelope gene. *Virology*. 200: 370-380.
16. Copley M.S., Berstan R., Dudd S.N., Docherty G, Mukherjee A.J., Straker V., Payne S. & Evershed R.P. 2003. Direct chemical evidence for widespread dairying in prehistoric Britain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 100: 1524-1529.
17. Cowan P.J., Aminian A., Barlow H., Brown A.A., Chen C.G, Fiscaro N., Francis D.M., Goodman D.J., Han W., Kurek M., Nottle M.B., Pearse M.J., Salvaris E., Shinkel T.A., Stainsby G.V., Stewart A.B. & d'Apice A.J. 2000. Renal xenografts from triple-transgenic pigs are not hyperacutely rejected but cause coagulopathy in nonimmunosuppressed baboons. *Transplantation*. 69 2504-2515.
18. Cozzi E. & White D.J.G. 1995. The generation of transgenic pigs as potential organ donors for humans. *Nature Medicine*. 1: 964-966.
19. Cyranoski D. 2003. Koreans rustle up madness-resistant cows. *Nature*, 426: 743.
20. D'Agnillo F. & Chang T.M. 1998. Polyhemoglobin-superoxide dismutase-catalase as a blood substitute with antioxidant properties. *Nature Biotechnology*. 16: 667-671.
21. Dai Y., Vaught T.D., Boone J., Chen S.H., Phelps C.J., Ball S., Monahan J.A., Jobst P.M., McCreath K.J., Lamborn A.E., Cowell-Lucero J.L., Wells K.D., Colman A., Polejaeva I.A. & Ayares D.L. 2002. Targeted disruption of the α 1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nature Biotechnology*. 20: 251-255.
22. Damak S., Jay N.P., Barrell G.K. & Bullock D.W. 1996. Targeting gene expression to the wool follicle in transgenic sheep. *Biotechnology*. 14: 181-184.
23. Damak S., Su H., Jay N.P. & Bullock D.W. 1996. Improved wool production in transgenic sheep expressing insulin-like growth factor 1. *Biotechnology*. 14: 185-188.
24. Denning C., Burl S., Ainslie A., Bracken J., Dinnyes A., Fletcher J., King T., Ritchie M., Ritchie W.A., Rollo M., de Sousa P., Travers A., Wilmot I. & Clark A.J. 2001. Deletion of the alpha(1,3)galactosyltransferase (GGTA1) and the prion protein (PrP) gene in sheep. *Nature Biotechnology*. 19: 559-562.
25. Downing G.J. & Battey J.F. Jr. 2004. Technical assessment of the first 20 years of research using mouse embryonic stem cell lines. *Stem Cells*. 22: 1168-1180.
26. Draghia-Akli R., Fiorotto M.L., Hill L.A., Malone P.B., Deaver D.R. & Schwartz R.J. 1999. Myogenic expression of an injectable protease-resistant growth hormone-releasing hormone augments long-term growth in pigs. *Nature Biotechnology*. 17: 1179-1183.

27. Dyck M.K., Lacroix D., Pothier F. & Sirard M.A. 2003. Making recombinant proteins in animals: different systems, different applications. *Trends Biotechnology*. 21: 394-399.
28. Fändrich F., Lin X., Chai G.X., Schulze M., Ganten D., Bader M., Holle J., Huang D.S., Parwaresch R., Zavazava N. & Binas B. 2002. Preimplantation-stage stem cells induce long-term allogeneic graft acceptance without supplementary host conditioning. *Nature Medicine*. 8: 171-178.
29. Forsberg E.J. 2005. Commercial applications of nuclear transfer cloning: three examples. *Reproduction Fertility and Development*. 17: 59-68.
30. Golovan S.P., Meidinger R.G., Ajakaiye A., Cottrill M., Wiederkehr M.Z., Barney D.J., Plante C., Pollard J.W., Fan M.Z., Hayes M.A., Laursen J., Hjorth J.P., Hacker R.R., Phillips J.P. & Forsberg C.W. 2001. Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure. *Nature Biotechnology*. 19: 741-745.
31. Grosse-Hovest L., Muller S., Minoia R., Wolf E., Zakhartchenko V., Wenigerkind H., Lassnig C., Besenfelder U., Müller M., Lytton S.D., Jung G. & Brem G. 2004. Cloned transgenic farm animals produce a bispecific antibody for T cell-mediated tumor cell killing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 101: 6858-6863.
32. Grunwald K.A., Schueler K., Uelmen P.J., Lipton B.A., Kaiser M., Buhman K. & Attie A.D. 1999. Identification of a novel Arg→Cys mutation in the LDL receptor that contributes to spontaneous hypercholesterolemia in pigs. *Journal of Lipid Research*. 40: 475-485.
33. Hammer R.E., Pursel V.G., Rexroad C.E. Jr, Wall R.J., Bolt D.J., Ebert K.M., Palmiter R.D. & Brinster R.L. 1985. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*. 315: 680-683.
34. Hansen K. & Khanna C. 2004. Spontaneous and genetically engineered animal models: use in preclinical cancer drug development. *European Journal of Cancer*. 40: 858-880.
35. Haskell R.E. & Bowen R.A. 1995. Efficient production of transgenic cattle by retroviral infection of early embryos. *Molecular Reproduction and Development*. 40: 386-390.
36. Hofmann A., Kessler B., Ewerling S., Weppert M., Vogt B., Ludwig H., Stojkovic M., Boelhaue M., Brem G., Wolf E. & Pfeifer A. 2003. Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors. *EMBO Reports*. 4: 1054-1060.
37. Hofmann A., Zakhartchenko V., Weppert M., Sebald H., Wenigerkind H., Brem G., Wolf E. & Pfeifer A. 2004. Generation of transgenic cattle by lentiviral gene transfer into oocytes. *Biology of Reproduction*. 71: 405-409.
38. Honaramooz A., Behboodi E., Megee S.O., Overton S.A., Galantino-Homer H., Echelard Y. & Dobrinski I. 2003. Fertility and germline transmission of donor haplotype following germ cell transplantation in immunocompetent goats. *Biology of Reproduction*. 69: 1260-1264.
39. Houdebine L.M. 2002. Transgenesis to improve animal production. *Livestock Production Science*. 74: 255-268.
40. Hughes T.R., Roberts C.J., Dai H., Jones A.R., Meyer M.R., Slade D., Burchard J., Dow S., Ward T.R., Kidd M.J., Friend S.H. & Marton M.J. 2000. Widespread aneuploidy revealed by DNA microarray expression profiling. *Nature Genetics*. 25: 333-337.

41. Hyttinen J.M., Peura T., Tolvanen M., Aalto J., Alhonen L., Sinervirta R., Halmekyto M., Myohanen S. & Janne J. 1994. Generation of transgenic dairy cattle from transgene-analyzed and sexed embryos produced *in vitro*. *Biotechnology*. 12: 606-608.
42. Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L., Schwartz R.E., Keene C.D., Ortiz-Gonzalez X.R., Reyes M., Lenvik T., Lund T., Blackstad M., Du J., Aldrich S., Lisberg A., Low W.C., Largaespada D.A. & Verfaillie C.M. 2002. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 418: 41-49.
43. Jost B., Vilotte J.L., Duluc I., Rodeau J.L. & Freund J.N. 1999. Production of low-lactose milk by ectopic expression of intestinal lactase in the mouse mammary gland. *Nature Biotechnology*. 17: 160-164.
44. Karatzas C.N. & Turner J.D. 1997. Toward altering milk composition by genetic manipulation: current status and challenges. *Journal of Dairy Science*. 80: 2225-2232.
45. Kilby N.J., Snaith M.R. & Murray J.A.H. 1993. Site-specific recombinases: tools for genome engineering. *Trends in Genetics*. 9: 413-421.
46. Krimpenfort P., Rademakers A., Eyestone W., van der Schans A., van den Broek S., Kooiman P., Kootwijk E., Platenburg G., Pieper F., Strijker R. & de Boer H. 1991. Generation of transgenic dairy cattle using *in vitro* embryo production. *Biotechnology*. 9: 844-847.
47. Kues W.A. & Niemann H. 2004. The contribution of farm animals to human health. *Trends in Biotechnology*. 22: 286-294.
48. Kues W.A., Carnwath J.W. & Niemann H. 2005. From fibroblasts and stem cells: implications for cell therapies and somatic cloning. *Reproduction Fertility and Development*. 17: 125-134.
49. Kues W.A., Petersen B., Mysegades W, Carnwath J.W. & Niemann H. 2005. Isolation of murine and porcine fetal stem cells from somatic tissue. *Biology of Reproduction*. 72: 1020-1028.
50. Kumar S., Clarke A.R., Hooper M.L., Horne D.S., Law A.J., Leaver J., Springbett A., Stevenson E. & Simons J.P. 1994. Milk composition and lactation of β -casein deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 91: 6138-6142.
51. Kuroiwa Y., Kasinathan P., Choi Y.J., Naeem R., Tomizuka K., Sullivan E.J., Knott J.G., Duteau A., Goldsby R.A., Osborne B.A., Ishida I. & Robl J.M. 2002. Cloned transchromosomal calves producing human immunoglobulin. *Nature Biotechnology*. 20: 889-894.
52. Kuwaki K., Tseng Y.L., Dor F.J., Shimizu A., Houser S.L., Sanderson T.M., Lancos C.J., Prabharasuth D.D., Cheng J., Moran K., Hisashi Y., Mueller N., Yamada K., Greenstein J.L., Hawley R.J., Patience C., Awwad M., Fishman J.A., Robson S.C., Schuurman H.J., Sachs D.H. & Cooper D.K. 2005. Heart transplantation in baboons using α 1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs as donors: initial experience. *Nature Medicine*. 11: 29-31.
53. Lai L., Kolber-Simonds D., Park K.W., Cheong H.T., Greenstein J.L., Im G.S., Samuel M., Bonk A., Rieke A., Day B.N., Murphy C.N., Carter D.B., Hawley R.J. & Prather R.S. 2002. Production of α 1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science*. 295: 1089-1092.
54. Lavitrano M., Camaioni A., Fazio V.M., Dolci S., Farace M.G. & Spadafora C. 1989. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. *Cell*.

- 57: 717-723.
55. Lavitrano M., Bacci M.L., Forni M., Lazzereschi D., Di Stefano C., Fioretti D., Giancotti P., Marfe G., Pucci L., Renzi L., Wang H., Stoppacciaro A., Stassi G., Sargiacomo M., Sinibaldi P., Turchi V., Giovannoni R., Della Casa G., Seren E. & Rossi G. 2002. Efficient production by sperm-mediated gene transfer of human decay accelerating factor (hDAF) transgenic pigs for xenotransplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 99: 14230-14235.
56. Li Z. & Engelhardt J.F. 2003. Progress toward generating a ferret model of cystic fibrosis by somatic cell nuclear transfer. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 1: 83.
57. Lo D., Pursel V., Linton P.J., Sandgren E., Behringer R., Rexroad C., Palmiter R.D. & Brinster R.L. 1991. Expression of mouse IgA by transgenic mice, pigs and sheep. *European Journal of Immunology*. 21: 1001-1006.
58. Ma J.K., Drake P.M. & Christou P. 2003. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature Reviews Genetics*. 4: 794-805.
59. Maga E.A., Anderson G.B. & Murray J.D. 1995. The effects of mammary gland expression of human lysozyme on the properties of milk from transgenic mice. *Journal of Dairy Science*. 78: 2645-2652.
60. Maga E.A. & Murray J.D. 1995. Mammary gland expression of transgenes and the potential for altering the properties of milk. *Biotechnology*. 13: 1452-1457.
61. Mahmoud T.H., McCuen B.W., Hao Y., Moon S.J., Tatebayashi M., Stinnett S., Petters R.M. & Wong F. 2003. Lensectomy and vitrectomy decrease the rate of photoreceptor loss in rhodopsin P347L transgenic pigs. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 241: 298-308.
62. Massoud M., Attal J., Thepot D., Pointu H., Stinnakre M.G., Theron M.C., Lopez C. & Houdebine L.M. 1996. The deleterious effects of human erythropoietin gene driven by the rabbit whey acidic protein gene promoter in transgenic rabbits. *Reproduction Nutrition Development*. 36: 555-563.
63. Meade H.M., Echelard Y., Ziomek C.A., Young M.W., Harvey M., Cole E.S., Groet S. & Curling J.M. 1999. Expression of recombinant proteins in the milk of transgenic animals. In *Gene expression systems: using nature for the art of expression* (J.M. Fernandez & J.P. Hoeffler, eds). Academic Press, San Diego, pp. 399-427.
64. Müller M. & Brem G. 1991. Disease resistance in farm animals. *Experientia*. 47: 923-934.
65. Müller M., Brenig B., Winnacker E.L. & Brem G. 1992. Transgenic pigs carrying cDNA copies encoding the murine Mx1 protein which confers resistance to influenza virus infection. *Gene*. 121: 263-270.
66. Niemann H. 2004. Transgenic pigs expressing plant genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 101: 7211-7212.
67. Niemann H., Halter R., Carnwath J.W., Herrmann D., Lemme E. & Paul D. 1999. Expression of human blood clotting factor VIII in the mammary gland of transgenic sheep. *Transgenic Research*. 8: 237-247.

68. Niemann H. & Kues W.A. 2003. Application of transgenesis in livestock for agriculture and biomedicine. *Animal Reproduction Science*. 79: 291-317.
69. Nottle M.B., Nagashima H., Verma P.J., Du Z.T., Grupen C.G., McIlpatrick S.M., Ashman R.J., Harding M.P., Giannakis C., Wigley P.L., Lyons I.G., Harrison D.T., Luxford B.G., Campbell R.G., Crawford R.J. & Robins A.J. 1999. Production and analysis of transgenic pigs containing a metallothionein porcine growth hormone gene construct. In *Transgenic animals in agriculture* (J.D. Murray, G.B. Anderson, A.M. Oberbauer & M.M. McGloughlin, eds). CABI Publishing, New York, pp. 145-156.
70. Palmarini M. & Fan H. 2001. Retrovirus-induced ovine pulmonary adenocarcinoma: an animal model for lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 93: 1603-1614.
71. Perry A.C., Wakayama T., Kishikawa H., Kasai T., Okabe M., Toyoda Y. & Yanagimachi R. 1999. Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science*. 284: 1180-1183.
72. Perry A.C., Rothman A., de las Heras J.I., Feinstein P., Mombaerts P., Cooke H.J. & Wakayama T. 2001. Efficient metaphase II transgenesis with different transgene archetypes. *Nature Biotechnology*. 19: 1071-1073.
73. Petters R.M., Alexander C.A., Wells K.D., Collins E.B., Sommer J.R., Blanton M.R., Rojas G., Hao Y., Flowers W.L., Banin E., Cideciyan A.V., Jacobson S.G. & Wong F. 1997. Genetically engineered large animal model for studying cone photoreceptor survival and degeneration in retinitis pigmentosa. *Nature Biotechnology*. 15: 965-970.
74. Phelps C.J., Koike C., Vaught T.D., Boone J., Wells K.D., Chen S.H., Ball S., Specht S.M., Polejaeva I.A., Monahan J.A., Jobst P.M., Sharma S.B., Lamborn A.E., Garst A.S., Moore M., Demetris A.J., Rudert W.A., Bottino R., Bertera S., Trucco M., Starzl T.E., Dai Y. & Ayares D.L. 2003. Production of $\alpha 1,3$ -galactosyltransferase deficient pigs. *Science*, 299: 411-414.
75. Plasterk R.H. 2002. RNA silencing: the genome's immune system. *Science*. 296: 1263-1265.
76. Platenburg G.J., Kootwijk E.A.P., Kooiman P.M., Woloshuk S.L., Nuijens J.H., Krimpenfort P.J.A., Pieper F.R., de Boer H.A. & Strijker R. 1994. Expression of human lactoferrin in milk of transgenic mice. *Transgenic Research*. 3: 99-108.
77. Platt J.L. & Lin S.S. 1998. The future promises of xenotransplantation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 862: 5-18.
78. Pursel V.G., Pinkert C.A., Miller K.F., Bolt D.J., Campbell R.G., Palmiter R.D., Brinster R.L. & Hammer R.E. 1989. Genetic engineering of livestock. *Science*. 244: 1281-1288.
79. Pursel V.G., Wall R.J., Mitchell A.D., Elsasser T.H., Solomon M.B., Coleman M.E., Mayo F. & Schwartz R.J. 1999. Expression of insulin-like growth factor-I in skeletal muscle of transgenic pigs. In *Transgenic animals in agriculture* (J.D. Murray, A.M. Oberbauer & M.M. McGloughlin, eds). CABI Publishing, New York, pp. 131-144.
80. Rapacz J. & Hasler-Rapacz J. 1989. Animal models: the pig. In *Genetic factors in atherosclerosis: approaches and model systems* (R.S. Sparkes & A.J. Lusis, eds). Karger, Basle, pp. 139-169.
81. Rossant J. 2001. Stem cells from the mammalian blastocyst. *Stem Cells*, 19: 477-482.
82. Rudolph N.S. 1999. Biopharmaceutical production in transgenic livestock. *Trends in Biotechnology*. 17: 367-374.

83. Saeki K., Matsumoto K., Kinoshita M., Suzuki I., Tasaka Y., Kano K., Taguchi Y., Mikami K., Hirabayashi M., Kashiwazaki N., Hosoi Y., Murata N. & Iritani A. 2004. Functional expression of a Delta12 fatty acid desaturase gene from spinach in transgenic pigs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 101: 6361-6366.
84. Schätzlein S., Lucas-Hahn A., Lemme E., Kues W.A., Dorsch M., Manns M.P., Niemann H. & Rudolph K.L. 2004. Telomere length is reset during early mammalian embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 101: 8034-8038.
85. Schätzlein S. & Rudolph K.L. 2005. Telomere length regulation during cloning, embryogenesis and aging. *Reproduction Fertility and Development*. 17: 85-96.
86. Schnieke A.E., Kind A.J., Ritchie W.A., Mycock K., Scott A.R., Ritchie M., Wilmut I., Colman A. & Campbell K.H. 1997. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science*. 278: 2130-2133.
87. Shim H., Gutierrez-Adan A., Chen L.R., BonDurant R.H., Behboodi E. & Anderson G.B. 1997. Isolation of pluripotent stem cells from cultured porcine primordial germ cells. *Biology of Reproduction*. 57: 1089-1095.
88. Staeheli P. 1991. Intracellular immunization: a new strategy for producing disease-resistant transgenic livestock? *Trends in Biotechnology*. 9: 71-72.
89. Stinnakre M.G., Vilotte J.L., Soulier S. & Mercier J.C. 1994. Creation and phenotypic analysis of α -lactalbumin-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 91: 6544-6548.
90. Swanson M.E., Martin M.J., O'Donnell J.K., Hoover K., Lago W., Huntress V., Parsons C.T., Pinkert C.A., Pilder S. & Logan J.S. 1992. Production of functional human hemoglobin in transgenic swine. *Biotechnology*. 10: 557-559.
91. Templin M.F., Stoll D., Schrenk M., Traub P.C., Vohringer C.F. & Joos T.O. 2002. Protein microarray technology. *Trends in Biotechnology*. 20: 160-166.
92. Theuring F., Thunecke M., Kosciessa U. & Turner J.D. 1997. Transgenic animals as models of neurodegenerative disease in humans. *Trends in Biotechnology*. 15: 320-325.
93. Van Berkel P.H., Welling M.M., Geerts M., van Veen H.A., Ravensbergen B., Salaheddine M., Pauwels E.K., Pieper F., Nuijens J.H. & Nibbering P.H. 2002. Large scale production of recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic cows. *Nature Biotechnology*. 20: 484-487.
94. Van den Hout J.M., Reuser A.J., de Klerk J.B., Arts W.F., Smeitink J.A. & Van der Ploeg A.T. 2001. Enzyme therapy for Pompe disease with recombinant human α -glucosidase from rabbit milk. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 24: 266-274.
95. Wall R.J., Powell A., Paape M.J., Kerr D.E., Bannermann D.D., Pursel V.G., Wells K.D., Talbot N. & Hawk H. 2005. Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. *Nature Biotechnology*. 23: 445-451.
96. Ward K.A. 2000. Transgene-mediated modifications to animal biochemistry. *Trends in Biotechnology*. 18: 99-102.
97. Weidle U.H., Lenz H. & Brem G. 1991. Genes encoding a mouse monoclonal antibody are

- expressed in transgenic mice, rabbits and pigs. *Gene*. 98: 185-191.
98. Weissmann C., Enari M., Klohn P.C., Rossi D. & Flechsig E. 2002. Transmission of prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 99: 16378-16383.
99. Wheeler M.B. 1994. Development and validation of swine embryonic stem cells: a review. *Reproduction Fertility and Development*. 6: 563-568.
100. Wheeler M.B., Bleck G.T. & Donovan S.M. 2001. Transgenic alteration of sow milk to improve piglet growth and health. *Reproduction*. 58 Suppl.: 313-324.
101. White D. 1996. Alteration of complement activity: a strategy for xenotransplantation. *Trends in Biotechnology*. 14: 3-5.
102. Wigdorovitz A., Mozgovoij M., Santos M.J., Parreno V., Gomez C., Perez-Filgueira D.M., Trono K.G., Rios R.D., Franzone P.M., Fernandez F., Carrillo C., Babiuk L.A., Escribano J.M. & Borca M.V. 2004. Protective lactogenic immunity conferred by an edible peptide vaccine to bovine rotavirus produced in transgenic plants. *Journal of General Virology*. 85: 1825-1832.
103. Wilmut I., Beaujean N., De Sousa P.A., Dinnyes A., King T.J., Paterson L.A., Wells D.N. & Young L.E. 2002. Somatic cell nuclear transfer. *Nature*. 419: 583-586.
104. Wiznerowicz M. & Trono D. 2005. Harnessing HIV for therapy, basic research and biotechnology. *Trends in Biotechnology*. 23: 42-47.
105. Yamada K., Yazawa K., Shimizu A., Iwanaga T., Hisashi Y., Nuhn M., O'malley P., Nobori S., Vagefi P.A., Patience C., Fishman J., Cooper D.K., Hawley R.J., Greenstein J., Schuurman H.J., Awwad M., Sykes M. & Sachs D.H. 2005. Marked prolongation of porcine renal xenograft survival in baboons through the use of α 1,3-galactosyltransferase gene-knockout donors and the cotransplantation of vascularized thymic tissue. *Nature Medicine*. 11: 32-34.
106. Yom H.C. & Bremel R.D. 1993. Genetic engineering of milk composition: modification of milk components in lactating transgenic animals. *American Journal of Clinical Nutrition*. 58 (2 Suppl.): 299S-306S.
107. Ziomek C.A. 1998. Commercialization of proteins produced in the mammary gland. *Theriogenology*. 49: 139-144.

ASPECTOS TÉCNICOS E BIOLÓGICOS NA RECUPERAÇÃO DE OÓCITOS VIA TRANS-VAGINAL GUIADA POR ULTRA-SOM EM VACAS

Bols¹, P.E.J.; Leroy², J.L.M.R.; Viana³, J.H.M.

¹Laboratory for Veterinary Physiology, Department of Veterinary Sciences, University of Antwerp, Universiteitsplein 1, Gebouw U, B-2610 Wilrijk, Belgium; ²Department of Reproduction, Obstetrics and Herd Health, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Salisburylaan 133, 9820 Merelbeke, Belgium; ³Embrapa Dairy Cattle Research Center, Juiz de Fora, MG 36038-330 Brazil.
Peter.Bols@ua.ac.be

RESUMO

A aspiração folicular trans- vaginal guiada por ultra-sonografia (OPU) é um método de escolha para a recuperação de oócitos imaturos provenientes de doadoras vivas de alto valor para a produção de embriões *in vitro*. Este artigo consiste em uma visão geral dos mais importantes fatores técnicos e biológicos que determinam a taxa de sucesso na recuperação de oócitos via trans-vaginal guiada por ultra-som em vacas. Na introdução comentamos sobre técnicas gerais que envolvem a recuperação de oócitos, enquanto oferecemos brevemente, possíveis critérios para a seleção de folículos e de oócitos. Na segunda parte, discutimos sobre os fatores que influenciam a qualidade e a quantidade de oócitos recuperados. Primeiramente, existe um grupo de fatores técnicos como o procedimento de aspiração, tipo de agulha, e a influência do vácuo durante aspiração influenciando na morfologia do complexo *cummulus* oócito recuperado.

Em segundo lugar, existe um enorme grupo de influências biológicas, como por exemplo, a estimulação hormonal antes da punção folicular, o momento do procedimento com relação ao ciclo estral, idade, raça, e condições fisiológicas da doadora. Na seqüência discutimos sobre o uso da OPU em combinação com a produção *in vitro* de embriões para o tratamento da esterelidade em pacientes bovinos como sendo um método para a obtenção de produtos adicionais oriundos de doadoras que apresentam uma fertilidade comprometida.

A performance e a saúde reprodutiva de doadoras submetidas a sessões repetidas de OPU são comentados. Concluindo, a possibilidade de futuras pesquisas relacionadas à técnica de OPU são discutidas. Um ganho é esperado no desenvolvimento de melhores equipamentos ultra-sonográficos, permitindo uma ótima visualização dos folículos menores. Adicionalmente, o equipamento de OPU será utilizado para os seguintes propósitos: recuperação de biópsias do corpo lúteo e para injeção local de mediadores ovarianos, permitindo o estudo de efeitos hormonais parácrinos locais, bem como a sua influência sobre o a qualidade do oócito.

INTRODUÇÃO

Por muitas décadas, a punção de folículos ovarianos bovinos (imaturos) tem sido usada para a recuperação de oócitos destinados a produção de embriões *in vitro* (PIV). Várias informações novas revisando as técnicas de PIV e transferência de embriões em animais domésticos indicam que a disponibilidade de oócitos de “boa” qualidade é um dos pré-requisitos mais importantes para o sucesso (Hasler, 1998; Galli et al., 2001; Merton et al., 2003). A punção de folículos imaturos dos ovários de doadoras vivas claramente trouxeram novas perspectivas aos programas de reprodução assistida, pois uma maior quantidade de gametas tornarem-se disponíveis para a PIV durante um longo período de tempo, diferentemente de doadoras submetidas ao abate. A recuperação de oócitos durante a vida permite modificações endocrinológicas da atividade ovariana da doadora antes da recuperação de oócitos, influenciando na quantidade e qualidade dos complexos *cumulus* oócitos (CCO's) recuperados.

Algumas diferenças básicas existem entre a recuperação de oócitos post-mortem e *in vivo*. Primeiramente, a manipulação ovariana trans-retal é possível ou até mesmo necessária, durante a recuperação de oócitos em doadoras vivas, para que se consiga visualizar o folículo por meio de imagem laparoscópica ou ultra-sonográfica. Entretanto, quando os folículos são puncionados dos ovários provenientes de abatedouro, um folículo específico pode ser puncionado por meio de visualização direta. Além disso, diferentes forças mecânicas têm seu papel durante a punção de folículos *in vitro*, comparado a aspiração folicular realizada *in vivo*, sendo a pressão do vácuo possivelmente ajustada durante a aspiração (Hashimoto et al., 1999a). Diferentes métodos têm sido utilizados na coleta repetida de oócitos em vacas vivas, como a punção de folículos durante a laparoscopia (Schellander et al., 1989), a qual resulta em altas taxas de recuperação, embora com a desvantagem de ser relativamente invasiva e trabalhosa.

Callesen et al. (1987) foi o primeiro a utilizar a ultra-sonografia para coletar oócitos em vacas vivas usando a abordagem trans-cutânea, enquanto uma técnica de aspiração trans-vaginal por laparoscopia foi descrita por Reichenbach et al. (1994). Finalmente, Pieterse et al. (1988) modificou a técnica de recuperação de oócitos (ovum pick-up), originalmente desenvolvida em reprodução humana (Dellenbach et al., 1984), para o uso em vacas. Desta maneira, um método pouco invasivo e de alta repetibilidade (Pieterse et al., 1991a) tornou-se disponível para a recuperação de oócitos em vacas vivas. Becker e colaboradores (1996) comparou a recuperação de oócitos via trans-vaginal sob o controle da ultra-sonografia, ou utilizando uma combinação de instrumentos de endoscopia. Eles concluíram que o uso de equipamentos ultra-sonográficos resultou em uma melhor qualidade do complexo *cumulus* oócitos, provavelmente por causa das maiores injúrias causadas pelo sistema de aspiração realizado através de endoscopia, o que foi confirmado por Santl et al. (1998). A técnica de aspiração OPU foi adaptada para ser usada em doadoras vivas submetidas à recuperação repetida de oócitos provenientes de novilhas e vacas selecionadas com um alto mérito genético (Kruip et al., 1994), para a reprodução de um grande número de bezerras com características de produção conhecidas, e para encurtar o intervalo entre gerações em programas reprodutivos em bovinos. Pieterse et al. (1988) afirmaram que o objetivo final era o de produzir mais embriões e mais gestações por vaca doadora do que através da superovulação e programas de transferência de embriões (TE). Os resultados da OPU,

em termos numéricos e de qualidade, no que diz respeito a recuperação do complexo cumulus oóculo (CCO's) são influenciados por fatores técnicos e biológicos (Bols, 1997; De Roover et al., 2005), os quais serão discutidos com maiores detalhes. Por razões práticas, a “recuperação de oócitos guiada por ultra-som” ou “ovum pick-up” será abreviada como OPU no decorrer do restante deste capítulo.

RECUPERAÇÃO DE OÓCITOS: QUAL FOLÍCULO PUNCIÓNAR?

A relação entre o diâmetro folicular e a qualidade do oócito dentro do CCO parece ser de importância vital para a seleção de folículos. Price et al., 1995 usaram a tecnologia de ultra-sonografia para acompanhar a seqüência de desenvolvimento de um folículo em um determinado momento. Eles observaram uma correlação direta entre o diâmetro dos folículos dissecados e os diâmetros observados por ultra-sonografia, sendo os últimos, 2 a 3 mm menores. Cada folículo pode ser considerado como um micro-ambiente para o oócito que se encontra dentro dele (para uma revisão mais recente, Gilchrist et al., 2004).

O crescimento do folículo dominante está associado ao aumento nas concentrações de estradiol-17 β dentro do folículo, o qual se torna dominado pelo estradiol (Assey et al., 1994). Folículos subordinados têm uma razão mais baixa entre estradiol-17 β e progesterona ou são dominados pela progesterona. Price et al. (1995) notaram que as concentrações de estradiol-17 β foram significativamente menores em folículos em regressão, e folículos histologicamente em atresia, comparados com aqueles não atrésicos. Embora Arlotto et al., (1995) tenha documentado o crescimento de oócitos em folículos bovinos de todos os tamanhos estudados. Fair and colaboradores (1995) obtiveram apenas uma pequena correlação positiva entre o diâmetro do oócito e o tamanho do folículo. Aparentemente, o aumento do diâmetro do oócito em 120 μ m, ocorre quando o tamanho folicular aumenta mais do que 3 mm, sendo a total competência meiótica já alcançada aos 110 μ m. Lonergan et al. (1994) obteve CCO's de primeira qualidade (com muitas camadas de células do *cumulus*) e com um alto número de blastocistos a partir de oócitos provenientes de folículos > 6mm de diâmetro. Isto foi confirmado por outros (Pavlok et al., 1992; Blondin and Sirard, 1995), os quais documentaram um pobre desenvolvimento em oócitos originados de folículos com diâmetro < 2-3 mm. No entanto, quando a OPU é realizada em um programa comercial de produção de embriões, usualmente todos os folículos são punccionados para maximizar o rendimento de oócitos obtidos. O método de recuperação tem claramente um impacto na morfologia do complexo *cumulus* oócito (CCO) e subseqüentemente na capacidade de desenvolvimento *in vitro* (Bols et al., 1996a, 1997). A importância das células do *cumulus* estarem intactas para a maturação oocitária e para o desenvolvimento *in vitro* não deve ser sub-estimado (Konishi et al., 1996). Oócitos desnudos apresentaram uma taxa de fertilização significativamente menor quando comparada aos CCO's com um *cumulus* denso, gerando as mais altas taxas de clivagem (Shioya et al., 1988). Oócitos bovinos imaturos são divididos em diferentes categorias de qualidade, baseando-se na avaliação da compactação das células do *cumulus* e na transparência do citoplasma observada através da microscopia de luz (de Loos et al., 1989; Hazeleger et al., 1995). Oócitos de boa qualidade têm um ooplasma homogêneo e são circundados por uma multi-camada compacta de revestimento do *cumulus*. Quanto menos compacta as células do *cumulus*, mais irregular o citoplasma, e menor a qualidade. O

contato próximo entre as células do *cummulus* e o ooplasma é estabelecido através dos processos de terminação das células do *cummulus*. Nos oócitos de melhor qualidade, processos penetram no córtex e constituem as junções Gap junto ao oolema (de Loos et al. 1991), sendo isso menos observado ou nem mesmo presente nos oócitos de menor qualidade. Blondin and Sirard (1995) mostraram que oócitos com sinais de expansão inicial das camadas exteriores das células do *cummulus* e com ooplasma levemente granulado desenvolveram-se significativamente mais, além do estágio de 16 células quando comparados a outros oócitos. Infelizmente, não tem havido muito progresso no que diz respeito a outro critério de avaliação da qualidade oocitária que não seja de maneira invasiva. As técnicas de avaliação da qualidade oocitária são quase que sempre invasivas, tanto que os oócitos são perdidos mais adiante nas culturas *in vitro*, seguindo a verificação da qualidade. Desta maneira, possíveis conclusões têm sempre que ser extrapoladas a outros oócitos não-testados, os quais são colocados em desenvolvimento *in vitro* sem perturbações. No entanto, resultados promissores foram atingidos recentemente utilizando-se uma coloração brilhante de azul cresyl para se selecionar um maior número de oócitos competentes provenientes de cabras (Rodriguez-Gonzalez et al., 2002) ou de bovinos (Alm et al., 2005) pré- púberes.

FATORES TÉCNICOS QUE INFLUENCIAM OS RESULTADOS DA OPU

A taxa de sucesso da OPU é medida parcialmente pela taxa de recuperação (RR = número de oócitos a cada 100 folículos puncionados), a qual é entre outros fatores, influenciada pela visualização dos folículos (Bols et al., 2004a), pelo diâmetro da agulha e nível de vácuo da aspiração (Bols et al., 1996, 1997), e pela experiência do operador (Scott et al., 1994). Como resultado, as RRs variam entre 7% (Scott et al., 1994) e 69,6% (Looney et al., 1994), nos diferentes grupos de pesquisa. Recentes avanços na tecnologia de ultra-som têm aumentado a resolução de imagem e a qualidade da visualização dos ovários (Hashimoto et al., 1999). Além disso, outros transdutores de ultra-som foram testados recentemente para o uso na OPU trans-vaginal. Um transdutor linear (Esaote/Pie Medical, Maastricht, Netherlands) acoplado a uma probe trans-retal padrão utilizada rotineiramente (Figura 1) pode se adequar ao uso na OPU, quando em mãos experientes (Bols et al., 2004a).

A visualização de folículos acabou então se tornando melhor com a probe de múltipla angulação mecânica (Esaote/Pie Medical, Maastricht, the Netherlands), (Figura 2).



Figura 1- Transdutor linear acoplado a probe utilizada na OPU (acima) comparada a uma probe de múltipla angulação mecânica (abaixo).

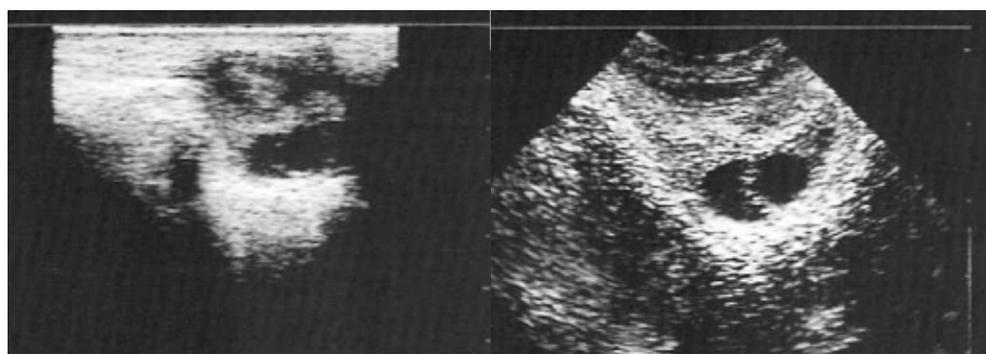


Figura 2- Comparação entre a visualização de um folículo do mesmo ovário utilizando-se o transdutor linear (esquerda) e o transdutor de angulação múltipla (direita).

Uma agulha bem afiada é essencial para o sucesso da OPU, como relatado anteriormente (Scott et al., 1994). Durante anos, diferentes diâmetros de agulhas e pressões de aspiração foram utilizados em experimentos envolvendo a OPU bovina (Tabela. 1), tornando difícil a comparação entre as taxas de recuperação. Uma importante desvantagem das agulhas longas e não descartáveis é que elas se tornam rombas rapidamente e precisam ser afiadas regularmente, embora nunca re-adquiram sua condição inicial (Simon et al., 1993). Por isso, adaptamos o sistema de OPU ao uso de agulhas de injeção hipodérmicas, mais baratas (Bols et al., 1995) e utilizando a combinação de uma probe setorial de angulação múltipla a uma área de “scanning” unilateral acoplado ao novo sistema guiado por agulhas descartáveis.

Tabela 1. Diferentes níveis de vácuo na aspiração e diâmetros de agulhas.

Autores	Vácuo na aspiração	Diâmetro da agulha
Pieterse <i>et al.</i> , 1988	30-40 ml água/ min	0,8-1,0 mm ID ^a
van der Schans <i>et al.</i> , 1991	40 mm Hg	18-g
Gibbons <i>et al.</i> , 1994	75 mm Hg	17-g
Kruip <i>et al.</i> , 1994	40-50 mm Hg	0,9 mm ID ^a
Looney <i>et al.</i> , 1994	22 ml água/min	17-g
Scott <i>et al.</i> , 1994	26 ml água/min	17-18-g
Vos <i>et al.</i> , 1994	4,4 ml água/min	0,6 mm ID ^a
Bols <i>et al.</i> , 1995	36 ml água/min	19-g
Bungartz <i>et al.</i> , 1995	10 ml água/min	18-g
Stubbings <i>et al.</i> , 1995	não mencionado	18-g
Becker <i>et al.</i> , 1996	22,4 ml água/min	0,8 mm ID ^a
Garcia and Salaheddine, 1998	25 ml água/min	18-g
Santl <i>et al.</i> , 1998	16-20 ml água/min	17-g
Hashimoto <i>et al.</i> , 1999a	40 to 160 mm Hg	18 e 21-g
Hashimoto <i>et al.</i> , 1999b	30 ml água/min	18-g
Imai <i>et al.</i> , 2000	não mencionado	17-g
Goodhand <i>et al.</i> , 1999, 2000	70-80 mm Hg	20-g
Ward <i>et al.</i> , 2000	30-90 mm Hg	19-g
Galli <i>et al.</i> , 2001	20-25 ml água/min	19-g
Petyim <i>et al.</i> , 2001	12-15 ml água/min	20-g
Seneda <i>et al.</i> , 2001	65-70 mm Hg	19-g
Argov <i>et al.</i> , 2004	25 ml/min	18-g
Hendriksen <i>et al.</i> , 2004	não mencionado	18-g

^aID: Diâmetro interno da agulha

A pressão exata de aspiração na ponta da agulha depende da construção do aparato, do comprimento e diâmetro do sistema de tubos, assim como do diâmetro da agulha. Para que se possa comparar os sistemas, o vácuo de aspiração utilizado deve ser melhor expresso, assim como a quantidade de fluido aspirada por minuto, descrita em mLs, e não em mmHg. Devido a importância do revestimento intacto das células do *cummulus* para a maturação do oócito e para sua capacidade de desenvolvimento, verificou-se a injúria causada pelo procedimento de aspiração nos CCOs, utilizando-se agulhas descartáveis. As mais altas RR foram obtidas com as agulhas mais largas (18 -g), independente da pressão de vácuo utilizada, enquanto outros estudos demonstraram a recuperação de um maior número de oócitos utilizando-se um vácuo de aspiração mais forte (taxa de fluxo de aspiração de ± 36 mL de fluido/minuto) com uma média de 75%. A percentagem de recuperação de CCOs intactos diminuiu progressivamente assim que o vácuo de aspiração aumentou, sendo associado a um aumento consistente no número de oócitos desnudos obtidos, assim como observado por Ward et al. (2000). Os efeitos do procedimento de aspiração nos CCOs, foram verificados através da re-aspiração de complexos *cummulus* oócitos compactos (CCOCs) utilizando-se o sistema guiado por agulhas descartáveis *in vitro*. Isto resultou na re-coleta de 80% ou, em outras palavras, um em cinco CCOs foi perdido no sistema de aspiração (Bols et al., 1997). Um caminho mais complexo para o oócito percorrer durante a aspiração é inevitável quando se utiliza o sistema guiado por agulhas descartáveis. Entre 80 a 90% dos CCOCs recuperados permaneceram envoltos pelo revestimento do *cummulus* compacto após a aspiração, enquanto que 10 a 20% encontraram-se microscopicamente afetados pelo procedimento da OPU, sendo as células do *cummulus* parcialmente ou totalmente removidas, dificultando desta maneira, o potencial de desenvolvimento do oócito *in vitro* (Zhang et al, 1995).

FATORES BIOLÓGICOS INFLUENCIANDO OS RESULTADOS DA OPU

Frequência e momento da punção folicular

A técnica de OPU tem como vantagem a alta repetibilidade. Pieterse et al. (1991) puncionou folículos durante os diferentes estágio do ciclo estral, ao longo de um período de 3 meses. Vos e colaboradores (1994) recuperaram 5 vezes mais CCOs, 22 horas após o pico de LH comparado a recuperação bem próxima ao aumento de LH. A proporção de oócitos de boa qualidade foi maior para vacas puncionadas no dia 5, quando comparadas ao dia 8 do ciclo, enquanto que o folículo dominante aparentemente teve sua competência reduzida durante o desenvolvimento dos oócitos de folículos subordinados, até mesmo em estágios relativamente tardios de dominância (Hendriksen et al., 2004). Van der Schans et al. (1991) puncionou um grande número de folículos (46.0 vs 25.3) e recuperou mais CCOs (18.8 vs 10.8) em vacas estimuladas, quando os ovários foram puncionados duas vezes, e não uma vez por semana. A frequência não afetou nem o número de folículos aspirados e nem o número de CCOs coletados por sessão, assim como confirmado mais tarde por Garcia and Salaheddine (1998), concluindo que as aspirações de folículos parecem induzir e sincronizar as ondas foliculares. A maioria dos pesquisadores concorda que o esquema de coleta de oócitos realizado duas vezes por semana tem um efeito positivo no número de folículos disponíveis por punção (Simon et al., 1993), e no número de

blastocistos em cultivo (Gibbons et al., 1994). Pode se assumir que o folículo dominante é ablado durante cada sessão onde a vaca é submetida a aspiração duas vezes por semana, estimulando desta maneira uma onda de pequenos folículos para o crescimento (Bergfelt et al., 1994). No entanto, outros trabalhos documentam ótimos resultados com um intervalo de 7 dias entre sessões subsequentes de OPU (Imai et al., 2000).

Fisiologia e condição corporal da doadora

A OPU é geralmente realizada em programas reprodutivos de gado envolvendo novilhas sadias com ótimas características. No entanto, gestação não exclui OPU, desde de que os oócitos possam ser recuperados dentro dos primeiros 3 meses de gestação, mesmo após o tratamento com FSH (Meintjes et al., 1995), embora isso não vá sempre aumentar o número de oócitos recuperados (Bungartz et al., 1995). Dominguez (1995) contou um menor número de folículos grandes e médios em vacas prenhes quando comparadas a vacas cíclicas. Argov e colaboradores (2004) observaram um aumento no número de oócitos obtidos, com menor número de aspirações por sessão, em vacas no início da lactação. A subnutrição teve uma influência negativa na competência do desenvolvimento de oócitos *in vivo*, ilustrada pela diminuição do número de blastocistos em vacas com score de condição corporal diminuída (Lopez Ruiz et al., 1996) e um aumento da proporção de oócitos de boa qualidade com o aumento do score de condição corporal (Dominguez, 1995). Leroy e colaboradores (2004) demonstraram que, típicas alterações metabólicas, encontradas no soro de vacas de leite de alta produção, logo após o pós-parto, são refletidas no fluido folicular do folículo dominante, possivelmente afetando a competência do desenvolvimento do oócito.

Raça e idade da doadora

Raças européias aparentemente mostraram um número de folículos significativamente maior quando comparados às Zebu (Dominguez, 1995), enquanto não se detectou diferenças na proporção de oócitos normais. De Armas *et al.* (1994) relatou que as raças Holandêsas geraram um maior número de CCOs por ovário, embora apresentassem menores taxas de clivagem, sendo que os animais mestiços (Zebu x Holandês) originaram as mais altas proporções de blastocistos. O aumento no uso de OPU-FIV nas áreas tropicais vai definitivamente gerar mais dados em um futuro próximo. O uso da OPU em doadoras jovens é limitado por causa das pequenas dimensões da pelvis. Novilhas Holstein Friesian podem ser submetidas a OPU, iniciando na idade de 6 a 8 m., dependendo das dimensões dos transdutores e sonda intra-vaginais utilizados (Bols et al., 1999). Bezerras podem ser puncionadas, embora requerem uma abordagem diferente dos ovários (Brogliatti et al., 1995). Um dos maiores problemas com doadoras pré-puberes é a diminuição da capacidade de desenvolvimento dos oócitos *in vitro* (Taneja et al., 2000). Embora grande número de folículos possam ser gerados com a utilização de gonadotrofinas exógenas, os oócitos parecem ser deficientes no que diz respeito à competência para o desenvolvimento. Grandes variações em produção de oócitos e blastocistos parecem existir entre diferentes populações de doadoras. Coletamos em média 3.1 oócitos por sessão usando doadoras não estimuladas da raça Belgian Blue

com fertilidade deficiente, comparado a 6.1 oócitos em novilhas Holandêsas saudáveis. Os números de blastocistos correspondentes por sessão foram 0.5 e 1.5 respectivamente (Bols et al., 1996b, 1998).

O papel da estimulação hormonal antes da OPU.

Embora Pieterse et al. (1991b) afirmaram que a OPU repetidamente é possível em vacas não estimuladas, ou em todas as situações onde folículos maiores que 2 mm estiverem presentes (Kruip et al., 1994), baixa atividade folicular precisa ser estimulada em algumas doadoras, predominantemente usando combinações de FSH-LH ou gonadotrofinas do soro de éguas prenhes (PMSG, eCG). Enquanto esses hormônios são bem conhecidos nos programas de TE, modificações nas doses e no momento do tratamento são necessários, sendo o objetivo final da estimulação antes da OPU, gerar um maior número de folículos, e não de ovulações. Pieterse et al. (1988) encontrou as maiores taxas de recuperação em vacas doadoras tratadas com PMSG, sendo seus ovários maiores e com um maior número de folículos quando comparados a animais não estimulados. Um trabalho mais tardio (Pieterse et al., 1992) no entanto mostrou um maior número de folículos aspirados por ciclo em sessões estimuladas, embora com um efeito oposto na RR, o qual foi menor em vacas estimuladas vs doadoras não estimuladas. Looney et al. (1994) relatou um aumento no número de folículos aspirados e oócitos recuperados após o tratamento com FSH, o qual foi confirmado mais tarde por Meintjens et al. (1995) em doadoras prenhes. Efeitos positivos do FSH, no número de folículos com um diâmetro > 6 mm (Lonergan et al., 1994) e no número de blastocistos viáveis (Van Soom et al., 1995; Goodhand et al., 2000) foram relatados. No entanto, o aumento no número de folículos é inconsistente, como demonstrado por Paul et al. (1995), que encontrou um aumento significativo em RR e no número de mórulas em animais tratados com FSH, dependendo do estágio do ciclo Stubbings and Walton (1995). Esses autores não encontraram diferenças no número médio de folículos disponíveis para punção realizada a cada semana, entre vacas não estimuladas, vacas aspiradas duas vezes por semana e vacas estimuladas com FSH, sendo aspiradas uma única vez. Mudanças súbitas em dosagem de FSH influenciaram os tamanhos, mas não o número de folículos, as quais foram meramente influenciadas pelas doadoras e pelas sessões de OPU (De Roover et al., 2005a). Análises detalhadas do número de folículos e de oócitos coletados após as sessões de OPU demonstraram padrões distintos durante a estimulação com FSH. Respostas baixas, médias e altas foram caracterizadas com base nas diferenças em número de folículos desenvolvidos, CCOs recuperados, blastocistos cultivados e taxas de recuperação (De Roover et al., 2005b). Deve se considerar que os tratamentos com FSH podem induzir uma assincronia entre a maturação do oócito e seu ambiente folicular (de Loos et al., 1991) ou entre maturação nuclear e citoplasmática (Bousquet et al., 1995), resultando em redução das taxas de desenvolvimento.

Resultados inconsistentes e imprevisíveis obtidos com o uso do protocolo de estimulação tradicional, levou pesquisadores a investigarem terapias alternativas de estimulação. Por causa da influência positiva que a somatotropina bovina (BST) tem sobre o crescimento folicular (De La Sota et al., 1993; Gong et al., 1993), investigamos os efeitos do tratamento com BST por um período longo na população folicular antes da OPU (Bols et al., 1998). Embora os resultados mostrem um aumento significativo no número total folículos no grupo tratado com rBST, não houve aumento no número de

oócitos recuperados. Isso pode ter sido causado por uma expansão das células do *cummulus* (Izadyar et al., 1996), por meio da qual o CCO permaneceu preso no folículo ou no sistema de aspiração no momento da recuperação. Murakami et al. (2003) demonstrou um efeito positivo das combinações de FSH e BST no número de folículos puncionados e na recuperação de oócitos viáveis. É muito provável que, a estimulação hormonal e a frequência de punção da OPU estejam relacionadas, determinando a produtividade final de embriões. De Ruigh et al. (2000) concluiu que o tratamento com FSH, antes da OPU realizada uma vez a cada duas semanas, resultou em um número significativamente maior de CCOs e de embriões produzidos *in vitro* a cada sessão de OPU, quando comparado ao esquema de OPU, duas vezes por semana sem estimulação. No entanto, o total de embriões produzidos durante o período de duas semanas acabou sendo maior para o esquema de duas vezes semanalmente (4 sessões não estimuladas em 2 semanas) comparadas a uma sessão de OPU estimulada com FSH a cada duas semanas. Goodhand et al. (1999) concluíram que o tratamento de doadoras com FSH aspiradas uma vez por semana, produziu um número similar de embriões transferíveis por doadora por semana, como encontrado em aspirações realizadas duas vezes por semana sem tratamento com FSH.

O USO DA OPU NO TRATAMENTO DA ESTERELIDADE BOVINA

Comparada a TE, onde a vaca pode ser lavada 3 a 4 vezes durante o ano, com uma média de produção de 5 embriões por lavado, a OPU pode ser feita duas vezes por semana. Em vacas doadoras sadias, podendo atingir a produção de 2 embriões por doadora por semana, igualando a produção a 4 - 5 vezes a média de produção obtida em TE clássicas (Kruip et al., 1994). As possibilidades em estimular a atividade ovariana antes da OPU são vantagens adicionais, assim como as variações de combinações nos acasalamentos *in vitro* com oócitos provenientes de uma mesma sessão de OPU por doadora, abreviando o processo de seleção. Por outro lado, OPU/ FIV pode ser usada para gerar produtos adicionais de uma vaca de alto valor que não responda mais aos tratamentos utilizados na coleta de embriões. Os primeiros bezerros oriundos de OPU na Bélgica nasceram em 1995, após a recuperação de oócitos de doadoras Belgian Blue com fertilidade comprometida (Bols et al., 1996). Acompanhando a transferência de 56 embriões de FIV, 12 prenhezês foram obtidas, levando a pelo menos um bezerro para cada 7 vacas de 12 doadoras com um alto valor genético. Devido a estreita base genética da raça, alguns criadores convenceram-se que isso poderia fazer alguma diferença. Looney e colaboradores (1994) relataram sobre a OPU em 200 animais, a maioria sendo vacas doadoras, as quais 50% tinham um histórico de uma boa produção de embriões. Uma média de 6,3 oócitos por sessão foram recuperados, e 16,4% desenvolveram-se até o estágio de blastocistos, enquanto 813 embriões transferidos resultaram em 325 prenhezês (40%). Hasler et al. (1995) desenvolveu um trabalho semelhante em 155 vacas de leite inférteis. Uma média de 4,9 oócitos por sessão foram recuperados, com 4,1 oócitos aproveitáveis para FIV. Acompanhando a transferência de 2.268 embriões frescos, 1.220 prenhezês (53,8%) foram obtidas. Um grande número de dados mostra que a produção de embriões *in vitro*, após a recuperação oocitária trans-vaginal, tem atingido um estágio de rotina com 5 e até 8 embriões por sessão (Merton et al., 2003). No entanto, o sucesso final de qualquer técnica de reprodução assistida é medido pelo número de bezerros produzidos. Portanto, existe também uma

necessidade de maior reserva de vacas receptoras sadias e bem sincronizadas nas quais embriões frescos possam ser transferidos. A otimização dos protocolos de criopreservação para a obtenção de um aumento na taxa de sobrevivência de embriões FIV pós-descongelamento permanecerá um ponto importante em futuras pesquisas.

A SAÚDE DA DOADORA E AS REPETIÇÕES DA OPU

Relatos sobre o impacto do procedimento de OPU na saúde da doadora e na performance reprodutiva são escassos. Pieterse et al. (1991) não encontrou aderências após a OPU, demonstrando que o procedimento não parece afetar a fertilidade futura da doadora. Mais recentemente, novilhas de leite foram acompanhadas durante dois períodos de 4-5 semanas, enquanto submetidas a OPU duas vezes por semana (Petyim et al., 2000). Elas mostravam sinais de cio ocasionalmente e estruturas semelhantes ao corpo lúteo desenvolveram-se a partir de folículos punccionados, correspondendo aos nossos achados no que diz respeito ao perfil de progesterona, a OPU repetida parece induzir um certo grau de aciclicidade (Bols et al., 1998). Ao final do primeiro período de OPU, essas novilhas recuperaram a ciclicidade normal. Achados *post-mortem* após o segundo período, foram representados pelo engrossamento da túnica albugínea do ovário e endurecimento discreto dos ovários. Os autores concluíram que a OPU não parece causar efeitos negativos exacerbados na estrutura ovariana, e nem na função ovariana subsequente (Petyim et al., 2000). Outras pesquisas revelam um aumento significativo nos níveis de FSH no dia após a punção (Petyim et al., 2001). As concentrações de cortisol e batimento cardíaco aumentaram significativamente após contenção e injeção epidural, embora ambos os parâmetros retornaram ao normal em 10 minutos após o término do procedimento

OBJETIVOS DE FUTURAS PESQUISAS

Embora a aspiração oocitária via trans-vaginal guiada por ultra-sonografia seja um método de recuperação oocitária bem estabelecido (Bousquet et al., 1999, Galli et al., 2001), as pesquisas continuam em ambos os aspectos técnicos e biológicos. Um aumento no número de oócitos recuperados pode ser esperado, graças as melhorias na visualização do folículo (Singh et al., 2003). Aspirações rotineiras de pequenos folículos, as quais são comprovadamente benéficas em aumentarem a taxa de recuperação de oócitos (Seneda et al., 2001) será uma possibilidade. Estudos adicionais serão conduzidos para refinar, simplificar e economizar a técnica tornando-a disponível em ampla escala mundialmente. Recentemente, um outro transdutor foi adaptado para uso na OPU bovina. A probe R10 (Esaote/ Pie Medical, Maastricht, the Netherlands) é um transdutor convexo de 7.5 MHz com um ângulo de 150°. Ele foi montado em um sistema de guia de probe (Nutricell, Campinas, Brazil) acoplado a um sistema guiado por agulha descartável (Figure 3). Esta probe R10 funciona bem na visualização de folículos, pela fácil manipulação ovariana dentro de uma área de imagem ampla e devido a sua alta resolução de imagem.

Resultados preliminares geraram uma média de $5,1 \pm 3$ oócitos em doadoras Holandêsas não estimuladas (Aerts et al., 2004). O sistema está sendo testado para o uso na rotina em larga escala.



Figura 3- O transdutor R10 convexo (Esaote/Pie Medical, Maastricht, the Netherlands) em um sistema delineado para a guia de probe (Nutricell, Campinas, Brazil).

O equipamento de OPU está agora sendo usado para injeção trans-vaginal de substâncias diretamente nos ovários, a fim de estudar e modular a atividade ovariana. Oropeza e colaboradores (2004) usaram injeções intra-foliculares de fator de crescimento I semelhante a insulina, em uma tentativa de superar deficiências de desenvolvimento em oócitos de vacas pré-pubescentes, levando ao aumento de blastocistos. Uma dose moderada de FSH foi injetada diretamente dentro do ovário para superar a excessiva estimulação ovariana. Resultados preliminares indicam uma correspondente estimulação ovariana moderada, com um aumento no número de folículos médios disponíveis para a punção (Bols et al., 2004b).

Recentemente, pesquisas relacionadas a dinâmica folicular têm sido re-direcionadas à populações de folículos primordiais e pré-antrais. Onde folículos antrais podem ser estudados por visualização ultra-sonográfica, folículos pré-antrais podem apenas serem visualizados em seções ovarianas coradas, obtidas após o abate ou através de laparotomia o que não permite o estudo de acompanhamento da dinâmica folicular. Portanto, desenvolvemos e testamos um novo método para coletar biópsias repetidamente em vacas doadoras através da punção guiada por ultra-som trans-vaginal do ovário (Aerts et al., 2005). Existe apenas um relato anteriormente publicado a respeito de uma técnica similar para biópsia de corpo lúteo em vacas (Kot et al., 1999). A técnica de biópsia pode ser uma ferramenta útil para a propósitos experimentais e de diagnóstico, como para a determinação do número de folículos primordiais em ovários de doadoras vivas. Além disso, biópsias ovarianas repetidas podem ser usadas para se estudar os efeitos hormonais de determinados tratamentos *in vivo*. Finalmente, é aceito de uma maneira geral que folículos primordiais constituem um material para cultura *in vitro*. Nossa técnica de biópsia trans-vaginal é minimamente invasiva, sendo um procedimento com repetibilidade para a coleta de folículos primordiais e pré - antrais.

CONCLUSÕES GERAIS

A coleta de oócitos via trans-vaginal está bem documentada, no que diz respeito a procedimentos utilizados rotineiramente para a recuperação de oócitos em vacas doadoras vivas, tanto para propósitos de pesquisa quanto para aplicações comerciais. O seu sucesso pode ser medido pelo número de oócitos

de boa qualidade inclusos em um cummulus compacto recuperados por sessão, e essencialmente dependente de fatores técnicos e biológicos. Equanto o primeiro já tem sido intensivamente estudado, o maior progresso é esperado ao se controlar o segundo. Experimentos futuros vão incluir protocolos de estimulação alternativos para se aumentar o número de folículos disponíveis por punção e o número de oócitos recuperados. Diversos estudos bem delineados indicaram que o impacto da OPU na saúde da doadora e da vida reprodutiva futura tem proporções limitadas. No entanto, a saúde e o bem estar animal devem ser sempre considerados, pois a boa saúde de uma doadora será pré-requisito para repetidas recuperações de inúmeros oócitos.

AGRADECIMENTOS

O autor agradece M. Julian (University of Connecticut, USA) pela assistência na edição deste manuscrito.

REFERÊNCIAS

1. Aerts JMJ, Leroy JLMR, Bols PEJ. The use of an endovaginal ultrasound micro-convex array transducer adapted for transvaginal oocyte retrieval in de cow. *Proceedings of the 15th ICAR Conference, 2004, Porto Seguro, Brazil: Abstr. vol 2:435.*
2. Aerts JMJ, Oste M, Bols PEJ. Development and practical applications of a method for repeated transvaginal, ultrasound-guided biopsy collection of the bovine ovary. *Theriogenology* 2005; in press.
3. Alm H, Torner H, Löhrke B, Viergutz T, Ghoneim IM, Kanitz W. Bovine blastocyst development rate in vitro is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Theriogenology* 2005;63:2194-2205.
4. Argov N, Arav A, Sklan D. Number of oocytes obtained from cows by OPU in early, but not late lactation increased with plasma insulin and estradiol concentrations and expression of mRNA of the FSH receptor in granulosa cells. *Theriogenology* 2004;61:947-962.
5. Arlotto T, Schwartz JL, First NL, Leibfried-Rutledge ML. Aspects of follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology* 1995;43:943-956.
6. Assey RJ, Hyttel P, Greve T, Purwantara B. Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. *Mol Reprod Dev* 1994;37:335-344.
7. Becker F, Kanitz W, Nürnberg G, Kurth J, Spitschak M. Comparison of repeated transvaginal ovum pick-up in heifers by ultrasonographic and endoscopic instruments. *Theriogenology* 1996;46:999-1007.
8. Bergfelt DR, Lightfoot KC, Adams GP. Ovarian dynamics following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in cyclic heifers. *Theriogenology* 1994;41:161.
9. Blondin P, Sirard MA. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 1995;41:54-62.
10. Bols PEJ, Vandenheede JMM, Van Soom A, de Kruif A. Transvaginal ovum pick-up (OPU) in the cow: a new disposable needle guidance system. *Theriogenology* 1995;43:677-687.
11. Bols PEJ, Van Soom A, Ysebaert MT, Vandenheede JMM, de Kruif A. Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. *Theriogenology* 1996a;45:1001-1014.
12. Bols PEJ, Van Soom A, de Kruif A. Gebruik van de transvaginale Ovum Pick-Up (OPU) techniek: geboorte van de eerste OPU kalveren in België. (Use of transvaginal oocyte pick-up: first OPU

- calves bom in Belgium) *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 1996b;65:86-91.
13. Bols PEJ. *Transvaginal Ovum Pick-Up in the Cow: Technical and Biological Modifications*. 1997. Ph.D. thesis. University of Ghent, Ghent, Belgium.
 14. Bols PEJ, Ysebaert MT, Van Soom A, de Kruif A. Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on tbc morphology and developmental capacity of bovine compact cumulus oocyte complexes. *Theriogenology* 1997;47:1221-1236.
 15. Bols PEJ, Ysebaert MT, Lein A, Coryn M, Van Soom A, de Kruif A. Effects of long term treatment with bovine somatotropin on follicular dynamics and subsequent oocyte and blastocyst yield during an OPU-IVF program. *Theriogenology* 1998;49:983-995.
 16. Bols PEJ, Taneja M, Van de Velde A, Riesen J, Schreiber D, Echelard Y, Ziomek C, Yang X. Pregnancies from prepubertal heifers following repeated oocyte collection and IVF between 6 to 12 months of age. *Theriogenology* 1999;51:298.
 17. Bols PEJ, Leroy JLMR, Vanholder T, Van Soom A. A comparison of a mechanical sector and a linear array transducer for ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval (OPU) in the cow. *Theriogenology* 2004a;62:906-914.
 18. Bols PEJ, Van Holder T, Leroy JLMR, Aerts JMJ, Van Soom A. Ultrasound-guided transvaginal injection of a low dose of FSH-LH into the bovine ovary as an alternative way to stimulate follicular growth: preliminary results. *Reprod Fert Dev* 2004b;16:230-231.
 19. Bousquet D, Milovanov C, Bell JC, Durocher J, Smith LC. Nuclear and cytoplasmic maturation of oocytes aspirated from large follicles in superovulated heifers. *Theriogenology* 1995;43:172.
 20. 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* 1999;51:59-70.
 21. Brogliatti GM, Swan CD, Adams GP. Transvaginal ultrasound-guided oocyte collection in 10 to 16 weeks of age calves. *Theriogenology* 1995;43:177.
 22. Bungartz L, Lucas-Hahn A, Rath D, Niemann H. Collection of oocytes from cattle via follicular aspiration aided by ultrasound with or without gonadotropin pretreatment and in different reproductive stages. *Theriogenology* 1995;43:667-676.
 23. Callesen H, Greve T, Christensen F. Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocytes. *Theriogenology* 1987;27:217.
 24. de Armas R, Solano R, Pupo CA, Aguilar A, Aguirre A, Riego E, Castro FO. Effect of the donor oocyte breed on in vitro fertilization results in cattle. *Theriogenology* 1994;41:186.
 25. De La Sota RL, Lucy MC, Staples CR, Thatcher WW. Effects of recombinant bovine somatotropin (Sometribove) on ovarian function in lactating and non-lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 1993; 76:1002-1013.
 26. de Loos F, Van Vliet C, Van Maurik P, Kruip ThAM. Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Research*, 1989;24:197-204.
 27. de Loos FAM, Bevers MM, Dieleman SJ, Kruip ThAM. Morphology of preovulatory bovine follicles as related to oocyte maturation. *Theriogenology* 1991;35:527-535.
 28. De Roover R, Genicot G, Leonard S, Bols P, Dessy F. Ovum pick-up and in vitro embryo production in cows superstimulated with an individually adapted superstimulation protocol. *Anim Reprod Sci* 2005a;86:13-25.
 29. De Roover R, Bols PEJ, Genicot G, Hanzen Ch. Characterisation of low, medium and high responders following FSH stimulation prior to ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval in cows. *Theriogenology* 2005b;63:1902-1913.
 30. De Ruigh L, Mullaart E, van Wagtendonk-de Leeuw AM. The effect of FSH stimulation prior to ovum pick-up on oocyte and embryo yield. *Theriogenology* 2000;53:349.
 31. Dellenbach P, Nisand I, Moreau L, Feger B, Plumere C, Gerlinger P, Brun B, Rumpler Y. Transvaginal

- sonographically controlled ovarian follicle puncture for egg retrieval. *Lancet* 1984;1467.
32. Dominguez MM. Effects of body condition, reproductive status and breed on follicular population and oocyte quality in cows. *Theriogenology* 1995;43:1405-1418.
 33. Fair T, Hyttel P, Greve T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol Reprod Dev* 1995;42:437-442.
 34. Galli C, Crotti G, Notari C, Turini P, Duchi R, Lazzari G. Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology* 2001;55:1341-1357.
 35. Garcia A and Salaheddine M. Effects of repeated ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and subsequent follicular development. *Theriogenology* 1998;50:575-585.
 36. Gibbons JR, Beal WE, Krisher RL, Faber EG, Pearson RE, Gwazdauskas FC. Effects of once versus twice weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. *Theriogenology* 1994;41:206.
 37. Gilchrist RB, Ritter LJ, Armstrong DT. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Anim Reprod Sci* 2004;82-83:431-446.
 38. Gong JG, Bramley TA, Webb R. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian follicular growth and development in heifers. *J Reprod Fert* 1993;97: 247-254.
 39. Goodhand KL, Watt RG, Staines ME, Hutchinson JSM, Broadbent PJ. In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. *Theriogenology* 1999;51:951-961.
 40. Goodhand KL, Staines ME, Hutchinson JSM, Broadbent PJ. In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine oocyte donors treated with progestagen, oestradiol and FSH. *Anim Reprod Sci* 2000;63:145-158.
 41. 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* 1999a;51:757-765.
 42. Hashimoto S, Takakura R, Minami N, Yamada M. Ultrasound-guided follicle aspiration: effect of the frequency of a linear transvaginal probe on the collection of bovine oocytes. *Theriogenology* 1999b;52:131-138.
 43. Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, Jin ZO, McCauly AD, Mower SA, Neely B, Shuey LS, Stokes JE, Trimmer SA. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology* 1995;43:141-152.
 44. Hasler JF. The current status of oocyte recovery, in vitro embryo production, and embryo transfer in domestic animals, with an emphasis on the bovine. *J Anim Sci* 1998;76 (3 Suppl):52-74.
 45. Hazeleger NL, Hill DJ, Stubbings RB, Walton JS. Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocytes to their developmental potential in vitro. *Theriogenology* 1995;43:509-522.
 46. Hendriksen PJM, Steenweg WNM, Harkema JC, Merton JS, Bevers MM, Vos PLAM, Dieleman SJ. Effect of different stages of the follicular wave on in vitro developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology* 2004;61:909-920.
 47. Imai K, Kobayashi S, Tsujino T, Shin-noh M, Goto Y, Kaneyama K, Kojima T. Effect of the frequency of ovum pick-up intervals on follicle number, oocyte recovery and embryo production rates in cattle. *Theriogenology* 2000;53:359.
 48. Izadyar F, Colenbrander B, Bevers MM. Growth hormone stimulates in vitro bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development. *Theriogenology* 1996;45:279.
 49. Konishi M, Aoyagi Y, Takedomi T, Itakura H, Itoh T, Yazawa S. Presence of granulosa cells during oocyte maturation improved in vitro development of IVM-IVF bovine oocytes that were collected by ultrasound-guided transvaginal aspiration. *Theriogenology* 1996;45:573-581.

50. Kot K, Anderson LE, Wiltbank MC, Ginther OJ. Transvaginal, ultrasound-guided biopsy of the corpus luteum in cattle. *Theriogenology* 1999;52:987-993.
51. Kruip ThAM, Boni R, Wurth YA, Roelofsen MWM, Pieterse MC. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology* 1994;42:675-684.
52. Leroy JLMR, Vanholder T, Delanghe JR, Opsomer G, Van Soom A, Bols PEJ, Dewulf J, de Kruif A. Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum. *Theriogenology* 2004;62:1131-1143.
53. Lonergan P, Monaghan P, Rizos D, Boland MP, Gordon I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization and culture in vitro. *Mol Reprod Dev* 1994;37:48-53.
54. Looney CR, Lindsey BR, Gonseth CL, Johnson DL. Commercial aspects of oocyte retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. *Theriogenology* 1994;41:67-72.
55. Lopez Ruiz L, Alvarez N, Nunez I, Montes I, Solano R, Fuentes D, Pedroso R, Palma GA, Brem G. Effect of body condition on the developmental competence of IVM/IVF bovine oocytes. *Theriogenology* 1996;45:292.
56. Meintjens M, Bellow MS, Broussard JR, Paul JB, Godke RA. Transvaginal aspiration of oocytes from hormone-treated pregnant beef cattle for in vitro fertilization. *J Anim Sci* 1995;73:967-974.
57. Merton JS, de Roos APW, Mullaart E, de Ruigh L, Kaal L, Vos PLAM, Dieleman SJ. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology* 2003;59:651-674.
58. Murakami M, Perez O, Ferguson E, Behboodi E, Denniston RS, Godke RA. Use of in vivo-recovered oocytes and adult somatic cells from the same donor for nuclear transfer in cattle. *Vet Rec* 2003;153:713-714.
59. Oropeza A, Wrenzycki C, Herrmann D, Hadelers KG, Niemann H. Improvement of the developmental capacity of oocytes from prepubertal cattle by intraovarian insulin-like growth factor-I application. *Biol Reprod* 2004;70:1634-1643.
60. Paul JB, Looney CR, Lindsay BR, Godke RA. Gonadotropin stimulation of cattle donors at estrus for transvaginal oocyte collection. *Theriogenology* 1995;43:294.
61. Pavlok A, Lucas-Hahn A, Niemann H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol Reprod Dev* 1992;31:63-67.
62. Petyim S, Båge R, Forsberg M, Rodriguez-Martinez H, Larsson B. The effect of repeated follicular puncture on ovarian function in dairy heifers. *J Vet Med A* 2000;47:627-640.
63. Petyim S, Båge R, Forsberg M, Rodriguez-Martinez H, Larsson B. Effects of repeated follicular punctures on ovarian morphology and endocrine parameters in dairy heifers. *J Vet Med A* 2001;48:449-463.
64. Pieterse MC, Kappen KA, Kruip ThAM, Taverne MAM. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology* 1988;30:751-762.
65. Pieterse MC, Vos PLAM, Kruip ThAM, Willemse AH, Taverne MAM. Characteristics of bovine estrous cycles during repeated transvaginal, ultrasound-guided puncturing of follicles for ovum pick-up. *Theriogenology* 1991a;35:401-413.
66. Pieterse MC, Vos PLAM, Kruip ThAM, Wurth YA, van Beneden ThH, Willemse AH, Taverne MAM. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology* 1991b;35:19-24.
67. Pieterse MC, Vos PLAM, Kruip ThAM, Wurth YA, van Beneden ThH, Willemse AH, Taverne MAM. Repeated transvaginal ultrasound-guided ovum pick-up in ECG-treated cows. *Theriogenology* 1992;37:273.
68. Price CA, Carrière PD, Bhatia B, Groome NP. Comparison of hormonal and histological changes during follicular growth, as measured by ultrasonography, in cattle. *J Reprod Fertil* 1995;103:63-

- 68.
69. Reichenbach MD, Wiebke NH, Mödl J, Zhu J, Brem G. Laparoscopy through the vaginal fornix of cows for the repeated aspiration of follicular oocytes. *Vet Rec* 1994;135:353-356.
70. Rodríguez-González E, López-Béjar M, Velilla E, Paramio MT. Selection of prepubertal goat oocytes using the brilliant cresyl blue test. *Theriogenology* 2002;57:1397-1409.
71. Santl B, Wenigerkind H, Scherthaner W, Mödl J, Stojkovic M, Prella K, Holtz W, Brem G, Wolf E. Comparison of ultrasound-guided vs laparoscopic transvaginal ovum pick-up (OPU) in simmental heifers. *Theriogenology* 1998;50:89-100.
72. Schellander K, Fayrer-Hosken R, Keefer C, Brown L, Malter H, McBride C, Brackett B. In vitro fertilisation of bovine follicular oocytes recovered by laparoscopy. *Theriogenology* 1989;31:927-933.
73. Scott CA, Robertson L, de Moura RTD, Paterson C, Boyd JS. Technical aspects of transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration in cows. *Vet Rec* 1994;134:440-443.
74. Seneda MM, Esper CS, Garcia JM, de Oliveira JA, Vantini R. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. *Anim Reprod Sci* 2001;67:37-43.
75. Shioya Y, Kuwayama M, Fukushima M, Iwasaki S, Hanada A. In vitro fertilization and cleavage capability of bovine follicular oocytes classified by cumulus cells and matured in vitro. *Theriogenology* 1988;30:489-496.
76. Simon L, Bungartz L, Rath D, Niemann H. Repeated bovine oocyte collection by means of a permanently rinsed ultrasound guided aspiration unit. *Theriogenology* 1993;39:312.
77. Singh J, Adams GP, Pierson RA. Promise of new imaging technologies for assessing ovarian function. *Anim Rep Sci* 2003;78:371-399.
78. Stubbings RB, Walton JS. Effect of ultrasonically-guided follicle aspiration on estrous cycle and follicular dynamics in Holstein cows. *Theriogenology* 1995;43: 705-712.
79. Taneja M, Bols PEJ, Van de Velde A, Ju J-C, Schreiber D, Tripp MW, Levine H, Echelard Y, Riesen J, Yang X. Developmental competence of juvenile calf oocytes in vitro and in vivo: influence of donor animal variation and repeated gonadotropin stimulation. *Biol Reprod* 2000;62:206-213.
80. van der Schans A, van der Westerlaken CAJ, de Wit AAC, Eyestone WH, de Boer HA. Ultrasound-guided transvaginal collection of oocytes in the cow. *Theriogenology* 1991;35:288.
81. Van Soom A, Bols PEJ, de Kruif A. Improved results in IVF-treatment of sterility patients by careful selection of bulls and by stimulation of cows with FSH before slaughter. *Reprod Dom Anim* 1995; Suppl 3:67.
82. Vos PLAM, de Loos FAM, Pieterse MC, Bevers MM, Taverne MAM, Dieleman SJ. Evaluation of transvaginal ultrasound-guided follicle puncture to collect oocytes and follicular fluids at consecutive times relative to the preovulatory LH surge in eCG/PG treated cows. *Theriogenology* 1994;41:829-840.
83. Ward FA, Lonergan P, Enright BP, Boland MP. Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production in vitro using ovum pick-up technology. *Theriogenology* 2000;54:433-446.
84. Zhang L, Jiang S, Wozniak PJ, Yang X, Godke RA. Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization and embryo development in vitro. *Mol Reprod Dev* 1995;40:338-344.

PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS- PROBLEMAS E DESAFIOS- VISÃO OBSTÉTRICA

Prof. Adj. Nereu Carlos Prestes

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ, UNESP, Campus de Botucatu, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, Botucatu - SP – Brasil, CEP 18618-000.

nereu@fmvz.unesp.br

INTRODUÇÃO

Charles Darwin (1809-1882) foi um naturalista inglês metódico e laborioso que propôs a teoria da seleção natural impressionado com as características dos fósseis sul americanos e pelas espécies das Ilhas Galápagos. No ano de 1838, leu o *Essay on Population* (Ensaio sobre a população) de Malthus, demonstrava que as populações aumentam em proporção geométrica até serem contidas pelo suprimento limitado de alimento que cresce em proporção aritmética. Sobre isto Darwin escreveu: “as populações estando bem preparadas e pelas observações contínuas dos hábitos dos animais e plantas, para avaliar a luta pela existência que se verifica em todos os lugares, percebi logo que sob certas circunstâncias, variações favoráveis tenderiam a se conservar e as desfavoráveis, a serem destruídas”. O resultado seria a origem de novas espécies. Em 1859 publicou o livro “Sobre a origem das espécies por meio da seleção natural, ou a preservação das raças favorecidas na luta pela vida” (Storer, Usinger, 1977). Constata-se desta forma que a teoria de Malthus foi derrubada pela seleção natural das espécies, perpetuando aqueles indivíduos geneticamente mais aptos e recentemente com a aplicação de tecnologia se obtém a produção multiplicada de alimentos em pequenas áreas cultiváveis.

O desenvolvimento da ciência como um todo, levou o homem a criar novas técnicas que fornecerão subsídios para a melhoria da qualidade de vida e a conservação ambiental.

Nos últimos 50 anos, a biotecnologia vem se aprimorando para suprir as necessidades de consumo e produção. Na área da reprodução animal houve avanços concretos na congelamento de sêmen, inseminação artificial, superovulação, transferência de embriões, aspiração folicular, fertilização *in vitro*, sexagem de embriões e espermatozoides, transgenia, clonagem e outras tantas, que aumentaram a eficiência reprodutiva e aceleraram o ganho genético dos animais de produção. Outra perspectiva de avanço é a manipulação do material genético, selecionando genes associados a características específicas, alterando a linha germinativa e produzindo animais que serão utilizados em programas de cruzamentos tradicionais. Para a produção animal a precisa manipulação genética, principalmente nos bovinos, tem grande apelo econômico devido a possibilidade de se alterar positivamente as taxas de crescimento, a constituição corporal, a resistência a doenças e a criação de bioreatores para a produção farmacêutica revolucionando a terapêutica humana (Wolf, 2001).

É notório o esforço e o progresso obtidos pela comunidade científica e pela iniciativa privada na consolidação e domínio da biotecnologia. Atualmente, estão disponíveis técnicas eficazes para a

multiplicação de machos e fêmeas com produtividade desejada, bem como sua utilização em um manejo mais adequado. Primeiramente, é importante destacar a inseminação artificial, incluindo a indução e a sincronização de cios como instrumentos fundamentais à multiplicação de animais geneticamente superiores. A partir do século passado, biotecnologias foram desenvolvidas visando a produção de alimentos em maior quantidade e de melhor qualidade. Os conhecimentos gerados influíram no padrão de vida e longevidade humana. Os principais avanços envolvem a manipulação genética. Sem dúvida, as técnicas de biologia molecular revolucionaram os conceitos acumulados ao longo dos anos. No entanto, a ética e o controle de produtos gerados a partir de técnicas que não estão completamente dominadas devem estar presentes na implementação das novas biotecnologias, para que as gerações futuras não sofram graves prejuízos gerados por sua utilização inadequada (Gonçalves et. al., 2002). Os mesmos autores enfatizam que o objetivo da clonagem especificamente não é fazer cópias dos melhores animais, mas aperfeiçoar os melhores animais disponíveis. O melhor animal dos anos 50, provavelmente é inferior que a média dos animais atuais em termos de produção, enfatizando o poderio de seleção natural e a seleção induzida e dirigida pelo homem.

OS PROBLEMAS E OS DESAFIOS

Este assunto merece considerações ponderadas, pois há carência de dados estatística e cientificamente comprovados no rebanho nacional disponíveis na literatura. As observações constatadas pelos profissionais que trabalham a campo são multifatoriais e dependentes da condição das receptoras, alimentação, manejo geral, monitorização do parto, fatores geográficos envolvendo o meio ambiente e clima. Outro fator preponderante que influencia o resultado final é a qualificação da mão-de-obra especializada e do pessoal prestador de serviço básico nas propriedades rurais. Profissional desqualificado, não treinado, desinformado e mal remunerado é responsável pela manutenção, cuidados e primeiros socorros ao parto de produtos valiosos do ponto de vista genético e econômico.

Hasler (1996) relatou a frequência de abortamentos em gestações derivadas de PIV utilizando o meio TCM-199. Contudo afirmou que a perda ao nascimento de produtos oriundos de PIV é de 15% quando comparada aos 9% de perdas nos bezerros oriundos da TE convencional. Há também a incidência de 1% de hidroalantóide diagnosticados. Isto representa um significativo aumento da frequência quando comparou com 1 caso em 7.500 nascimentos descritos de gestação por monta natural. Relatou um aumento no peso ao nascimento de 7Kg em produtos oriundos de PIV, quando comparados a bezerros oriundos de inseminação artificial. Afirmou que achados similares foram observados em ovelhas. Finalmente, embora não tão bem quantificado, a fase preparativa do parto não é exibida por muitas receptoras, resultando em perdas e intervenções com cesariana.

Peixer, Dode & Rumpf (2000) entre outras considerações, relataram que o alto peso ao nascer, gestação prolongada, aumento nas taxas de abortamento, aumento da mortalidade perinatal e elevação da incidência de anomalias congênitas estão associadas com prenhezes obtidas utilizando embriões fertilizados *in vitro*.

Farin, Grosier & Farin (2001) afirmaram que uma grande quantidade de informações publicadas sobre PIV em bovinos ilustram os diferentes protocolos e condições dos meios de cultivo sobre a

morfologia do embrião e o subsequente desenvolvimento fetal. Diferenças nas fontes de obtenção dos óocitos, técnicas de preparação espermática, maturação oocitária, condições de fertilização, ambiente de cultura e outros fatores podem ter efeito sobre as taxas de desenvolvimento, sanidade e qualidade dos embriões. Em extenso levantamento bibliográfico os autores descreveram e catalogaram as seguintes alterações associadas ao sistema de produção *in vitro* de embriões:

Observadas nos bezerros:

- elevado peso ao nascer
- alteração no desenvolvimento dos órgãos
- malformação congênita (ex.: hipoplasia cerebelar)
- metabolismo energético alterado
- maior mortalidade neonatal

Observadas nos fetos:

- aumento desproporcional no peso
- alteração no desenvolvimento das fibras musculares
- aumentado número de partos prematuros

Observadas na placenta:

- aumento de hidroalantóide
- edema
- redução do contato materno-fetal
- poucos placentomas

Observados nas receptoras:

- aumento na taxa de abortamento
- gestação prolongada
- aumento das distocias e número de cesarianas

Detalharam também com extremo critério, as perdas no período embrionário (dia 1° ao 42°) quando termina a organogênese; durante a fase fetal (42° ao 280° dia) e no período neonatal (parto ao 28° dia), bem como os fatores que interferem sobre as doadoras, as alterações placentárias macro e microscópicas e a importância da progesterona influenciando o desenvolvimento do concepto em bovinos e ovelhas. Concluíram que tudo indica que a exposição ao ambiente *in vitro* durante os sete primeiros dias de vida, pode influenciar a morfologia do embrião, a expressão do seu gene e interferir no desenvolvimento fetal e placentário em bovinos originando a síndrome do neonato grande (*large offspring syndrome*), cujo mecanismo biológico permanece desconhecido.

O conhecimento de como diferentes componentes do sistema *in vitro* influenciam o desenvolvimento fetal e placentário poderá resultar em um método de cultivo mais confiável no sentido de produzir embriões, fetos e bezerros 100% normais.

Apresentamos abaixo (Tabela 1) os achados histológicos das necropsias de bezerros oriundos de PIV, que foram a óbito durante parto normal, operação cesariana ou poucas horas após o nascimento, encaminhados ao hospital veterinário da Unesp, campus de Botucatu- São Paulo em 2004-2005. Em muitas necropsias não foi possível concluir a etiologia da morte dos animais; os casos onde foi possível estão descritos na Tabela 2.

Tabela 1- Achados de necropsia de bezerros oriundos de PIV (n= 34).

Achados/órgão	Rim	Baço	Coração	Fígado	Pulmão	ID	Timo	Cérebro	Córtex
Congestão	25	16	03	17	22	05	12	12	02
Autólise	01			01		03			
Degeneração macrovacuolar	03		01	08					
Degeneração epitelial	03								
Degeneração tubular	11								
Degeneração microgoticular	06			06					
Degeneração macrogoticular	10			10					
Degeneração vacuolar	01		01						
Degeneração hidrópica				02					
Infiltrado inflamatório	02		02	04	10	08	02		01
Necrose	11			02		06			
Edema	03		03		19	01		03	01
Gliose								10	02
Rarefação linfóide							01		
Colestase				05					
Hemorragia	06	02	04	03	07	03			
Enfisema					10				
Atelectasia					11				
Espessamento		03		01					
Esteatose				01					
Retração		02		01	01	01			
Telangiectasia				01					
NDN	02	05	17		02	06	05	01	

Piagentini, M.; Rocha, N. S.; Prestes, N. C. Projeto de pesquisa em andamento- resultados parciais (2004-2005).

Tabela 2- Conclusão dos laudos de necropsia oriundos de bezerros de PIV (n=13)

Conclusão	Número de animais
Choque séptico por pneumo-enterite	01
Hepatite mononuclear hemorrágica	01
Choque endotóxico por enterite hemorrágica	01
Choque séptico por broncopneumonia bacteriana	01
Choque endotóxico por enterite bacteriana	01
Septicemia e onfaloflebite	01
Endotoxemia	01
Septicemia	01
Insuficiência respiratória	03
Choque endotóxico	01
Pneumonia supurativa e abomasite hemorrágica	01

Piagentini, M.; Rocha, N. S.; Prestes, N. C. Projeto de pesquisa em andamento- resultados parciais (2004-2005).

Para Farin, Farin & Piedrahita (2004) o estabelecimento da fertilização *in vitro* e sistemas de cultura para embriões mamíferos têm facilitado a utilização da tecnologia de embriões na pesquisa, indústria e aplicação clínica. Baseado em estudos em bovinos, ovinos e camundongos constatou-se que embriões produzidos neste sistema diferem em morfologia e desenvolvimento potencial comparados com embriões produzidos *in vivo*. O artigo enfatiza o papel da expressão gênica no desenvolvimento do neonato absoluto grande (L.O.S.).

Miglino (2004) em artigo sobre clonagem animal e placentação, descreveu as alterações macro e microscópicas observadas na placenta, ressaltou o reduzido número de placentônios, seu aumentado diâmetro e espessura. Relatou a ocorrência de fetos anormais exibindo hepatomegalia e hemorragia dérmica e afirmou que os casos de hidroalantóide são detectados em bovinos no terceiro trimestre da gestação e estão associados ao aumento da concentração plasmática materna da glicoproteína (PSP 60) que é produzida pelas células trofoblásticas binucleadas que migram em direção ao epitélio uterino. Edema e hemorragia nos placentônios sugerem comprometimento da gestação. Observações semelhantes foram relatadas por Pereira et. al. (2004).

Sartori (2004) afirmou que os poucos estudos que avaliaram mortalidade embrionária tardia/fetal precoce em bovinos de corte ou novilhas de leite, descreveram baixa incidência ($\leq 10\%$) de perdas, com exceção de novilhas e vacas de corte receptoras de embriões produzidos *in vitro*.

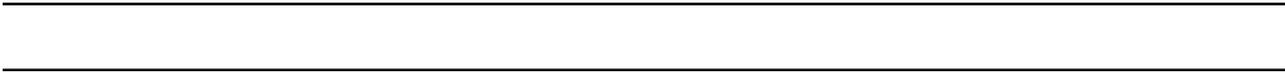
CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tendo o domínio da mais moderna biotecnologia reprodutiva disponível que está sendo implantada no país em explosiva escala comercial, criadores, técnicos, pesquisadores e empresários deverão investir esforços e recursos no sentido de aperfeiçoar o processo e lapidar a técnica a fim de corrigir as distorções, conhecer os mecanismos bioquímicos e fisiológicos, capacitar pessoal específico e seguir os preceitos da bioética para que a classe veterinária se beneficie com a geração de empregos e consolide o procedimento de forma segura e com total credibilidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Storer, T. I.; Usinger, R. L., *Zoologia Geral*. Companhia Editora Nacional, São Paulo, 3a Ed., 713p, 1977.
- Wolf, A. *A utilização da clonagem em mamíferos*- monografia- FMVZ-UNESP, 21p, Botucatu-SP, 2001.
- Gonçalves, P. B. D.; Visintin, J. A.; Oliveira, M. A. L.; Montagner, M. M.; Costa, L. F. S. Produção *in vitro* de embriões. In: Gonçalves, P. B. D.; Figueiredo, J. R.; Freitas, V. J. F. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. cap. 10, São Paulo, Varela, 2002.
- Gonçalves, P. B. D.; Oliveira, J. F. C.; Neves, J. P.; Bastos, E. M. Biotécnicas avançadas em reprodução: FIV, clonagem e transgênicos. In: I Congresso Brasileiro de Especialidades em Medicina Veterinária- I Encontro de Buiatria SP-MV, Curitiba, PR, 2002.
- Hasler, J. F. Commercial production of *in vitro*. Derived bovine embryos. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, Porto

- Alegre, 24, 117-134, supl., 1996.
- Peixer, M. A. S.; Dode, M. A. M.; Rumpf, R. In vitro production of embryos- Embrapa genetic resources and biotechnology poin of view. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, Porto Alegre, 28, 1, 163-166, supl., 2000.
- Farin, P. W.; Erosier, A. E.; Farin, C. E. Influence of in vitro systems on embryo survival and fetal development in cattle. *Theriogenology*, 55, 151-170, 2001.
- Ptak, G.; Clinton, M.; Tischner, M.; Barboni, B.; Mattiol, M.; Pasqualino, L. Improving delivery and offspring viability of in vitro produced and cloned sheep embryos. *Biology of Reproduction*, 67, 1719-25, 2002.
- Farin, C. E.; Farin, P. W.; Piedrahita, J. A. Development and cloned bovine embryos. *J. Anim. Sci.*, 82, 53-62, supl., 2004.
- Pereira, F. T. V.; Braga, F. C.; Assis Neto, A. C. et. al. Placentação em bovinos clonados. *Acta Scientiae Veterinariae*, 32, supl., 151, 2004.
- Miglino, M. A. Clonagem Animal e placentação. *Acta Scientiae Veterinariae*, 32, supl., p75-78, 2004.
- Sartori, R. Fertilização e morte embrionária em bovinos. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.32, p35-50, supl., 2004.



Work shops

ASPECTOS PECULIARES DA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM OVINOS

Bicudo, S.D.*; Azevedo, H.C.; Silva Maia, M.S.; Sousa, D.B.; Rodello, L.

DRARV - FMVZ – UNESP Botucatu - *sony@fmvz.unesp.br

Características reprodutivas da espécie ovina

A espécie ovina é caracterizada por apresentar um intervalo entre gerações muito curto. A puberdade pode ser desencadeada em algumas raças no quatro mês de idade. A gestação é de apenas cinco meses e o puerpério se completa entre 35 e 60 dias. Nas raças com aptidão para a produção de carne a terminação dos cordeiros destinados ao abate pode ser alcançada entre 60 e 90 dias de idade. Além disso o ciclo estral se caracteriza por um intervalo interestro de 16 dias. O estro, com duração aproximada de 30 horas apresenta como característica a ocorrência da ovulação em seu terço final. A estacionalidade reprodutiva típica da espécie é mais marcante em raças produtoras de lã e menos em raças lanadas especializadas em produção de carne e praticamente inexistente em raças deslanadas. Independente da especialização ou raça, no hemisfério Sul a época mais favorável a reprodução da espécie ocorre nos meses de outono de março a maio.

O sêmen do carneiro

O ejaculado do ovino é caracterizado por volume em torno de um a dois mililitros e total de espermatozoides ejaculados variando entre dois e seis bilhões. Não raramente constata-se no carneiro saudável alta motilidade com 80% ou mais de células com movimento retilíneo progressivo. As características de cinética e morfologia espermáticas são semelhantes a dos demais ruminantes. Para aplicações biotecnológicas o sêmen ovino é facilmente obtido por meio de vagina artificial, não requerendo condicionamento prévio dos reprodutores.

Modalidades de inseminação

A adoção e viabilização da técnica de I.A. exigem um módulo mínimo do rebanho para que haja retorno econômico adequado. Em todos os casos deve-se questionar se a monta natural, não é a opção que melhor atende aos interesses econômicos e do programa de melhoramento genético a ser implementado. Deve-se levar em conta que a I.A. exige requisitos mínimos de intensificação de manejo reprodutivo e condições mínimas devem ser atendidas. A escolha da modalidade de inseminação depende fundamentalmente da sua adequação ao nível tecnológico do rebanho.

A utilização de sêmen a fresco ou refrigerado, apresenta como característica requerer um maior volume de trabalho quando comparada à monta natural, representada pela detecção do estro das ovelhas a serem inseminadas, a colheita, avaliação e manipulação do sêmen e o ato com contenção individualizadas

das ovelhas. A refrigeração permite a utilização do sêmen por até 24 horas após sua colheita, com excelente resultado de fertilidade, com isso torna possível seu transporte, desde que se utilizem dispositivos isotérmicos adequados a este fim.

Meios diluidores são indispensáveis à criopreservação por refrigeração, sendo a proporção de diluição desejável de 1:1 a 1:2 (v:v). Diluições acima desse patamar geralmente resultam em baixa densidade final da mistura, o que implica em maior risco de refluxo nas inseminações cervicais superficiais. A dose inseminante deve conter entre 150 e 200 milhões de espermatozóides viáveis o que resulta na possibilidade de inseminação de 15 a 30 ovelhas com um único ejaculado. A principal exigência diferencial entre a utilização do sêmen a fresco ou refrigerado, refere-se ao maior conhecimento e rigor técnico quando da refrigeração do sêmen.

As I.A. com sêmen fresco ou refrigerado ao serem comparadas a com sêmen congelado, apresentam maiores chances de popularização, por requererem técnicas menos sofisticadas de deposição do sêmen no genital feminino, requerem equipamentos menos onerosos e menor rigor na cronologia do momento de inseminação. Deve-se levar em conta que a utilização de sêmen congelado possibilita uma maior pressão de seleção permitindo obter-se maior impacto sobre os programas de melhoramento genético e na dependência do estágio tecnológico do rebanho esta vantagem supera em muito as restrições técnicas impostas à sua utilização.

A criopreservação do sêmen ovino

Os princípios e técnicas a serem utilizadas na criopresevação do sêmen ovino se equivalem as dos demais ruminantes domésticos. Cada espécie possui composição seminal distinta, havendo ainda peculiaridades quanto a composição e sensibilidade das membranas espermáticas ao processo de criopreservação. Algumas modificações se fazem necessárias visando-se atender a estas particularidades. Foram constatados alguns efeitos mais contundentes impostos pela congelação sobre os espermatozóides ovinos caracterizados por modificação da atividade respiratória, criocapacitação em larga escala, modificação da interação com as células do oviduto e suspeita-se que pode haver pequeno incremento nas taxas de mortalidade de embriões obtidos com espermatozóides criopreservados. Todos estes efeitos resultam na necessidade de se depositar os espermatozóides criopreservados intra-uterinamente e em um momento adequado em relação à ovulação. Esses pontos críticos têm merecido a atenção de inúmeros grupos de pesquisa em todo mundo, para o incremento nos resultados da I.A, que já atingiram patamares de excelência e flexibilização das técnicas de deposição do sêmen no genital da ovelha, como alternativa a realização das laparoscopias.

As técnicas de Inseminação

A ovelha apresenta excelente competência no fechamento do canal cervical, decorrente do maior pregamento cervical interno determinando a formação de quatro a seis constrições (anéis) com intenso desalinhamento entre eles dificultando a transposição cervical por aplicadores de sêmen mesmo durante a vigência do estro. Há marcante diferença entre as raças ovinas quanto à possibilidade de transposição

trans-cervical. Diversas técnicas de têm sido propostas, porém a eficiência das manobras tem sido inconstante e principalmente as taxas de prenhez empregando sêmen congelado apresentam-se inferiores aos da inseminação por laparoscopia.

As inseminações envolvendo sêmen fresco ou resfriado são feitas pela técnica cervical superficial, empregando-se um espelho com fonte de luz que permita visualização e reconhecimento da abertura vaginal da cérvix e deposição no início do canal cervical de 100 a 150 microlitros de sêmen *in natura* ou diluído conforme discutido anteriormente. A colonização e longevidade espermáticas no genital da ovelha são suficientemente eficientes para permitirem a flexibilização do momento da inseminação, tanto que é possível empregar-se rufiação noturna com um turno de inseminações pela manhã.

O emprego do sêmen congelado requer inseminação intra-uterina e mundialmente a técnica de eleição é a laparoscópica, por apresentar maior repetibilidade de resultados. Diversas técnicas de transposição cervical possibilitam a deposição do sêmen no interior do útero, porém os resultados nem sempre comparáveis aos da laparoscopia permitem inferir-se hipóteses de que a manipulação cervical pode induzir efeitos ainda não conhecidos sobre a eficiência das inseminações. Especula-se ainda a existência de fatores de interação entre a inseminação por via trans-cervical e os padrões qualitativos da dose inseminante. O relaxamento cervical pelo emprego de fármacos como a prostaglandina do grupo E ou mesmo ocitocina, embora com eficiência demonstrada na literatura científica, ainda não é adotado em trabalhos rotineiros.

Como biotécnica associada indissociável a inseminação artificial empregando sêmen congelado está a indução/ sincronização do estro. Dos métodos disponíveis para este fim encontram-se o efeito macho e o *flushing* alimentar, mas o mais eficiente é aquele que emprega fármacos, pois permite controle eficaz do momento ovulatório.

O uso de dispositivos vaginais impregnados com progesterona natural ou sintética por 12 a 14 dias, associados a aplicação de gonadotrofina coriônica equina (eCG) entre 250 a 500UI no momento da retirada do dispositivo, permite grande eficiência na ocorrência do estro e agrupamento do momento ovulatório das ovelhas.

As inseminações por laparoscopia são realizadas de maneira sistemáticas entre 55 e 60 horas após a retirada dos dispositivos vaginais e aplicação do eCG, de maneira a constituir-se num sistema de inseminação artificial em tempo pré-estabelecido (IATF) com uso consagrado na espécie ovina a décadas.

Considerações finais

A aplicação de biotecnologia da reprodução na espécie ovina, principalmente aquelas relacionadas a I.A., permitem aliar a intensificação do manejo à precocidade potencial da espécie além de maximizar a utilização de reprodutores de alto mérito genético promovendo adequação ao seu valor econômico.

Bibliografia

Bicudo, S.D., Sousa, D.B., Takada, L., Possibilidades e limitações da inseminação com sêmen ovino refrigerado. *Rev.Bras.deReprod.Anim.* v.27, p.120-7, 2003.

- Gillan, L.; Maxwell, W.M.C.; Evans, G. Current state in semen preservation. *Reprod Fert Dev* 16(4):447-54, 2004
- Moraes, J.C.F., Souza, C.J.H., Gonçalves, P.B.D. Controle do estro e da ovulação em bovinos e ovinos. IN: Gonçalves, P.B.D., Figueiredo, J.R., Freitas, V.J.F. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. Varela, São Paulo, 2002, p.25-55.
- Salamon, S., Maxwell, W.M.C. Storage of ram semen. *Anim.Reprod.Sci*, v.62. p. 77-111, 2000.
- Wulster-Radcliffe, M.C.; Lewis, G.S. Transcervical artificial insemination in sheep. *Theriogenology*, 62: 990–1002, 2004

IDENTIFICAÇÃO PRECOCE DO SEXO FETAL EM PEQUENOS RUMINANTES ATRAVÉS DA ULTRA-SONOGRAFIA

Santos, M.H.B.¹; Moraes, E.P.B.X.¹; Moura, R.T.D.¹; Lima, P.F.¹;
Reichenbach, H-D.²; Oliveira, M.A.L.¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária/UFRPE. ²Bayerische Landesanstalt für
Landwirtschaft/Alemanha

Histórico e Características do Ultra-Som

A utilização da ultra-sonografia na medicina humana data de 1940 e na medicina veterinária a partir de 1950, entretanto, somente no final da década de 70 é que a qualidade desta tecnologia sofreu grande impulso com a possibilidade da obtenção de imagens em tempo real (Christopher & Merrit, 1998).

O sistema de ultra-som em tempo-real emite ondas sonoras de alta frequência que refletem as interfaces dos tecidos, caracterizadas por impedâncias acústicas diferentes, sendo exibidas no monitor com várias tonalidades da cor cinza. As imagens ultra-sonográficas são classificadas em anecóicas (escuras e oriundas de líquido que não reflete as ondas sonoras), hiperecóicas (brancas e provenientes de tecidos com grande capacidade refletora) e hipocóicas (variam em diferentes tonalidades da cor cinza) (Christopher & Merrit, 1998).

O desenvolvimento de equipamentos de ultra-som do tipo Scan-B com maior resolução de imagem e o aperfeiçoamento dos transdutores, nos últimos anos, determinaram maior acurácia e rapidez no diagnóstico de gestação, na quantificação e sexagem fetal em caprinos e ovinos (Nan et al., 2001; Bicudo, 2003). Para o diagnóstico de gestação, geralmente são utilizados equipamentos simples e economicamente mais acessíveis, todavia, para a identificação do sexo fetal são necessárias imagens com maior detalhamento das estruturas do feto, aspectos que são melhores obtidos através de equipamentos mais sofisticados, fato que determina maiores investimentos do criador ou do profissional liberal (Bürstel et al., 2002).

Diagnóstico de Gestação e Identificação do Sexo Fetal

A data da primeira visualização das diferentes características do concepto é variável e os fatores mais importantes que determinam esta variação são a frequência do transdutor e a via de acesso (Buckrell, 1988; Kähn, 1994).

As principais imagens ultra-sonográficas que caracterizam uma gestação são a presença de líquido intra-uterino, visualização da vesícula embrionária, detecção de pelo menos um embrião, visualização dos batimentos cardíacos, identificação da membrana amniótica, visualização dos placentomas, diferenciação da cabeça e tronco, identificação do botão germinativo dos membros, movimentos do

concepto, delimitação do cordão umbilical e visualização do globo ocular (Ishwar, 1995; Chalhoub & Ribeiro Filho, 2002).

A identificação do sexo fetal através da ultra-sonografia baseia-se na localização e diferenciação da genitália externa (Müller & Wittkowsky, 1986), sendo a estrutura anatômica do feto que possibilita este diagnóstico denominada de tubérculo genital -TG (Curran et al., 1989; Coughbrough & Castell, 1998). Em eqüinos, o diagnóstico pode ser efetuado entre o 55° e o 75° dia de gestação (Merkt & Moura, 2000) e nos bovinos a partir do 50° dia (Curran, 1992; Stroud, 1996), apesar do exame realizado no 60° dia conferir maior precisão (Barros & Visintin, 2001). A acurácia desta técnica é próxima de 100% tanto em bovinos (Gregory et al, 1995; Viana et al, 2000) quanto em eqüinos (Merkt & Moura, 2000).

Em pequenos ruminantes, a referida identificação pode contribuir para o diagnóstico do sexo de fetos após a inseminação artificial com sêmen sexado (Cran et al., 1997; Johnson, 2000; Garner, 2001), depois da transferência de embriões com sexo pré-determinado (Gutierrez-Adan et al., 1997) ou de embriões produzidos *in vitro* pela técnica da injeção intracitoplasmática de espermatozóide (Cat et al., 1996). Dentre as aplicações práticas desta biotécnica, pode-se destacar sua importância para a produção animal por permitir um melhor planejamento tanto para adquirir quanto para comercializar animais do próprio rebanho (Haibel, 1990), podendo racionalizar produção e lucratividade (Santos et al., 2004). Este melhor planejamento implica numa maior concentração de fêmeas nos rebanhos leiteiros e de machos nos de carne.

A determinação do sexo ocorre no momento da fecundação e influencia o desenvolvimento da gônada indiferenciada. Acredita-se que o fator de diferenciação testicular (TDF), gene localizado no cromossomo Y, conhecido como SRY, corresponde à região determinante do sexo do cromossomo Y. Sendo assim, no caso dos cromossomos sexuais XY, o Y induz a formação dos testículos, determinando o sexo gonádico masculino. No caso das células primordiais possuem apenas cromossomos sexuais XX, as gônadas indiferenciadas desenvolvem-se em ovários e estabelecem o sexo gonádico feminino (Wilkens, 1982).

No embrião macho, sob influência hormonal, o TG sofre um acentuado crescimento e assume a forma cilíndrica que origina o pênis. Na fêmea, devido à ausência de andrógenos testiculares e a provável ação de esteróides maternos, placentários e ovarianos fetais, o TG desenvolve-se pouco e forma o clitóris (Wilkens, 1982; Schnorr, 1989); o seio urogenital permanece curto e ao se dilatar origina o vestíbulo vaginal (Michel, 1986). As pregas urogenitais permanecem separadas para originar os lábios vulvares, cobrindo o TG situado no vestíbulo. Com o alongamento do tronco, as eminências genitais situam-se cranialmente ao TG (Noden & De Lahunta, 1990). Nos machos e nas fêmeas, as duas saliências ao redor das pregas uretrais, denominadas de labioescrotais, irão participar na formação do escroto e da vulva (Wilkens, 1982; Schnorr, 1989).

Morfologicamente, segundo Bürstel (2002), o concepto ovino e caprino entre o 35° e o 40° dia de gestação é, do ponto de vista anatômico, sexualmente indefinido e ambivalente, apesar de embriões ovinos aos 25 dias de gestação já apresentarem, de acordo com Schnorr (1989), uma discreta elevação entre os brotos dos membros posteriores, indicando a formação do TG. Entre o 28° e o 30° dia, o TG está mais proeminente e no 34° dia já é possível identificar o sexo do embrião. Com o desenvolvimento

do corpo do embrião e a migração do TG em direção ao umbigo nos machos e à cauda nas fêmeas, têm-se, respectivamente, a diferenciação deste órgão em pênis e clitóris. Portanto, a partir deste período, a distância compreendida entre o ânus e o TG, será maior no macho do que na fêmea.

Ultra-sonograficamente, o TG na espécie bovina pode ser identificado como uma estrutura constituída de dois lóbulos alongados, com aparência semelhante a duas barras paralelas ovais que refletem de forma intensiva as ondas ultra-sônicas que lhes são dirigidas (Curran et al., 1989).

Nos pequenos ruminantes, a sexagem fetal pela ultra-sonografia já é possível por volta do 40º dia. Todavia, é recomendável entre o 50º e o 58º dia, podendo ser também efetuada até o 64º dia, mas com uma precisão diagnóstica inferior (Bürstel, 2002). Em experimentos realizados pela equipe do Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE foi possível identificar o início da migração do TG aos 37 dias de gestação num único feto macho da raça Santa Inês e ao término do 46º dia, todos os fetos quantificados já haviam sido sexados. Em caprinos da raça Alpina Americana, o início da migração do TG ocorreu no 42º e somente no 55º dia é que todos os fetos foram devidamente sexados. Considerando que a migração do TG nos ovinos parece ocorrer de forma mais precoce do que nos caprinos, recomenda-se sexar fetos ovinos a partir do 50º dia e caprinos após o 55º dia, alertando que não deve ser efetuado depois do 70º dia de gestação em decorrência do tamanho do feto dificultar a visualização das estruturas anatômicas responsáveis pela identificação do sexo fetal.

Os principais fatores que impedem ou dificultam a sexagem são movimentos e posicionamento desfavorável do feto, membros cruzados ou cordão umbilical posicionado entre os membros. Particularmente nas fêmeas, o posicionamento da cauda pode interferir na visualização do TG (Nan et al., 2001). Para o diagnóstico de machos, pode-se também tomar como base, a presença do prepúcio imediatamente caudal ao cordão umbilical e/ou a presença da bolsa escrotal, geralmente de aparência triangular, entre os membros posteriores (Bürstell, 2002).

Ainda é importante comentar que gestação múltipla é um fator limitante da eficiência da sexagem em consequência de ser normalmente impossível identificar o sexo de todos os fetos quantificados num único exame. Este fato compromete a viabilidade econômica da atividade ultra-sonográfica em consequência da necessidade de repetir exames sem a devida segurança de que no próximo, o feto estará adequadamente posicionado para permitir a sexagem (Reichenbach et al., 2004).

Considerações Finais

É interessante ressaltar que além da espécie e do período de gestação, outros fatores como raça, idade e condição corporal da fêmea, qualidade do equipamento, capacidade e habilidade do operador podem determinar variações significativas na acurácia do diagnóstico ultra-sonográfico.

Apesar do exposto, a difusão desta tecnologia, sobretudo em condições de campo, ainda depende de uma maior eficiência no diagnóstico para que o custo/benefício permita a manutenção da atividade. Além disso, novos estudos sobre o assunto são necessários para definir, com maior exatidão, o período de migração do TG nos pequenos ruminantes na tentativa de antecipar a sexagem fetal nas referidas espécies.

Referências Bibliográficas

- BARROS, BJP; VISINTIN, JA. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.38, n.2, p. 74-79, 2001.
- BICUDO, SD. O diagnóstico ultra-sonográfico de gestação em ovinos. <http://www.fmvz.unesp.br/ovinos/repman3.htm>, 2003.
- BUCKRELL, BC Application of ultrasonography in reproduction in sheep and goats. *Theriogenology*, v.29, p.71-84, 1988.
- BÜRSTEL, D. Hannover, 2002. 142p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Institut für Reproduktionsmedizin, Tierärztliche Hochschule Hannover.
- BÜRSTEL, D. et al. *Vet. Rec.*, v.151, n.21, p.635-636, 2002.
- CATT, SL et al. *Vet. Rec.*, v.139, p.494-495, 1996.
- CHALHOUB, M; RIBEIRO FILHO, AL. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, supl.5, p.27-30, 2002.
- CHRISTOPHER, RB; MERRIT, MD. *Tratado de ultra-sonografia diagnóstica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p.3-29.
- COUGHBROUGH, CA; CASTELL, MC *Theriogenology*, v.50, p.263-267, 1998.
- CRAN, DG et al. *Theriogenology*, v.42, p.267, 1997.
- CURRAN, S. *Theriogenology*, v.37, p.17-21, 1992.
- CURRAN, S et al. *Anim. Reprod. Sci.*, v.19, p.217-227, 1989.
- GARNER, DL. *J. Androl.*, v.22, p.519-526, 2001.
- GREGORY, RM et al. CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11. 1995. Belo Horizonte. *Anais ...* Belo Horizonte: CBRA, 1995. p.412.
- GUTIERREZ-ADAN, A et al. *Anim. Gen.*, v.28, p.135-138, 1997.
- HAIBEL, GK. *Vet. Clin. North Am. Food. Anim. Pract.*, v.3, p.597-613, 1990.
- ISHWAR, AK. *Small Rum. Res.*, v.17, n.4, p.37-44, 1995.
- JOHNSON, LA. *Anim. Reprod. Sci.*, v.60 - 61, p.93 - 107, 2000.
- KAHN, W. *Veterinary reproductive ultrasonography*. London: Mosbywlf, 1994. 256p.
- MERKT, H; MOURA, JCA. *Tierärztl. Prax.*, v.28, p.166-171, 2000.
- MICHEL, G. *Kompendium der Embryologie der Haustiere*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1986. p.223-242.
- MÜLLER, E; WITTKOWSKY, G. *Theriogenology*, v.25, p.571-574, 1986.
- NAN, D et al. ANNUAL CONFERENCE OF THE EUROPEAN SOCIETY FOR DOMESTIC ANIMALS REPRODUCTION, 5th. 2001. Vienna. *Proceedings...* Vienna: **ESDAR Newsletter**, 2001. v.6, p.70.
- NODEN, DM; DE LAHUNTA, A. *Embriología de los animals domésticos: mecanismos de desarrollo y malformaciones*. Zaragoza: Acribia, 1990. p.341-374.
- REICHENBACH, H-D et al. *Diagnóstico de gestação na cabra e na ovelha*. São Paulo: Varela, 2004. p.117-136.
- SANTOS, M.H.B et al. *Diagnóstico de gestação na cabra e na ovelha*. São Paulo: Varela, 2004. p.97-116.
- SCHNORR, B. *Embryologie der Haustiere: Ein Kurzlehrbuch*. Stuttgart: Verlag Enke, 1989. p.165-180.
- STROUD, BK. *Veterinary Medicine*, v.91, p.663-672, 1996.
- VIANA, JHM et al. REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA. 2000. Viçosa. *Anais...* Viçosa: SBZ, 2000. v.37, p.186.
- WILKENS, H. *Fertilitätsstörungen beim weiblichen Rind*. Berlin: Verlag Paul Parey, 1982. p.25-48.

UTILIZAÇÃO DE BAIXAS DOSES DE EXTRATO DE PITUITÁRIA EQÜINA (EPE) PARA INDUÇÃO DE OVULAÇÕES MÚLTIPLAS EM ÉGUAS

Farinasso, A.*; Branquinho, J.A.*; Rumpf, R.*** ; Alvarenga, M.A.***

*Unicórnio – Laboratório de Biotecnologia em Reprodução Eqüina / Laboratório de Biofísica – Universidade de Brasília-Brasília-DF farinasso@unicornioequino.vet.br

Cenargen – Embrapa – Brasília – DF *Unesp – Botucatu-SP

Palavras-chave: ovulações múltiplas, extrato de pituitária eqüina, égua, baixa dose.

INTRODUÇÃO

A fêmea eqüina é refratária aos tratamentos hormonais rotineiramente utilizados em bovinos, como FSH de origem suína. O único composto que regularmente induz uma resposta superovulatória em éguas é o Extrato de Pituitária Eqüina (EPE). O domínio de protocolos eficientes para induzir superovulação permitirá a redução os custos envolvidos na TE, bem como permitirá que se utilize com maior freqüência o congelamento de embriões (Carmo & Alvarenga, 2004). A indução de ovulações múltiplas em éguas pode ser utilizada como uma garantia de coleta de embriões, promovendo desta forma redução do custo de transferência de embriões, multiplica as fontes para a colheita de ovócitos, eleva a fertilidade de éguas inseminadas com sêmen congelado e melhora a taxa de prenhez em fêmeas acasaladas com garanhões de baixa fertilidade (Squires et al. 2003).

A utilização rotineira do extrato de pituitária eqüina como indutor de ovulações múltiplas em éguas, está vinculada a existência de um protocolo de indução que apresente boa repetibilidade (dose ideal e freqüência de aplicação), a purificação do extrato diminuindo a contaminação com LH, e a variação individual na resposta (Squires, 2003). Os primeiros experimentos com EPE utilizaram uma dose diária de aproximadamente 1,5 g por tratamento. Com a evolução das pesquisas esta dose foi drasticamente reduzida, sendo atualmente mais utilizada a dose diária entre 25 mg a 50 mg. O uso desta dose diária tem permitido uma boa resposta superovulatória, contudo apresenta um baixo índice de recuperação embrionária (30-40%). Pouco se sabe sobre a eficiência de doses diárias inferiores a 25 mg ou mesmo da dose mínima efetiva para se induzir múltiplas ovulações em éguas. Apresentaremos a seguir resultados de experimentos por nós desenvolvidos, bem como experiência clínica, da aplicação de baixas doses de EPE em éguas.

EXPERIMENTOS E OBSERVAÇÕES CLÍNICAS COM USO DE BAIXA DE DOSE DE EPE PARA INDUÇÃO DE OVULAÇÕES MÚLTIPLAS

Em nosso primeiro experimento realizado no ano hípico de 2003/2004 com objetivo de testar a eficiência do uso de baixas doses de extrato de pituitária equina (EPE) na indução de ovulações múltiplas em éguas cíclicas, comparamos doses diárias de 2 mg (n:12); e 6 mg (n:13) com grupo controle sem tratamento, representado pelo ciclo anterior de cada fêmea tratada.

No diestro (6 a 9 dias), as éguas com folículos =25 mm foram induzidas ao cio (3 x de 12 em 12 H com 0,5ml de lutalyse - PGF2a) , e tratadas com EPE por via I.M., até quando 1 ou mais folículos atingisse 35 mm de diâmetro em seu eixo maior. As éguas foram acasaladas ou inseminadas 12 a 24 H após a indução de ovulação com 2500 UI de hCG, sendo as coletas realizadas 8 a 9 dias após a última ovulação. Somente duas éguas (16,7%) apresentaram ovulações múltiplas (2 /12) com a dose de 2 mg, resultando em taxa ovulatória similar ao grupo controle. A dose diária de 6 mg elevou ($P<0,001$) a taxa de ovulação para $1,84 \pm 0,58$, diferindo do grupo controle ($1,15 \pm 0,37$), e promoveram aumento ($P<0,01$) ovulações duplas ou triplas em 76,9% das éguas tratadas. Foi obtida média de $1,31 \pm 0,75$ embriões por ciclo no grupo tratado contra $0,54 \pm 0,52$ ($P<0,05$) para o grupo controle.. Estes dados possibilitam afirmar que esta dosagem é capaz de duplicar as chances na recuperação embrionária em éguas doadoras.

No ano hípico de 2004/2005 utilizamos vários protocolos com baixa dose em doadoras comerciais com aplicação de 4 mg 2 x ao dia, 6 mg 1 x ao dia; e 8 mg 1 x ao dia. Utilizando preparado hormonal produzido em nosso Laboratório (Unicórnio / Biofísica – UnB) testamos o uso de baixa dose em éguas com a colaboração de profissionais de diferentes estados. Foi observada uma taxa de resposta, ou seja, éguas com mais de uma ovulação, de 54% (33/61) para o grupo com 4 mg 2 x ao dia, de 60% (31/51) para o grupo com 6 mg 1 x ao dia, e de 63,6% (14/22) para o grupo com 8 mg 1 x ao dia. Obtivemos em média taxa de 0,94; 1; e 1 de embrião /coleta para as éguas tratadas com 4 mg 2x ao dia, 6 mg 1 x ao dia, e 8 mg 1 x ao dia, respectivamente. A incidência de ovulações múltiplas obtidas por cada equipe (número de resposta/ número de ciclos tratados) foi de 81% (22/27); 54% (25/47); 39% (12/31); 58% (7/12); 30% (3/10); 40% (4/10); 100% (4/4); e 100% (5/5). Observamos uma melhora da resposta quando selecionamos éguas que apresentassem 2 ou mais folículos de tamanho similar no início do tratamento. Selecionando-se desta forma obtivemos na última estação de monta um melhor resultado quando do uso de 4mg de EPE duas vezes ao dia, onde 81% (22/27); das éguas apresentaram dupla ou tripla ovulação.

Algumas doadoras foram tratadas durante 4 a 6 ciclos consecutivos, entre as quais foram observadas doadoras que apresentaram a seguintes respostas: uma égua com 5 duplas ovulações e 8 embriões em 6 tratamentos sucessivos, outra com 5 duplas ovulações e 8 embriões em 5 tratamentos e finalmente 2 éguas com 4 duplas ovulações e 6 embriões após 4 tratamentos sucessivos. Concluímos ser o tratamento com baixa dose de EPE eficiente para induzir ovulações duplas e eventualmente ovulações múltiplas em éguas cíclicas, representando protocolo pouco agressivo e possibilitando desta forma sua utilização em ciclos sucessivos.

Testamos também o extrato de pituitária equina também em 4 éguas acíclicas (anestro) as quais

apresentavam útero flácido e pequena população de folículo com aproximadamente 5 a 15 mm. Observamos a indução de ovulações múltiplas em duas éguas tratadas (4 folículos) obedecendo o protocolo de duas aplicações diárias de 12 mg durante 8 dias.

OBSERVAÇÕES CLÍNICAS COM O USO DE BAIXA DOSE DE EPE COMO AGENTE INDUTOR DE OVULAÇÕES

A utilização de baixa dose de EPE para induzir ovulação foi por nós estudada onde utilizamos a dose de 6 mg por via endovenosa, em éguas comerciais.. Éguas apresentando um ou dois folículos acima de 32 mm e edema, detectados por ultra-sonografia, foram tratadas com 6 mg de EPE diluído em 1,5 ml de Sol. Salina a 0,9% e avaliadas após 24, 36 e 48 hs. De 34 induções em éguas monovulatórias observamos 31 ovulações em até 48 hs resultando em 91% de resposta. Destas, 57% ocorreram em até 36 hs. Em onze ciclos em que as éguas apresentavam dois folículos pré-ovulatórios, observamos que todas éguas tratadas ovularam em até 48 hs após tratamento, sendo que 68% (15) das ovulações ocorreram em até 36 hs. Contudo, em outro grupo de cinco éguas que apresentavam 3 a 4 folículos observamos falhas na indução, indicando que a dose de 6 mg aparentemente é insuficiente para induzir e sincronizar ovulações em éguas com número superior a dois folículos.

CONCLUSÕES

Os protocolos de tratamento com baixa dose diária de extrato de pituitária eqüina utilizando doses de 4 mg 2 x ao dia ou doses de 6 mg e 8 mg 1 x ao dia assegura média igual ou superior a 1 embrião por coleta em programa comercial de transferência de embriões. No Brasil, os custos de uma coleta oscilam entre R\$ 600 a R\$ 1.000,00 e a garantia de 1 embrião minimiza os altos custos das coletas negativas, tornando a técnica de indução de dupla ou tripla ovulações com baixa dose de EPE altamente desejável do ponto de vista econômico, bem como por melhorar a eficiência da TE onde poderemos obter o dobro de produtos no final da estação de monta. Por outro lado o uso de EPE por via endovenosa como indutor de ovulação apresenta vantagem sobre o hCG por não induzir produção de anticorpos, e o sua eficiência foi observada em ciclos com até dois folículos com a dose de 6 mg.

AGRADECIMENTOS:

Aos colegas que contribuíram com os dados apresentados, meus agradecimentos.

Ao Depto de Biologia Celular da Universidade de Brasília e à Profa Dra Sonia M. de Freitas e Dra Rozeni C. L. Teles(Laboratório de Biofísica – UnB) pela viabilização e auxílio técnico do Convênio 04941 – Unicórnio – Laboratório de Biotecnologia em Reprodução Eqüina/Laboratório de Biofísica-UnB/Multincubadora de Empresas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARMO, M.T.; ALVARENGA, M.A. AVANÇOS BIOTECNOLÓGICOS EM REPRODUÇÃO EQUINA: *As diferentes técnicas utilizadas para a reprodução de cavalos*. Horse Ilimitada, Ed. 104:52-54, 2004.
- SQUIRES, E.L. A review on the use of eFSH to enhance reproduction performance. In: 49th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, *Proceeding..* New Orleans, Louisiana, 2003.

ESTRATÉGIAS PARA MELHORAR A EFICIÊNCIA REPRODUTIVA DE GARANHÕES SUBFÉRTEIS EM PROGRAMAS DE T.E.

Neves Neto, J.R.

Instituto Veterinário de Reprodução Assistida - Fleury Reprodução Equina
nevesneto@uol.com.br

Para alcançar um bom desempenho reprodutivo o garanhão deve mostrar uma eficiente taxa de fertilidade. A fertilidade pode ser definida de várias maneiras como, a porcentagem de embriões recuperados, gestações após a inseminação ou monta natural em uma estação de monta ou por ciclo estral. São vários os fatores relacionados a fertilidade que interferem no desempenho reprodutivo de garanhões resultando em diferentes graus de subfertilidade que apresentam características singulares de sintomas e tratamentos.

Estes fatores ocorrem devido a falhas de maior ou menor intensidade e/ou frequência relacionados a desvios de comportamento sexual do animal no ato da cópula; distúrbios da libido, ereção e ejaculação; produção espermática com suas características seminais de volume, concentração, motilidade, morfologia espermática, integridade de membrana dentre outros atributos necessários para que ocorra a fertilização e problemas congênitos ou adquiridos do aparelho reprodutor são aspectos importantes para avaliar e definir as limitações do desempenho reprodutivo de cada um destes animais. O exame andrológico minucioso é o primeiro passo para diagnosticar possíveis falhas na fertilidade e determinar as estratégias de manejo reprodutivo de garanhões que apresentam algum grau de subfertilidade.

Outro aspecto importante são garanhões que apresentam problemas de fertilidade, como alterações dos parâmetros espermáticos, quando submetidos a estresse, regime intenso de coberturas e/ou colheitas de sêmen, da mesma forma, garanhões normais ou que apresentam algum grau de subfertilidade, quando inseridos dentro de biotécnicas da reprodução como sêmen resfriado entre 5 e 8° C, 13 e 18° C e sêmen congelado apresentam baixas taxas de recuperação embrionária ou prenhez. Os animais jovens e idosos são os mais sensíveis a estas situações.

Dentro deste contexto são estratégias importantes para um melhor desempenho reprodutivo dos garanhões que apresentam algum grau de subfertilidade um manejo específico, onde dependendo do problema diagnosticado nós possamos instituir medidas capazes de solucionar ou minimizar a baixa de fertilidade, tais como:

- Manejo geral adequado buscando o bem estar do animal.
- Racionalização da frequência de ejaculações de garanhões adultos e principalmente jovens e idosos. No Brasil raças como o Mangalarga e o Mangalarga Marchador apresentam em sua maioria animais com características seminais inferiores as demais, sendo estes os maiores prejudicados durante as estações de monta, comprometendo até a longevidade reprodutiva destes garanhões.

- A suplementação através de complexos vitamínicos (Vitaminas A, E, D, β -caroteno...), oligoelementos (Selênio, Zinco, Magnésio...), complexos de aminoácidos (L-carnitina, Lisina, Triptofano, Arginina...) e omega 3 e 6, associados ou não a aplicações de hormônios (GnRH ou hCG) no intuito de melhorar a produção espermática.
- A adição ao sêmen no momento da colheita (Total ou Fracionada) e após o transporte, de diluidores enriquecidos com uma ou associações de substâncias que auxiliam o metabolismo celular e melhoram a viabilidade espermática (pentoxifilina, L-carnitina, taurina, plasma seminal heterólogo, heparina).
- A utilização de diluidores enriquecidos, em uma adaptação da técnica de *swin up*, com a coluna inferior representada pelo sêmen e a superior com o meio extensor enriquecido, para animais que apresentam baixa qualidade espermática do sêmen a fresco, resfriado ou congelado.
- Para melhorar as características de motilidade e normalidade, o sêmen a fresco ou resfriado pode ser filtrado, através de uma coluna de esferas de vidro, de 250 a 500 micrômetros de diâmetro, sustentadas por uma fina camada de algodão de vidro em uma seringa de 20 ml.
- A centrifugação do sêmen a fresco e após o transporte, com a adição ou não de diluidores enriquecidos pode ser uma boa alternativa para melhorar as taxas de recuperação embrionária e gestação para os garanhões que apresentam baixa qualidade espermática.
- A inseminação artificial intra – cornual ou na junção útero - tubárica com sêmen a fresco, resfriado e congelado têm se mostrado de grande valia, incrementando as taxas de fertilidade de garanhões que apresentam baixas características seminais nas diferentes biotécnicas do sêmen.
- A utilização de hormônios, ansiolíticos, cloridrato de imipramina entre outros na ocorrência de distúrbios relacionados a ereção e ejaculação.

Em conclusão, cabe ao médico veterinário responsável pela reprodução estar sintonizado as diferentes variáveis que interferem nos aspectos da fisiologia reprodutiva do macho e estar alerta a tênue linha que separa a fertilidade da subfertilidade. Na ansiedade de se obter o maior número de embriões e gestações, precisamos cuidado para não tornar o quadro de subfertilidade irreversível ou acelerar o caminho para a infertilidade, apesar das diferentes técnicas disponíveis que auxiliam no desempenho reprodutivo destes animais.

A IATF POSSUI CUSTO BENEFÍCIO FAVORÁVEL?

Ed Hoffmann Madureira madureh@usp.br; Pietro Sampaio Baruselli barusel@usp.br; José Rodrigo Valim Pimentel jrvalim@usp.br; Alexandre Barreto de Almeida alexbar@usp.br

Ainda há no Brasil um longo caminho a ser percorrido no sentido de se incrementar a eficiência reprodutiva e paralelamente o emprego de touros geneticamente superiores por monta natural ou IA.

Um dos principais fatores que prejudicam o desempenho reprodutivo é a baixa taxa de serviço (TS), que pode ser explicada por dois fatores: ciclicidade e eficiência de detecção de cios.

A IATF, com emprego de tratamentos à base de progesterona (P4) ou progestágenos, tem sido útil para se contornarem ambos os problemas. Por um lado, estes tratamentos induzem ciclicidade em uma determinada porcentagem de fêmeas em anestro e por outro, possibilita a IA, sem necessidade de detecção dos estros, ou seja, com uma TS de 100%.

Vários protocolos têm sido empregados desde a década de 1960 e a maioria dos problemas, associados ao grau de sincronização dos estros e a fertilidade dos mesmos, estão praticamente resolvidos. (BARUSELLI et al, 2004).

Questiona-se ainda, na atualidade, a viabilidade econômica de se implantarem, de rotina, estes programas nas fazendas de cria.

Conduziu-se um experimento para se avaliar a influência de um programa de IATF implementado em uma fazenda que utiliza a IA e a monta natural (MN). Para tanto, dividiram-se 597 vacas Nelore, paridas e amamentando, em quatro grupos, levando-se em consideração o escore de condição corporal.

As vacas do grupo 1 (G1) permaneceram em MN por 90 dias. As vacas do grupo 2 (G2) foram submetidas à IA tradicional por 45 dias e à MN por mais 45 dias. As vacas do grupo 3 (G3) receberam tratamento para sincronização dos estros com progestágenos, receberam um IATF e na seqüência, permaneceram em MN até completarem-se 90 dias da estação de monta (EM). As vacas do grupo 4 (G4) também receberam tratamento para IATF, foram submetidas à IA tradicional até o 45º dia e à MN até o final da EM. O tratamento de sincronização dos estros constou da colocação de um implante contendo 3 mg de norgestomet e uma aplicação IM de 3mg de norgestomet associados à 5 mg de valerato de estradiol, no D0 (Crestar- Intervet). No D9, retirou-se o implante e aplicaram-se 150 mg de D-cloprostenol (Preloban- Intervet) e uma injeção de 400 UI de eCG (Folligon- Intervet). As IATF foram realizadas 54 horas após a retirada dos implantes. Os resultados podem ser vistos na Tabela 1.

O primeiro resultado a ser considerado é que ao final da EM as taxas de prenhez dos grupos que receberam IATF (G3 e G4) foram, em média, 8% maiores do que as dos grupos não submetidos à IATF (G1 e G2). O intervalo entre o início da EM e a concepção foi 22 dias menor para os grupos que receberam IATF. O número de bezerros que nascerão de IA também será diferente entre os grupos: nenhum no G1, 35 no G2, 76 no G3 e 94 no G4. Considerando-se a disponibilidade de touros da raça Nelore, cujo sêmen encontra-se disponível no mercado, e que possuem DEP (diferença esperada na progênie) para peso à desmama de 10Kg, pode-se afirmar que há grande possibilidade da IA proporcionar

um ganho genético maior do que a MN. Ressalte-se que na próxima EM, as vacas dos grupos que receberam IATF estarão com 22 dias a mais de período pós-parto e portanto, poderão ter uma maior chance de concepção e ainda contribuir com a obtenção de um intervalo entre partos (IEP) menor.

A IATF é sem dúvida uma ferramenta muito importante para melhorar o desempenho reprodutivo do gado de corte e de leite. Os resultados dependem de vários fatores, que não podem ser subestimados, como, condição corporal, efeito da amamentação e ciclicidade.

Vários trabalhos de revisão têm sido publicados sobre período pós-parto e que podem ser utilizados para revisar o assunto (YAVAS: WALTON, 2000; WILTBANK et al 2002; RHODES et al 2003).

É importante registrar que os tratamentos com progesterona ou progestágenos podem induzir ciclicidade em vacas em anestro (GARCIA-WINDER et al 1986) e atenuam a sensibilidade do hipotálamo aos efeitos “feed-back” negativos do estradiol.(ANDERSON; DAY,1998). Esta sensibilidade ao estradiol parece ser amplificada pela amamentação (ANDERSON; DAY, 1998) e pela suplementação com dieta de baixa energia (IMAKAWA, et al 1987).

Especial atenção deve ser dada à qualidade do sêmen empregado em programas de IATF e à eficiência de detecção dos estros subseqüentes ou ao repasse com touros.

Tabela 1– Eficiência reprodutiva de vacas Nelore submetidas a diferentes tipos de manejo durante a estação de monta (EM). Camapuã, 2005.

Esquema	IATF	Taxa de detecção de cio	Taxa de concepção à IA	Taxa de prenhez (45d EM)	Taxa de prenhez (90d EM)	Intervalo início EM concepção (dias)
Touro	-	-	-	44,3 ^c (66/149)	83,2 ^b (124/149)	46,5±1,9 ^c
IA + touro	-	39,3 (59/150)	53,0 (35/66)	23,3 ^d (35/150)	85,0 ^b (125/147)	57,3±2,3 ^b
IATF +Touro	50,7 (76/150)	-	-	75,3 ^a (113/150)	92,7 ^a (139/150)	29,3±2,0 ^a
IATF + IA	54,3 (81/148)	25,4 (17/67)	76,5 (13/17)	63,5 ^b (94/148)	91,9 ^a (136/148)	31,1±2,2 ^a

As colunas com letras sobrescritas diferem estatisticamente $p < 0,05$. (Penteado et al., 2005)

Referências Bibliográficas.

ANDERSON, L. H., AND M. L. DAY. Development of a progestin-based estrus synchronization program: I. Reproductive response of cows fed melengestrol acetate for 20 days with an injection of progesterone. *J. Anim. Sci.*,v.76,p.1267-1272, 1998.

BARUSELLI, P.S.; REIS, E.L.; MARQUES, M.O. Inseminação Artificial em tempo fixo em bovinos

- de corte. In: *I simposio internacional de Reprodução Animal Aplicada*, Londrina, 2004.
- GARCIA-WINDER, M.; LEWIS, P.E.; DEEVER, D.R.; SMITH, V.G.; LEWIS, G.S.; INSKEEP, E.K. Endocrine profiles associated with life span of induced corpora lutea in postpartum beef cows. *Journal of Animal Science*, v. 62, p. 1353-62, 1986.
- IMAKAWA K, DAY ML, ZALESKY DD, CLUTTER A, KITTOCK RJ, KINDER JE. Effects of 17 β estradiol and diets varying in energy on secretion of luteinizing hormone in beef heifers. *J Anim Sci.*v.64,p. 805-815, 1987.
- RHODES,F.M.; MACDOUGALL, S.; BURKE, C.R.; VERKERK, G.A. MACMILLAN, K.L. Invited Review: Treatment of cows with an extended postpartum anestrous interval. *J. Dairy Sci.* v 86 , p 1876-1894,2003.
- WILTBANK, M. C., A. GUMEN, AND R. SARTORI. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology*. v.57, p.21–52, 2002.
- YAVAS, Y.; WALTON, J.S. Induction of ovulation in postpartum suckled beef cows: A review. *Theriogenology*, v. 54, p. 1-25,. 2000a
- YAVAS, Y.; WALTON, J.S. Postpartum acyclicity in suckled beef cows: A review. *Theriogenology*, v. 54, p. 25-55,. 2000b

IMPORTÂNCIA DA QUALIDADE DO SÊMEN EM PROGRAMAS DE IATF E TETF

Arruda, R.P.¹; Celeghini, E.C.C.¹; Souza, L.W.O.¹; Nascimento, J.¹; Andrade, A.F.C.¹;
Raphael, C.F.¹; Garcia, A.R.¹

¹Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal – VRA/FMVZ/USP
13630-090, Pirassununga-SP, Brasil. arrudarp@usp.br

Com o objetivo de facilitar o uso da inseminação artificial (I.A.) e os programas de transferência de embriões (T.E.), diversos trabalhos são realizados tendo como base o controle hormonal do ciclo estral das fêmeas bovinas e o emprego da I.A. e T.E. em tempo fixo (IATF e TETF), desobrigando a detecção do estro. Para isso, diferentes fármacos, protocolos e momentos de inseminação são usados com relatos de variação nas taxas de fertilidade (ARRUDA et al., 1997; BARBUIO et al., 1999; GARCIA et al., 1999; BERTAN et al., 2004; BARROS; ERENO, 2004; BÓ et. al., 2004; BARUSELLI, et al., 2004; MADUREIRA et al., 2004).

Após a IA, os espermatozóides depositados no trato genital da fêmea devem atravessar o útero, passar para o oviduto, pela junção útero-tubárica, interagir com o epitélio do oviduto e fertilizar o ovócito (SARTORI, 2004). Para que o espermatozóide seja considerado qualitativamente viável e potencialmente fértil é necessário que possua morfologia, atividade metabólica e membranas normais. A presença de membranas íntegras é pré-requisito para que os eventos relacionados ao processo de fertilização, como a capacitação espermática, penetração nos revestimentos do ovócito, ligação à zona pelúcida e fusão com o oolema possam ocorrer (YANAGIMACHI, 1994; RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 1997).

Quando sistemas de IATF e TETF são adotados, há a necessidade do uso do sêmen congelado de vários reprodutores e ainda de várias partidas de sêmen; assim a não avaliação ou mesmo a falta de critérios na avaliação das partidas poderá afetar sobremaneira a fertilidade de todo o lote de fêmeas, trazendo prejuízos econômicos, visto os gastos com fármacos para a sincronização dos estros, bem como para a indução da ovulação destas fêmeas, além do dispêndio em material, sêmen e tempo.

A redução da fertilidade, associada à inseminação com sêmen congelado, vem sendo atribuída aos processos ocorridos durante a congelamento do sêmen, ocasionando danos aos espermatozóides, os quais podem ser ultra-estruturais, físicos, bioquímicos e funcionais, e que levam as membranas espermáticas a apresentarem alteração da assimetria bilipídica (WATSON, 1995). Podendo-se ainda incluir a estes danos, a perda de motilidade, alterações na cromatina e na morfologia do espermatozóide, permeabilização e desestabilização das membranas e geração de espécies reativas de oxigênio (WATSON, 2000). O desenvolvimento de técnicas de associação de sondas fluorescentes, que permitam a avaliação simultânea da integridade das membranas plasmática e acrossomal e da função mitocondrial em sêmen bovino (ARRUDA; CELEGHINI, 2003; CELEGHINI, 2005) tem servido como ferramenta para avaliar os efeitos da criopreservação sobre o sêmen bovino. Forero-Gonzalez (2004) verificou que somente 15% dos espermatozóides permaneceram intactos após o processo de criopreservação. Resultado

semelhante foi obtido por CELEGHINI (2005) com percentuais variando de 18 a 28% após a criopreservação com dois diluidores diferentes.

Ainda, o espermatozóide, como qualquer outra célula, produz espécies reativas de oxigênio (ROS), sendo originadas do metabolismo normal da célula. O processo de peroxidação lipídica inicia-se na presença de ROS, que ao ter contato com os ácidos decosaheptaenóicos da membrana espermática, retiram um hidrogênio de uma dupla ligação, transformando-o em radical livre, que por sua vez irá agir em outro ácido decosaheptaenóico. Este processo desencadeia a cascata de peroxidação, causando lesões na membrana plasmática, com perda de fluidez e de sua capacidade de regular a concentração intracelular de íons envolvidos no controle do movimento espermático e, por fim, perda da sua função de fertilização (AITKEN; KRAUSZ, 2001; MARQUES et al., 2002). A geração de radicais livres também pode atingir o DNA no núcleo espermático, promovendo fragmentação. Esta fragmentação é comumente observada nos espermatozoides de indivíduos inférteis e há fortes evidências que estes danos mediados pela ação dos radicais livres sejam induzidos por estresse oxidativo (JANUSKAUSKAS et al., 2003).

Normalmente as avaliações laboratoriais realizadas com o objetivo de estimar o potencial de fertilidade de uma partida de sêmen são: motilidade espermática (%); vigor (1-5); concentração espermática (milhões/dose); anormalidades espermáticas (%) e o teste de termo-resistência (lento ou rápido). Estas avaliações vêm sendo, desde a década de 80, baseadas nas técnicas e padrões mínimos sugeridos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998) para a avaliação do sêmen bovino criopreservado (ARRUDA et al., 1992).

Usualmente, a motilidade espermática é estimada de forma subjetiva, sendo analisada sob microscopia óptica, com uma gota do sêmen entre lâmina e lamínula, estimando-se sua porcentagem visualmente. Enquanto, as anormalidades espermáticas são avaliadas em esfregaços corados ou câmara úmida, em uma avaliação que depende da habilidade do técnico. Entretanto, estudos reportam que este tipo de análise manual é impreciso, mesmo quando executado por técnicos experientes. Esta imprecisão deriva, em parte, da natureza subjetiva dos testes usados, da variabilidade entre técnicos e das diferenças na implementação de padrões para a avaliação (ARRUDA, 2000).

Na tentativa de diminuir esta imprecisão, uma grande diversidade de biotécnicas vem sendo desenvolvida para a avaliação seminal, das quais podemos citar sistemas de avaliação computadorizada das características seminais (CASA), uso de sondas fluorescentes para a avaliação das estruturas espermáticas por microscopia de epifluorescência ou sistema de citometria de fluxo, técnicas de sexagem espermática, avaliação de proteínas do plasma seminal, produção de ROS, entre outras.

Com o propósito de obter uma técnica que demonstre maior repetibilidade tanto para motilidade quanto para morfometria espermáticas, diversos sistemas que utilizam a análise computadorizada de imagens têm sido desenvolvidos e empregados. Programas computadorizados para a avaliação espermática podem ser mais objetivos e imprimir maior repetibilidade às avaliações do que a habilidade humana em identificar padrões de motilidade ou de normalidade espermáticas (ARRUDA et al., 2003). O poder de análise deste tipo de teste é dado pela avaliação precisa e acurada dos espermatozoides com alto grau de objetividade, podendo assim aperfeiçoar o processo de avaliação seminal em animais (ARRUDA, 2000; VERSTEGEN et al., 2002). Todavia, ainda não está bem claro qual característica do movimento espermático, determinada pelo CASA, é capaz de prever a fertilidade ou a taxa de

fertilização (FERREIRA et al., 1997; AMANN, 1989).

Ainda, avanços recentes na tecnologia de coloração têm fornecido novos meios de se avaliar a capacidade funcional de espermatozóides em várias espécies (GARNER; JOHNSON, 1995; ARRUDA et al., 2002b; ARRUDA; CELEGHINI, 2003; CELEGHINI et al., 2004; CELEGHINI, 2005). Dessa forma, a funcionalidade ou integridade das estruturas dos espermatozóides é monitorada por sondas fluorescentes, as quais possuem a capacidade de se ligar a pontos específicos das células, permitindo um diagnóstico mais fácil e direto, na dependência de suas características físicas (CELEGHINI, 2005). A combinação de vários corantes fluorescentes possibilita a avaliação de diversas estruturas celulares simultaneamente. A associação das sondas PI, FITC-PSA e MitoTracker Green FM, tem sido utilizada para avaliar simultaneamente a integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial em bovinos (ARRUDA; CELEGHINI, 2003) e eqüinos (ARRUDA et al., 2002; CELEGHINI et al., 2004). Os mesmos parâmetros são avaliados nas associações de PI, H342, FITC-PSA e CMXRos; e PI, H342, FITC-PSA e JC-1 (CELEGHINI, 2005).

Embora o uso de sondas fluorescentes por microscopia venha sendo um método eficaz para a avaliação espermática, o número de espermatozóides normalmente examinados por análise não excede 200. A citometria de fluxo surge como uma técnica vantajosa sobre as outras clássicas para a avaliação da célula espermática, uma vez que este sistema automatizado tem a capacidade de examinar 10.000 espermatozóides em menos de um minuto, permitindo maior exatidão nos resultados (ARRUDA, 2000). Por todas estas razões, o método de citometria de fluxo tem sido cada vez mais empregado na avaliação das características espermáticas de diversas espécies mamíferas (evenson, 1980; garner; johnson, 1995).

A produção de ROS leva a ocorrência da peroxidação lipídica no espermatozóide, que causa o acúmulo de hidroperóxidos lipídicos na membrana espermática, que posteriormente formam o malondialdeído (MDA), que permanece nos fluídos corporais, podendo ser usado como marcador de peroxidação lipídica. Dentre os diferentes métodos analíticos, a reação com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) é o mais utilizado, onde a reação do MDA com o TBA forma um composto que pode ser mensurado através de absorbância e fluorescência, sendo estes produtos chamados de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (JANERO, 1990). A sonda fluorescente C11-BODIPY^{581/591} (4,4-difluoro-5-(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3a,4a-díaza-s-indacene-3-undecanoic acid) é um análogo de ácidos graxos polissaturados, que se incorpora na membrana celular. Enquanto, este fluoróforo está na forma não oxidada, é observada uma fluorescência vermelha, com comprimento de onda de 580 a 620 nm. Já na presença de ROS, há mudança da fluorescência de vermelha para verde, cujo comprimento de onda é 495 a 545 nm (BALL; VO, 2002).

Quanto à avaliação das proteínas do plasma seminal, KILLIAN et al. (1993) detectaram quatro delas associadas à fertilidade de touros, sendo duas proteínas (26 kDa e 55 kDa) predominantes em touros de alta fertilidade e duas proteínas (16 kDa cada) predominantes em touros de baixa fertilidade. Posteriormente, CANCEL et al. (1997) identificaram a proteína de 55 kDa, mais prevalente no sêmen de touros de mais alta fertilidade, como sendo a osteopontina (OPN). Da mesma forma, GERENA et al. (1998) identificaram a proteína de 26 kDa como sendo a lipocalina tipo prostaglandina D sintetase (L-PGDS). Todavia, RONCOLLETTA et al. (1999) encontraram alta incidência de uma proteína com aproximadamente 61,8 kDa em touros da raça Gir cujo sêmen foi considerado de alta congelabilidade, enquanto, JOBIM et al. (2002) encontraram a presença das proteínas albumina (66 kDa) e OPN (55 kDa) em sêmen bovino de alta congelabilidade. Apesar de muitos estudos indicarem as proteínas do

plasma seminal como marcadores da fertilidade, ainda muitas pesquisas devem ser realizadas para realmente poder responder se tais marcadores são “mito ou realidade?” (SULLIVAN, 2004).

Apesar de cientistas procurarem intensamente desenvolver técnicas laboratoriais que predizem com exatidão a fertilidade do sêmen, nenhum teste laboratorial isolado pode estimar seu potencial de fertilização. Tal meta têm sido de difícil obtenção devido à necessidade dos espermatozoides em apresentar diferentes atributos para a fertilização do ovócito. Vale ressaltar a importância da qualidade do sêmen para se obter boas taxas de fertilidade, principalmente nos programas de IATF e TETF (ARRUDA et al., 2004).

Bibliografia

- AITKEN, R.J.; KRAUSZ, C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. **Reproduction**, v.122, p. 497-506, 2001.
- AMANN, R.P. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? **Journal of Andrology**, v. 10, p. 89-98, 1989.
- ARRUDA, R.P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozoide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. 2000. 121 f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.
- ARRUDA, R.P.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; GARCIA, A.R.; LIU, I.K.M. Effects of extenders and cryoprotectants on stallion sperm head morphometry. **Theriogenology**, v. 58, n. 2, p.253-256, 2002a.
- ARRUDA, R.P.; SOUZA, N.L.; MARQUES, A.; CELEGHINI, E.C.C.; GOBESSO, A.A.O.; MEIRELLES, F V; BINELLI, M.; BLASQUES, F.J.H. Evaluation of techniques using CFDA/PI, H258/FITC-PSA and Trypan Blue/Giemsa for assessment of the viability and acrosomal integrity of cryopreserved equine spermatozoa. *In*: ANNUAL CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY, 2002, Foz do Iguassu, Brasil, Elsevier, 2002b, v.57, p. 477.
- ARRUDA, R.P.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; LIU, I.K.M. Determinação da integridade da membrana plasmática e acrossomo de espermatozoides de garanhões pela técnica de citometria de fluxo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31 (Suplemento), Porto Alegre: UFRGS, p. 226-227, 2003.
- ARRUDA, R.P.; BARNABE, V.H.; ALENCAR, M.M.; BARNABE, R.C. Avaliação de sêmen congelado de bovinos. Provas lenta e rápida de termo-resistência: efeitos sobre a fertilidade. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.29, n.1, p.131-7, 1992.
- ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; ANDRADE, A.F.C.; GARCIA, A.R.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F.; SOUZA, L.W.O. Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TETF. **Biotecnologia da Reprodução em Bovinos**. SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA. 1. *Anais...* p. 166-179. 2004.
- ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C. Validação de uma técnica para avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozoides bovinos. *In*: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 17. Beberibe, CE. 25 a 31 de agosto de 2003, **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31 (Suplemento), Porto Alegre: UFRGS, p. 230-231, 2003.
- ARRUDA, R.P.; MADUREIRA, E.H.; MIZUTA, K.; GUSMÕES, P.P.; VON ZUBEN, C.; VISINTIN, J.A.; RODRIGUEZ, P.H.M. Sincronização do estro em fêmeas bovinas com o uso de acetato de melengestrol (MGA) – prostaglandina F2 α e CIDR-B. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**,

v.21, n.2, p.97-9, 1997.

- BALL, B.A.; VO, A.** Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based upon the lipophilic fluorescent dye C11-BODIPY581/591. **Journal of Andrology**, v.23, p 259-269, 2002.
- BARBUIO, J.P.; MARQUES, A.; MADUREIRA, E.H.; BARUSELLI, P.S.; ARRUDA, R.P.; MIZUTA, K. Sincronização da ovulação por benzoato de estradiol ou GnRH após tratamento com MGA/PG/17 β -estradiol+progesterona em novilhas Nelore. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, n.3, p.312-4, 1999.
- BARROS, C.M.; ERENO, R.L. Avanços em tratamentos hormonais para inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em bovinos de corte. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32 (Suplemento), p. 23-34. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 18. 26 a 29 de agosto de 2004. Barra Bonita, SP, Brasil. Porto Alegre: UFRGS, 2004.
- BARUSELLI, P.S.; BÓ, G.A.; REIS, E.L.; MARQUES, M. Inseminação artificial em tempo fixo em bovinos de corte. **Biotecnologia da Reprodução em Bovinos**. SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA. 1. **Anais...** p. 155-165. 2004.
- BERTAN, C.M.; BINELLI, M.; RODRIGUEZ, P.H.M.; CELEGHINI, E.C.C.; BARUSELLI, P.S.; MADUREIRA E.H. Synchronization of follicular waves and characteristics of estrus in cross-bred heifers (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*) treated with melengestrol acetate and prostaglandin F2 α associated with hCG, GnRH or 17 β -estradiol and progesterone". **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 2004 (no prelo).
- BÓ, G.A.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; BARUSELLI, P.S.; REIS, E.L. Manipulação hormonal do ciclo estral em doadoras e receptoras de embrião bovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32 (Suplemento), p. 1-22. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 18. 26 a 29 de agosto de 2004. Barra Bonita, SP, Brasil. Porto Alegre: UFRGS, 2004.
- CANCEL, A.M.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Osteopontin is the 55-kilodalton fertility-associated protein in Holdstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, v. 57, n. 6, p. 1293-1301, 1997.
- CBRA: **MANUAL PARA EXAME ANDROLÓGICO E AVALIAÇÃO DO SÊMEN ANIMAL**. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2. ed. 1998. 49 p.
- CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; RAPHAEL, C.F.; NASCIMENTO, J. Simultaneous evaluation of the plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes in equine spermatozoa. In: INTERNACIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION, 15, 2004, p.511. Porto Seguro. **Abstracts...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2004.
- CELEGHINI, E.C.C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes**. 186 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- EVENSON, D.P. Flow cytometry evaluation of male germ cells. In: YEN, A. (Ed.) **Flow Cytometry: advanced research and clinical applications**. Boca Raton, Florida: CRC Press; 1980, p.217-46.
- FERREIRA, J.C.P.; NEVES NETO, J.R.; PAPA, F.O. Avaliação computadorizada das características espermáticas de garanhões com fertilidade comprovada. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 21, n. 3, p. 131-32, 1997.
- FORERO GONZALES, R.A. **Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelamento e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozoide bovino**. Tese (doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Pirassununga, 2004. 92 p.
- GARCIA, A.R.; ARRUDA, R.P.; MADUREIRA, E.H.; RODRIGUES, P.H.M.; MARQUES, A. Influência

- do uso de sêmen resfriado e da aplicação e GnRH sobre a taxa de prenhez de novilhas Nelore inseminadas em tempo fixo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, n.3, p.342-4, 1999.
- GARNER, D.L.; JOHNSON, L.A. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and Propidium iodide. **Biology of Reproduction**, v. 53, p. 276-284, 1995.
- GERENA, R.L.; IRIKURA, D.; URADE, Y.; EGUCHI, N.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Identification of a fertility associated protein in bull seminal plasma as lipocalin-type prostaglandin D synthase. **Biology of Reproduction**, v. 58, p. 826-833, 1998.
- JANERO, D.J. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 9, p. 515-540, 1990.
- JANUSKASKAS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. **Theriogenology**, v. 60, p. 743-758, 2003.
- JOBIM, M.I.M.; OBERST, E.R.; SALBERGO, C.G.; SOUZA, D.O.; CIMAROSTI, H.I.; MATTOS, R.C. Albumina e osteopontina – Proteínas do plasma seminal bovino relacionada com a congelabilidade do semen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, n.3, p.136-141, 2002.
- KILLIAN, G.J.; CHAPMAN, D.A.; ROGOWSKI, L.A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, v. 49, n. 6, p. 1202-1207, 1993.
- MADUREIRA, E.H.; PIMENTEL, J.R.V.; ALMEIDA, A.B.; ROSSA, L.A. Sincronização com progestágenos. **Biotechnologia da Reprodução em Bovinos**. SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA. 1. *Anais...* p. 117-128. 2004.
- MARQUES, A.; ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; GOBESSO, A.A.O.; NEVES NETO, J.R. Effects of ascorbic acid and pentoxifylline on equine cryopreserved semen submitted to in vitro incubation. **Theriogenology**, v. 58, p. 257-260, 2002.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; ZHANG, B.R.; LARSSON, B. Bovine semen quality and the ability to produce embryos *in vivo* and *in vitro*. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v.25, n.1, p.108-126, 1997. Suplemento.
- RONCOLLETTA, M.; FRANCESCHINI, P.H.; LIMA, V.F.M.H.; RODRIGUES, L.H.; OLIVEIRA, M.A.; SILVA, C. Perfil em SPS-PAGE das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do semen de touros doadores da raça Gir. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 36, n. 2, 1999.
- SARTORI, R. Fertilização e morte embrionária em bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32 (Suplemento), p. 35-50. *In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões*, 18. 26 a 29 de agosto de 2004. Barra Bonita, SP, Brasil. Porto Alegre: UFRGS, 2004.
- SULLIVAN, R. Male fertility markers, myth or reality. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 341-347, 2004.
- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; OCLIN, K. Computer assisted sêmen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, p. 149-179, 2002.
- WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen, **Animal Reproduction Science**, v. 60/61, p. 481-492, 2000.
- WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, p. 871-891, 1995.
- YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. *In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, 1994, p.189-317.

NOVOS AVANÇOS NOS TRATAMENTOS DE DOADORAS E DE RECEPTORAS DE EMBRIÃO BOVINO

Pietro S. Baruselli¹; Claudiney M. Martins¹; Manoel F. de Sá Filho¹; Luiz F. Nasser¹; Lindsay U. Gimenes¹; Ed H. Madureira¹; Gabriel A. Bó²

¹Departamento de Reprodução Animal, FMVZ-USP, Rua Prof. Orlando Marques de Paiva, 87, CEP 05508-000, São Paulo-SP, Brasil. barusell@usp.br

²Instituto de Reproducción Animal Córdoba, J.L. de Cabrera 106, X5000GVD Córdoba e Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Católica de Córdoba, Argentina

Introdução

Nos últimos anos o Brasil tem se destacado mundialmente pelo grande número de transferências de embriões produzidos tanto *in vivo* (TE) quanto *in vitro* (PIV), contribuindo com quase 50% do total de embriões produzidos no mundo. No Brasil e em outros países tropicais existe uma demanda crescente para multiplicar material genético, tanto de fêmeas zebuínas quanto de taurinas. Entretanto, existem importantes diferenças na fisiologia e no comportamento reprodutivo entre estas espécies, as quais podem interferir na eficiência dos programas de superovulação e transferência de embriões.

O objetivo deste trabalho é apresentar os resultados das últimas pesquisas sobre os tratamentos de superovulação, que visam o controle do crescimento folicular e da ovulação, possibilitando a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em doadoras *Bos indicus* e *Bos taurus*. Serão abordados também os tratamentos de sincronização de receptoras para inovulação em tempo fixo.

Superovulação com inseminação artificial em tempo fixo em *Bos indicus*

Diversos estudos procuraram avaliar a resposta ovulatória de vacas superestimuladas com tratamentos que objetivam controlar farmacologicamente o momento da ovulação (RIEGER et al., 1990; D'OCCHIO et al., 1997, CARVALHO et al., 2000; NOGUEIRA et al., 2002; ZANENGA et al., 2003; BARUSELLI et al., 2003 e MARTINS et al., 2005).

Em vacas Nelore, NOGUEIRA et al. (2002) compararam a eficiência de protocolos de superovulação com o emprego de implante auricular de deslorelina ou implante intravaginal de P4 (CIDR). Induziram-se as ovulações com LH, 48 ou 60 horas após a PGF₂ ∞ (no caso da deslorelina, apenas com 60 horas). A IA foi realizada 10 e 20 horas após o LH. O número de embriões viáveis e as taxas de prenhez após inovulação foram semelhantes entre os grupos.

Levando em consideração os efeitos negativos da presença de elevadas concentrações plasmáticas de P₄ próximo ao momento da ovulação em vacas superovuladas (DIELEMAN e BEVERS, 1993), nosso grupo de pesquisa delineou um experimento para avaliar a retirada antecipada do dispositivo de P4 em vacas Nelore superovuladas e inseminadas em tempo fixo (SOTF). Para isso foram utilizadas dez vacas Nelores mantidas a pasto em Campo Grande-MS, divididas ao acaso em dois tratamentos

(delineamento “cross-over”), sendo o tratamento invertido após 35 dias. No primeiro grupo (P24), houve a remoção do CIDR e administração de 25 mg de LH (Lutropin, Vetrepharm, Canada), 24 e 48 horas após a PGF2 α (juntamente com a sexta dose de FSH), respectivamente. O segundo grupo (P36) recebeu protocolo semelhante ao primeiro, exceto com relação à retirada do CIDR, que foi realizada 36 horas após a administração da PGF2 α . Todas as doadoras foram inseminadas 12 e 24 horas após o LH. Sete dias após o tratamento com LH foram realizadas a colheita e a classificação dos embriões (ZANENGA et al., 2003).

Tabela 1. Resultados (média \pm desvio padrão) dos tratamentos superovulatórios P24 e P36 em doadoras Nelore (*Bos indicus*). Campo Grande, 2000.

	P24	P36
Número de animais	10	10
Taxa de recuperação (%)	69,1	63,4
Total de estruturas	21,2 \pm 15,1	17,7 \pm 11,7
Embriões viáveis	9,3 \pm 7,5	10,3 \pm 5,9
Embriões degenerados	6,7 \pm 4,8	5,2 \pm 6,1
Não fertilizados	5,2 \pm 8,7	2,2 \pm 3,5

Os valores não diferem estatisticamente ($P > 0,05$)

Os resultados (Tabela 1) são sugestivos de que a retirada do dispositivo de P 24 ou 36 após a PGF2 α , seguido da indução da ovulação com LH (48h após a PGF2 α) e com a IATF 12 e 24 horas após o LH é um protocolo viável para programas de superovulação e transferência de embriões em *Bos indicus*, eliminando a necessidade de detecção de estro e possibilitando a programação precisa das atividades de sincronização, de colheita e transferência dos embriões.

Objetivando avaliar a resposta superovulatória de vacas Nelore a reduzidas doses de FSH (100 vs. 133 vs. 200mg; Folltropin-V, Vetrepharm, Canada) nosso grupo (Baruselli et al., 2003) empregou o delineamento experimental “cross-over” para se evitar o efeito individual na resposta aos tratamentos. Os resultados foram indicativos de que não existem diferenças na resposta superovulatória, quanto ao número de embriões transferíveis e congeláveis após o emprego de 100, 133 ou 200mg de FSH em doadoras Neloires superovuladas.

Recentemente, nosso grupo iniciou trabalhos objetivando estudar a utilização do eCG na SOTF em *Bos indicus* (Chiari et al., 2005). Os resultados deste estudo são sugestivos de que, mesmo com a redução numérica da quantidade de embriões viáveis (4,4 \pm 1,3 vs. 2,9 \pm 1,0; $p > 0,05$), o tratamento com eCG possibilita diminuir o número de tratamentos para superovulação (8 para o FSH e 1 para o eCG) no protocolo de SOTF.

Superovulação com inseminação artificial em tempo fixo em vacas Holandesas de alta produção

Os protocolos de SOTF desenvolvidos até o momento apresentam bons resultado para vacas zebuínas (*Bos indicus*), porém, quando vacas *Bos taurus* são submetidas a tais procedimentos, o número

de estruturas colhidas têm sido insatisfatório. Existem particularidades fisiológicas que diferenciam vacas *Bos indicus* de *Bos taurus*. Dentre elas, o diâmetro folicular na divergência merece atenção. Verificou-se que fêmeas *Bos taurus* atingem a divergência folicular com diâmetro superior que fêmeas *Bos indicus* (6,2mm; GIMENES et al., 2005 para *Bos indicus* e 8,5mm; GINTHER et al., 1996 para *Bos taurus*). Assim, supõem-se que os folículos de fêmeas *Bos taurus*, para atingirem capacidade ovulatória, necessitam alcançar diâmetros superiores. Sartori et al. (2001) verificaram que fêmeas *Bos taurus* ovulam à administração de LH somente quando os folículos atingem diâmetro acima de 10mm. Recentemente, GIMENES et al. (2005) verificaram que fêmeas *Bos indicus* já adquirem elevada capacidade ovulatória com diâmetros = 8,5 mm. Nesse estudo a taxa de ovulação após o tratamento com LH foi de: 33,3%^a (3/9); 80,0%^b (8/10) e 90,0%^b (9/10; P<0,05) para os grupos com diâmetro de 7-8,4; 8,5-10 e >10mm, respectivamente. Desta forma, protocolos que possibilitam atrasar a administração do indutor de ovulação, disponibilizando maior tempo para que os folículos atinjam diâmetros condizentes com a capacidade ovulatória, podem colaborar para a melhoria da eficiência da superovulação em *Bos taurus*.

Para testar essa hipótese, nosso grupo de pesquisa (Rodrigues et al., 2005) empregou diferentes protocolos de SOTF em 40 vacas Holandesas de alta produção (média de 39,0 litros). Objetivou-se verificar o efeito do atraso de 12 horas na indução da ovulação (visando aumentar a taxa de ovulação) e da inserção de um ou dois implantes auriculares contendo Norgestomet durante o tratamento superovulatório (visando diminuir a pulsatilidade de LH). Pôde-se observar que a adição de mais de um implante auricular de Norgestomet não influenciou estatisticamente as variáveis analisadas, já o atraso de 12 horas na aplicação do indutor de ovulação diminuiu o número de folículos que não ovularam ao tratamento superovulatório (P<0,05). No entanto, estatisticamente não houve aumento no número de estruturas recuperadas, bem como no número de embriões transferíveis e congeláveis. Apesar de não se verificar aumento estatisticamente significativo, notou-se que a utilização de dois implantes de Norgestomet ($1,5 \pm 0,5$ vs $3,0 \pm 1,0$) e o atraso de 12 horas no indutor de ovulação ($1,6 \pm 0,6$ vs $2,9 \pm 1,0$) aumentaram o número de embriões congeláveis. Assim, existe possibilidade de que essas estratégias aumentem a eficiência dos protocolos de superovulação em vacas Holandesas de alta produção.

Dando seqüência aos experimentos, Martins et al., (2005) avaliou o efeito do período de permanência do dispositivo intravaginal de P₄ (24 ou 36 horas após a aplicação da PGF) e do momento da aplicação do indutor de ovulação (48 ou 60 horas após a PGF) na dinâmica folicular e na produção de embriões em vacas Holandesas de alta produção submetidas a SOTF. A hipótese deste experimento foi que um atraso no momento da retirada do dispositivo intravaginal contendo P₄ e da indução exógena da ovulação promoveria melhor sincronização das ovulações e, conseqüentemente, maior quantidade e qualidade de embriões viáveis. Foram utilizadas 12 (doze) vacas Holandesas, mantidas sob as mesmas condições de manejo e alimentação. Os animais foram subdivididos em quatro grupos, com delineamento quadrado latino (fatorial 2 X 2). Todas as vacas foram inseminadas com a mesma partida de um único touro. Não houve efeito do tempo de permanência da P₄ sobre as variáveis analisadas. Observou-se efeito do momento da administração de LH no número de folículos >8mm no dia da indução das ovulações com LH, número de embriões transferíveis e congeláveis, e intervalo entre a primeira e última ovulação. Possivelmente, o atraso de 12 horas na aplicação do LH favorece o crescimento

folicular, reduz a dispersão entre as ovulações e aumenta o número de embriões transferíveis e congeláveis. Os resultados são indicativos de que o tratamento com LH 60 horas após a administração da PGF2 α aumenta a eficiência da SOTF em vacas holandesas de alta produção.

Em estudo recente, Martins et al., (2005, dados preliminares) avaliou-se também o efeito do atraso de 12 horas na indução da ovulação em vacas Nelore superovuladas. Ao contrário do observado em *Bos taurus*, este atraso não apresentou resultados satisfatórios em *Bos indicus*. Verificou-se tendência de aumento no número de embriões degenerados (P=0,06) e de redução no número de embriões transferíveis e congeláveis (P=0,10). Estes dados preliminares indicam que, provavelmente, a administração de LH 48 horas após a PGF2 α seja apropriada para induzir a ovulação em vacas Nelore (*Bos indicus*) submetidas á SOTF.

Sincronização de receptoras para inovulação em tempo fixo

Os programas de TE comerciais apresentam, em geral, baixas taxas de aproveitamento (% de receptoras aptas à inovulação/ total de receptoras tratadas). Normalmente, em um lote de receptoras tratadas com prostaglandina associada à detecção de estro, somente 40 a 50% dos animais são aproveitados para a inovulação. Considerando-se uma taxa de concepção de 50% do total de animais aproveitados, obtém-se apenas 20 a 25% de gestações ao final do tratamento. Desta forma, o incremento das taxas de aproveitamento e de concepção das receptoras é fundamental para maximizar a taxa de prenhez e, com isso, elevar o retorno zootécnico e econômico da TE, determinando, além de maior número de bezerros/ano, redução dos custos com receptoras não gestantes.

Estudos demonstram a relação entre a concentração plasmática de P₄ e a taxa de concepção (Binelli et al., 2001; Thatcher et al., 2001; Baruselli et al., 2003; Reis et al., 2004). O aumento das concentrações plasmáticas de P₄ no diestro foi positivamente correlacionado com o desenvolvimento embrionário, pelo maior aporte de nutrientes para o lúmen uterino (Geisert et al., 1992), e incremento na capacidade do concepto em secretar interferon- τ (Kerbler et al., 1997; Mann; Lamming, 2001), provocando diminuição da secreção de PGF2 α pelo endométrio uterino e bloqueio da luteólise (Wathes et al., 1998). Esse fenômeno foi associado ao aumento das taxas de concepção (Fuentes & De La Fuentes, 1997; Baruselli et al., 2000).

Investigações realizadas por nosso grupo com o objetivo de superovular receptoras para a inovulação de embriões em tempo fixo (Baruselli et al., 2000, Nasser et al., 2004, Reis et al., 2004) demonstraram correlações positivas entre o número de corpos lúteos, a concentração plasmática de P₄ e a taxa de concepção após a transferência de embriões. Esses trabalhos indicaram que o tratamento com eCG no momento esperado da emergência da nova onda de crescimento folicular foi eficaz para induzir superovulação ou aumentar o diâmetro do folículo dominante. Esses efeitos determinam, além de maior número de corpos lúteos (ou corpo lúteo único maior), maior concentração plasmática de P₄ e maiores taxas de aproveitamento, concepção e prenhez, comparados aos tratamentos tradicionais com prostaglandina seguido de detecção do estro. Além disso, possibilitam a inovulação em tempo fixo, sem a necessidade de detecção do estro, e com programação prévia do dia mais adequado para a transferência dos embriões.

Referências Bibliográficas

- BARUSELLI, P.S.; MARQUES, M.O.; MADUREIRA, E.H.; BÓ, G.A.; COSTA NETO, W.P.; GRANDINETTI, R.R. Superestimulação ovariana de receptoras de embriões bovinos visando o aumento de corpos lúteos, concentração de P₄ e taxa de prenhez. **Arquivos da Fac. Vet. da UFRGS**, v.28, p.218, 2000.
- BARUSELLI, P.S.; MARQUES, M.O.; CARVALHO, N.A.T.; BERBER, R.C.A.; VALENTIM, R.; CARVALHO FILHO, A.F.; COSTA NETO, W.P. Dinâmica folicular e taxa de prenhez em novilhas receptoras de embrião (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*) tratadas com o protocolo "Ovsynch" para inovulação em tempo fixo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.40, suppl 2. p. 96-106, 2003a.
- BARUSELLI, P.S.; MARQUES, M.O.; REIS, E.L.; NASSER, L.F.T.; SILVA, R.C.P; MENEGATTI, J.A.; VALENTIN, R.; SANTOS, I.C.C. Adequação da dose de FSH (Folltropin-v) em protocolos de superovulação de vacas nelore (*Bos taurus indicus*) com inseminação artificial em tempo fixo (SOTF). **Acta Scientiae Veterinarie**, 2003b. p. 244-245.
- CARVALHO, N.A.T.; BARUSELLI, P.S.; ZICARELLI, L.; MADUREIRA, E.H.; VISINTIN, J.A.; D'OCCHIO, M.J. Use of a GnRH agonist to control ovulation subsequent to superstimulation of follicular growth in buffalo. **Theriogenology**, v.53, p.491, 2000.
- D'Occhio, M.J.; Niasari-Naslaji A. and J.E. Kinder , Influence of varied progestogen treatments on ovarian follicle status and subsequent ovarian superstimulatory responses in cows. **Anim. Reprod. Sci.** 45, p. 241-253, 1997.
- DIELEMAN, S.S.D.; BEVERS, M.M.; Folliculogenesis and oocyte maturation in superovulated cattle. **Molecular Reproduction and Development**, v.36(2), p.271-273, 1993.
- FUENTES, S.; DE LA FUENTE, J. Different synchronization treatments for direct embryo transfer to recipients heifers. In: ANNUAL MEETING AETE, 13., 1997, Lyon. **Proceedings...** Lyon: France Form, 1997, p. 148.
- GEISERT, R. D.; MORGAN, G. L.; SHORT, E. C.; ZAVY, M. T. Endocrine events associated with endometrial function and conceptus development in cattle. **Reproduction Fertility and Development**, v. 4, n. 3, p. 301-305, 1992.
- GIMENES, L.U; SÁ FILHO, M.F.; MADUREIRA, E.H.; BARUSELLI, P.S. Capacidade ovulatória em novilhas *Bos indicus*. Enviado para SBTE, 2005.
- GIMENES, L.U; SÁ FILHO, M.F.; MADUREIRA, E.H.; BARUSELLI, P.S. Estudo ultra-sonográfico da divergência folicular em novilhas nelore (*Bos indicus*). Enviado para SBTE, 2005.
- GINTHER, O.J.; WILTBANK, M. C.; FRICKE, P. M.; GIBBONS, J. R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 55, n. 2, p. 1187-1194, 1996.
- KERBLER, T. L.; BUHR, M. M.; JORDAN, L. T.; LESLIE, K. E.; WALTON, J. S. Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon-tau synthesis by the conceptus in cattle. **Theriogenology**, v. 47, n. 3, p. 703-714, 1997.
- MANN, G. E.; LAMMING, G. E. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cow. **Reproduction**, v. 121, n. 1, p. 175-

180, 2001.

- MARTINS, C.M.; CASTRICINI, E.S.C.; CARVALHO, N.A.T.; REIS, E.L.; TORRES-JÚNIOR, J.R.S.; GIMENES, L.U.; SÁ FILHO, M.F.; BARUSELLI, P.S. Superovulação com inseminação artificial em tempo fixo em vacas holandesas de alta produção. Aceito para publicação no **IRAC** 2005.
- MORENO, D.; CUTAIA, L.; VILLATA, M. L.; ORTISI, F.; BÓ, G. A. Follicular wave emergence in beef cows treated with progesterone releasing devices, estradiol benzoate and progesterone. **Theriogenology**, v. 55, n. 1, p. 408, 2001.
- NASSER, L.F.; REIS, E.L.; OLIVEIRA, M.A.; BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S. Comparison of four synchronization protocols for fixed-time bovine embryo transfer in *Bos indicus* × *Bos taurus* recipients. **Theriogenology**, v.62, p.1577-1584, 2004.
- NASSER, L.F.; REIS, E.L.; OLIVEIRA, M.A.; BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S. Comparison of four synchronization protocols for fixed-time bovine embryo transfer in *Bos indicus* × *Bos taurus* recipients. **Theriogenology**, v.62, p.1577-1584, 2004.
- NOGUEIRA, M.F.G.; BARROS, B.J.P.; TEIXEIRA, A.B.; TRINCA, L.A.; D'OCCHIO, M.J.; BARROS, C.M. Embryo recovery and pregnancy rates after the delay of ovulation and fixed time insemination in superstimulated beef cows. **Theriogenology** 2002;57:1625-34.
- REIS, E.L.; NASSER, L.F.; MENEGATTI, J.A.; REZENDE, L.F.; MANTOVANI, A.P.; BARUSELLI, P.S. Effect of time and dose of eCG treatment *Bos taurus* × *Bos indicus* recipients treated with progesterone for timed embryo transfer. In: 15th International Congress on Animal Reproduction, v.2, 2004, Porto Seguro. **Abstracts**... 2004, p.395.
- RIEGER D., J.S. WALTON, W.H. JOHNSON AND D.H. COY , The effect of treatment with a LHRH antagonist on the quality of Day 7 embryos collected from superovulated Holstein heifers. **Theriogenology** 33, p. 207; 1990 (abstract).
- RODRIGUES, C.; REIS, E.L., AIRES, H.; SÁ FILHO, M.F.; BARUSELLI, P.S. Efeito do número de implantes de norgestomet e do momento da administração do indutor de ovulações em vacas holandesas superovuladas. Enviado para SBTE 2005.
- SARTORI, R.; FRICKE, P. M.; FERREIRA, J. C. P.; GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 1403-1409, 2001.
- THATCHER, W.W.; MOREIRA, F.; SANTOS, J.E.P; MATTOS, R.C.; LOPEZ, F.L.; PANCARCI, S.M.; et al. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. **Theriogenology**, v.55, p.75-90, 2001.
- WATHES, D.C.; ROBINSON, R.S.; MANN, G.E.; LAMMING, G.E. The establishment of early pregnancy in cows. **Reproduction Domestic Animals** v. 33, p. 279-284, 1998.

MESA REDONDA

**Problemas relacionados a produção
comercial de embriões *in vitro***

DESAFIOS DA FECUNDAÇÃO *IN VITRO* COMERCIAL

Queiroz, L.M.V.; Peixer, M.A.S.; Malard, P.F.; Santana, G.M.; Xavier, M.C.; Sousa, R.R.

BIO – Biotecnologia em Reprodução Animal Ltda. SMPW Quadra 5 Conj. 05 Lote 01 Casa C -
Brasília-DF - luismauro@biotecnologiaanimal.com.br

Introdução

A produção *in vitro* de embriões bovinos em escala comercial apresenta gargalos em sua linha operacional que a tornam distinta do modelo de produção *in vitro* sistematizado pelos laboratórios acadêmicos estatais. O sucesso comercial da Fecundação *In Vitro* (FIV) passa pela transposição de várias barreiras encontradas em seu caminho, desde aspectos relacionados ao tratamento comercial com o cliente até a seleção de receptoras e a transferência dos embriões produzidos, passando pelos desafios da rotina laboratorial. Estes pontos fazem da FIV uma técnica repleta de armadilhas, que sem muita atenção e muito custo está fadada a obter baixos resultados. O objetivo deste artigo é apresentar os pontos críticos relacionados à produção *in vitro* de embriões bovinos comercial na ótica observada pelo Laboratório BIO.

Produção *In Vitro* de Embriões Bovinos - Eleição de um Eficiente Protocolo de FIV

Diferentes protocolos de FIV são encontrados na literatura, cada qual com sua particularidade e seus respectivos resultados. Entretanto, a linha dorsal é a mesma, busca-se a maturação ovocitária *in vitro*, a preparação espermática, a fecundação propriamente dita e o cultivo *in vitro*. A diferença encontrada nos protocolos dos diferentes laboratórios comerciais são os desafios a que se propõem alcançar.

Para o Laboratório BIO, localizado em Brasília-DF, o mercado que se busca é mais amplo que a região do entorno do Distrito Federal e o estado de Goiás. Para tanto, buscamos elaborar um sistema de transporte de ovócitos eficiente, que nos permita chegar ao Laboratório após 16 horas do início da sessão de punção folicular. Para analisar a interferência do tempo na produção *in vitro* de embriões separamos os dados de acordo com tempo despendido entre o início da punção folicular e a chegada ao Laboratório, a saber: Grupo 1) 1 a 2 horas; Grupo 2) 3 a 5 horas; Grupo 3) 6 a 9 horas e Grupo 4) 10 a 16 horas. A taxa de produção de embriões do Grupo 1 (48%) foi superior aos Grupos 2, 3 e 4 (38%, 40% e 36%, respectivamente).

Contudo outro desafio foi lançado: estabelecer um protocolo de transporte de embriões que não interferisse significativamente na taxa de prenhez. Assim, buscamos desenvolver um sistema pelo qual o embrião deveria ser mantido por até 18 horas entre o momento do envase e a sua transferência. Não foram observadas diferenças estatísticas significativa quando comparamos as taxas de prenhez entre os Grupos 1, 2 e 3 (41%, 40% e 37%, respectivamente), entretanto, houve diferença significativa

quando comparamos com o Grupo 4 (34%).

Analisando a taxa de aproveitamento de ovócitos em prenhez, foi possível observar diferença estatística significativa quando comparamos os Grupos 1 (20%) com os Grupos 2, 3 e 4 (16%, 15% e 12%, respectivamente). Apesar de observarmos diferenças nas taxas de produção de embriões e de prenhez, o Grupo 4 apresenta índices comerciais positivos, o que significa que o custo da prenhez está em nível aceitável.

Particularidades Funcionais do Sêmen

O processo da fecundação *in vitro* propriamente dita é iniciado com a separação espermática, abordagem necessária para remoção dos espermatozoides mortos, líquido seminal e do meio de criopreservação. Normalmente, a amostra de sêmen descongelada é submetida a centrifugação, para que os espermatozoides vivos passem por um gradiente de densidade, livrando-se do material indesejável. No entanto, estas centrifugações podem incidir indesejavelmente sobre a estrutura da membrana plasmática e acrossômica dos espermatozoides e a sua cromatina. Alguns touros encontrados no mercado, com excelentes taxas de prenhez em programas de inseminação artificial, possuem uma predisposição para estes efeitos deletérios da FIV, fazendo com que apresentem baixas taxas de fecundação, por conseguinte, clivagem e produção de embriões.

O ambiente da FIV também gera cuidados, visto que incide diretamente na performance dos espermatozoides. O meio base de FIV, a concentração de heparina, uso de antioxidantes, possuem efeitos distintos entre os touros. A grande dificuldade, neste caso, é estabelecer um protocolo único para toda a rotina laboratorial.

Cultivo *In Vitro*

Existem vários modelos de cultivo *in vitro*, que na literatura apresentam excelentes resultados. Entretanto, buscando um modelo comercial, não podemos pensar em elaborações, como o uso de hospedeiros intermediários, ou sofisticações, como o uso de atmosfera com baixo teor de oxigênio. O protocolo de cultivo *in vitro* deve ser sucinto e eficiente.

Transferência dos Embriões Produzidos *In Vitro*

Um dos pontos que mais interferem no resultado final de um programa de FIV é a qualidade da receptora no momento da transferência dos embriões. Para que a receptora esteja em condição ideal alguns pontos devem ser seguidos: 1) Um eficiente controle sanitário deve ser estruturado procurando evitar a entrada e estabelecimento de diversas doenças infecto-contagiosas, tais como, brucelose, tuberculose, leptospirose, IBR, BVD e clostridiose. 2) Adequada estratégia de mineralização e alimentação, principalmente nas épocas de seca. 3) Atualmente, diferentes protocolos de sincronização de cio de receptoras são utilizados com objetivos distintos. Dependendo da disponibilidade de receptoras e da frequência de sessões de FIV, pode-se optar pelas seguintes metodologias: a) Aplicação de 1 dose

de prostaglandina, apresenta uma taxa de sincronização de cio de 40%, entretanto possui um custo baixo; b) implante de progestágeno + estrógeno + prostaglandina, possui índice de sincronização de cio de 65% dos animais tratados; c) implante de progestágeno + estrógeno + prostaglandina + eCG, apresenta a maior taxa de sincronização de cio, entretanto o maior custo. Este protocolo é indicado para usos de receptoras em programas seqüenciados ou em fazenda com restrição de receptoras.

Características das Doadoras Destinadas para Punção Folicular

Normalmente, as doadoras que são candidatas a integrar um programa de FIV possuem alguns pré-requisitos, como por exemplo: mérito genético reconhecido, performance produtiva comprovada, histórico em pistas de julgamento, alto valor financeiro, expectativa de venda em curto prazo e patologia reprodutiva adquirida. Exceto pelo último ponto citado, este perfil faz com que a doadora mereça um tratamento especial, normalmente com um manejo nutricional com alto teor de proteína e energia, e mantidas em baias. O resultado disto é um aumento de peso da doadora, pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo. Para a FIV, não existe combinação pior. Há diminuição do número de ovócitos viáveis (aumento do número de ovócitos desnudos e degenerados) e da taxa de produção *in vitro* de embriões.

No entanto, as doadoras com patologias reprodutivas adquiridas, exceto em anestro, apresentam taxas irregulares de produção de ovócitos, embriões e prenhezes que, por si só, justifica o uso da técnica.

Conclusão

A gama de aplicações da fecundação *in vitro*, bem como o crescimento dos seus índices de produtividade e o fortalecimento do mercado pecuário nacional vem, a cada dia, colaborando para a expansão da técnica em programas de multiplicação animal nas mais diversas regiões do Brasil.

PROBLEMAS RELACIONADOS A PRODUÇÃO COMERCIAL DE EMBRIÕES *IN VITRO*

Wilson Pardini Saliba; Múcio Túlio Teixeira Alvim

Cenatte Embriões Ltda - Rua Dr. Rocha, 832 – Caixa Postal 64 - Pedro Leopoldo – MG
wilson@cenatte.com.br

Muitos dos problemas relacionados à produção comercial de embriões *in vitro* podem estar relacionados às fases do processo de cultivo e muitos fatores podem influenciar a intensidade de ocorrência destes problemas principalmente a não utilização de meios definidos na produção *in vitro* de embriões (PIV). No dia a dia da prática de PIV problemas como: síndrome do bezerro grande, maiores índices de abortos e natimortos, maior número de prenhez de macho, menor congelabilidade dos embriões de PIV, limitação da utilização de sêmen sexado na PIV podem ser considerados como importantes e de grande impacto comercial.

Na tentativa de visualizar as perdas e analisar os problemas relacionados às gestações e nascimentos das prenhez oriundas da técnica de PIV, foram acompanhadas até a primeira semana pós-parto 215 receptoras prenhez de diferentes raças de clientes do Cenatte. Através das informações colhidas dos nossos clientes foi possível analisar porcentagens de aborto, natimortos, partos normais, partos distócicos e problemas de hidropisia e síndrome do bezerro grande e tentar traçar um perfil destes problemas. Das 215 prenhez analisadas 80% das receptoras tiveram parto normal (172/215), 3,7% (8/215) tiveram aborto dos 60 aos 120 dias de gestação e 7,4% (16/215) tiveram aborto dos 120 aos 260 dias de gestação, sendo que, 11,2% (24/215) foi a taxa de aborto no total. Natimortos tiveram índice de 7,0% (16/215) e 3,3% (7/215) dos partos foram distócicos. Ocorreu também um caso de síndrome do bezerro grande associado à hidropisia (0,5% - 1/215).

Com o objetivo de analisar a proporção de machos e fêmeas foram verificadas 2699 prenhez de PIV de maio de 2003 até março de 2005. 83 prenhez de Blastocisto eclodido (BE), 2128 prenhez de Blastocisto expandido (BX), 296 prenhez de Blastocisto (BL), 90 prenhez de Blastocisto inicial (Bi) e 102 prenhez de Mórula (MO) que apresentaram respectivamente as seguintes porcentagens de prenhez de macho: 36,1% (BE), 53,7% (BX), 59,1% (BL), 53,3% (Bi) e 57,8% (MO). Considerando todas as fases embrionárias tivemos 53,9% de machos e 46,1% de fêmeas. No mesmo período foram analisadas as frequência de prenhez de macho e fêmea para embriões produzidos pela técnica de super-ovulação e transferência de embriões (SOV-TE), sendo que, de 3859 prenhez 51,6% foram diagnosticados como macho e 48,4% de fêmeas. Considerando as duas técnicas SOV-TE e PIV ocorreu uma maior desvio para prenhez de macho na PIV comparando-se com a SOV-TE. Pelos dados apresentados, parece que as estruturas embrionárias mais adiantadas BE e BX tem um desvio menor para o sexo macho comparados com as estruturas como BL e MO, no nosso sistema de produção *in vitro* de embriões bovinos. Quando se fez análise por raça, foi detectado que: 412 prenhez de Brahman,

124 prenhez de Gir, 542 prenhez de Guzerá e 1507 de Nelore apresentaram respectivamente as seguintes porcentagens de prenhez de macho: 54,4%, 54,8%, 52,4% e 53,9 mostrando que o desvio para macho parece independe da raça considerada.

Outro grande problema da produção *in vitro* de embriões é a grande variabilidade de resultados de embriões produzidos por esta técnica aos métodos de criopreservação principalmente à congelação lenta, ou seja, a baixa repetibilidade dos resultados inviabilizam a sua utilização comercial. Com o objetivo de testarmos o nosso protocolo aos sistemas de criopreservação foram criopreservados pelo método de congelação lenta 51 Blastocisto expandidos de qualidade I no dia 7 de cultivo. Utilizou-se o crioprotetor etilenoglicol 1,5 molar e depois de congelados e estocados por um determinado tempo estes foram descongelados e colocados em gotas de cultivo (SOFaaci) em estufas com ambiente controlado para reavaliar re-expansão e eclosão depois de 24 e 48 horas de cultivo. Dos 51 embriões descongelados 27,5% re-expandiram em 24 horas e somente 9,8% eclodiram em 48 horas. Os resultados dos testes sugerem que são necessárias mais pesquisas nesta área. Melhora da qualidade embrionária pode ser um caminho para que os embriões de PIV suportem melhor os processos de criopreservação e tenham resultados de prenhez compatíveis comercialmente. Posteriormente foram congelados 20 Blastocisto expandidos nas mesmas condições do teste anterior, sendo que, 18 foram descongelados e implantados em receptoras sincronizadas que resultou em 3 prenhez confirmadas aos 45 dias de gestação por ultra-sonografia, correspondendo a um índice de 16,7% de prenhez.

Com o oferecimento de sêmen sexado para mercado o Cenatte participou de testes, cujo objetivo seria verificar o desempenho do sêmen sexado na rotina comercial de PIV. Sêmen sexado de dois touros nelore foram utilizados, touro A e touro B e como controle o sêmen não sexado do touro C também nelore. Realizou-se a maturação por 24h em meio TCM 199 modificado, em estufa com 5% de CO₂ em ar, 39°C e umidade saturada oócitos obtidos por ovum pick up de qualidades I, II e III. Foi realizada a fecundação *in vitro* (FIV) de 190, 73 e 179 oócitos com os touros A, B e C respectivamente com uma concentração de 2 x 10⁶ spz/ml por 18-22h em meio Fert-TalP acrescido de BSA, piruvato, PHE e Heparina. O sêmen foi descongelado e processado pelo método de Gradientes de Percoll. A FIV foi realizada nas mesmas condições atmosféricas da MIV e o cultivo *in vitro* (CIV) em meio SOFaaci adicionado com fonte protéica por 6 dias em estufa com 5% CO₂, 5% O₂, 39°C e umidade saturada. As porcentagens de clivagem e embriões produzidos foram: touro A (64,7% e 37,4%), touro B (61,6 e 26%) e touro C controle (52% e 30,7%). Os resultados sugeriram a viabilidade da utilização do sêmen sexado na PIV, pois apresentou índices de produção de embriões compatíveis comercialmente. Apesar dos resultados, diferenças de produção entre os touros foram observadas. Nas mesmas condições de PIV do teste anterior foram realizadas produções comerciais de embriões com sêmen sexado. Cinco touros de diferentes raças: Holandesa (HO), Nelore Mocho (NO), Brahman (BR), Nelore (NE) e Girolando (GO), fertilizaram 226 oócitos obtidos através aspiração folicular guiada por ultra-sonografia de 10 doadoras. Análises de clivagem foram feitas no dia 2 e de embriões no dia 7 da fase de CIV, considerando-se dia zero o dia da FIV. Aos 60 dias da FIV foi feito o diagnóstico de gestação e sexagem fetal. O procedimento realizado com o sêmen GO apresentou contaminação após a FIV, sendo desconsiderado neste trabalho. As taxas de clivagem foram de 100% (14/14), 100% (66/66),

77% (46/60) e 50% (43/86) para os touros HO, NO, BR e NE, respectivamente. Os índices de embriões transferíveis foram de 50, 79, 40 e 22% e prenhez foram 57, 46, 33 e 53% para os touros HO, NO, BR e NE, respectivamente. Os resultados médios de produção embrionária foi de 45% (102/222), a taxa de prenhez foi de 45% (46/102) e a sexagem resultou em 83% de prenhez de fêmea.

	Oócitos	Clivados		Em TE		Prenhes		Fêmeas	
Lacrose	14	14	100%	7	50%	4	57%	3	75%
Bacana	66	66	100%	52	79%	24	46%	20	83%
Pillar	60	46	77%	24	40%	8	33%	6	75%
Edhank	86	43	50%	19	22%	10	53%	9	90%
Total	226	169	75%	102	45%	46	45%	38	83%

Data	Touro	Oócitos	Clivados		Embriões		Embriões		Prenhez		Macho		Fêmea	
			N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
		viáveis					TE							
	Lacrose	14	14	100,0	7	50,0	7	50,0	4	57,1	1	25,0	3	75,0
	Bacana	66	65	98,5	64	97,0	52	78,8	24	46,2	4	16,7	20	83,3
	Pillar 30	60	46	76,7	28	46,7	24	40,0	8	33,3	2	25,0	6	75,0
	Edhank	86	22	25,6	23	26,7	19	22,1	10	52,6	1	10,0	9	90,0
	Total	226	147	65,04	122	54	102	45,13	46	45,1	8	17,39	38	82,61

Teste sêmen sexado

G	Testes	Total	Total	%	%	Cliv.	% Cliv.
		MIV	Emb.	Emb.	Emb.GI		
1	Galante - 4 rotinas - S	190	71	37,4	23,7	123	64,7
2	Aldebaran - 2 rotinas - S	73	19	26,0	13,7	45	61,6
3	Joquei - 3 rotinas - ñ S	179	55	30,7	20,7	93	52,0

Taxa de Prenhez por raça – 2003 a 2005

Raça	Total TE	Prenhez	%	Fêmea	Macho	Total	% Macho
BLONDE	6	5	83,3	1	4	5	80,0
BRAHMAN	1084	418	38,6	188	224	412	54,4
CACHIM	36	20	55,6	11	9	20	45,0
GIR	346	133	38,4	56	68	124	54,8
GIROLANDO	21	13	61,9	6	7	13	53,8
GUZERÁ	1286	552	42,9	258	284	542	52,4
HOLANDESA	6	2	33,3	0	2	2	100,0
NELORE	3562	1555	43,7	695	812	1507	53,9
NELORE MOCHO	151	77	51,0	29	45	74	60,8
TOTAL GERAL	6498	2775	42,7	1244	1455	2699	53,9

Raça	Total TE	Prenhez	%	Fêmea	Macho	Total	% Macho
BEI	220	84	38,2	53	30	83	36,1
BXI	4228	1953	46,2	889	1017	1906	53,4
BHI	392	190	48,5	72	115	187	61,5
BXI e BHI	4620	2143	46,4	961	1132	2093	54,1
BXII	128	37	28,9	24	10	34	29,4
BXIII	9	1	11,1	0	1	1	100
TOTAL BX e BH	4748	2180	45,9	985	1143	2128	53,7
BLI	806	290	36,0	111	165	276	59,8
BLII	96	21	21,9	10	9	19	47,4
BLIII	9	1	11,1	0	1	1	100,0
TOTAL BL	911	312	34,2	121	175	296	59,1
BiI	215	73	34,0	29	40	69	58,0
BiII	66	16	24,2	8	7	15	46,7
BiIII	23	6	26,1	5	1	6	16,7
TOTAL Bi	304	95	31,3	42	48	90	53,3
MOI	222	81	36,5	30	49	79	62,0
MOII	65	19	29,2	11	7	18	38,9
MOIII	26	5	19,2	2	3	5	60,0
TOTAL MO	313	105	33,5	43	59	102	57,8
TOTAL GERAL	6496	2776	42,7	1244	1455	2699	53,9

Teste in vitro de embriões congelados de FIV - 18.04.05 e

Embriões	Avaliação 24 hs					Avaliação 48 hs			
	Fase	Nº	Reexpan.	Eclodin./	%	%	Reexpan.	Eclodin./	%
Eclodido				Rees.	Eclo.	Eclodido		Rees.	Eclo.
BX I	8	5	0	62,5	0,0	0	2	0,0	25,0
BX I	10	0	0	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0
BX I	11	0	0	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0
BX I	17	6	0	35,3	0,0	0	1	0,0	5,9
BXI NI	5	3	0	60,0	0,0	0	2	0,0	40,0
Total BX I	51	14	0	27,5	0,0	0	5	0,0	9,8
Total MO I	3	1	0	33,3	0,0	1	0	33,3	0,0
Total BL I	2	0	0	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0
Total Bi I	1	0	0	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0

Local	Fêmea	Macho	Total	% Macho
CALCIOLANDIA 2003	341	363	704	51,6
SANTA FÉ 2003	702	739	1441	51,3
SANTA FÉ 2004	386	440	826	53,3
JAGUARA 2004	437	451	888	50,8
TOTAL	1866	1993	3859	51,6

RESUMOS

SELECIONADOS PARA

COMPETIÇÃO DE

ESTUDANTES

EFEITO DA ADIÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS

Viana, K.S.; Caldas-Bussiere, M.C.; Matta, S.G.C.; Paes de Carvalho, C.S.;
Faes, M.R.; Quirino, C.R.

Setor de Reprodução Animal, LMGA, CCTA, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 28013-602, Brasil. kelensv@uenf.br

O óxido nítrico (NO) é um radical livre altamente reativo, que está envolvido em várias etapas da reprodução. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da adição de nitroprussiato de sódio (SNP), um doador de NO, na maturação nuclear e citoplasmática *in vitro* de oócitos bovinos. Ovários de vacas mestiças cíclicas foram obtidos em matadouros da região. Os complexos *cumulus*-oócito (COCs) foram aspirados de folículos com 3 a 5 mm de diâmetro. Foram utilizados somente COCs com ooplasma claro e homogêneo e com no mínimo 3 camadas de células do *cumulus*. Concentrações crescentes de SNP foram adicionadas ao meio de maturação (10^{-9} , 10^{-7} , 10^{-5} , 10^{-3} M de SNP). O estágio da maturação nuclear foi avaliado pela coloração com orceína acética a 2% e a maturação citoplasmática pela observação da migração dos grânulos corticais (coloração com *Lens culinaris* marcada com FITC) e pela taxa de desenvolvimento embrionário *in vitro*. Os dados foram avaliados pela análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste *t* a 5% de probabilidade. Somente os COCs tratados com concentração alta de SNP (10^{-3} M) permaneceram em metáfase I (MI, $97,5 \pm 3,1\%$ - $P < 0,05$), enquanto as demais alcançaram metáfase II (MII, 100%) após 24 h de cultivo. Para avaliar se este efeito era reversível e se havia ocorrido um retardo ou inibição da progressão de MI para MII, os oócitos foram maturados por 24h sem SNP (controle), por 48h com 10^{-3} M de SNP, realizando troca do meio sem SNP às 24h de cultivo (grupo 1) e por 48h com 10^{-3} M de SNP sem troca do meio (grupo 2). Foi observado que mesmo após 48h, os oócitos tratados permaneceram em MI (MI, 100%), tanto no grupo 1 como no 2. A cinética da maturação nuclear foi realizada para avaliar se houve ou não retardo na progressão da meiose durante a maturação *in vitro* de COCs tratados com 10^{-3} M de SNP. Observou-se que esta concentração retardou o rompimento da vesícula germinativa às 8 h de cultivo (VG, $80,3 \pm 12,8\%$) e às 12 h não houve diferença significativa entre o controle e o tratamento (VG, $6,0 \pm 6,1\%$ e $19,2 \pm 8,5\%$ respectivamente). Os oócitos tratados com as concentrações que não apresentaram alteração na maturação nuclear (10^{-9} , 10^{-7} , 10^{-5} M de SNP) foram avaliados quanto à maturação citoplasmática. A concentração de 10^{-5} M melhorou a percentagem de migração total dos grânulos corticais para a região cortical do oócito ($94,1 \pm 6,8\%$ - $P < 0,05$) e também aumentou a percentagem de produção de blastocistos ($40,4 \pm 15,9\%$) quando comparado com o controle ($78,1 \pm 11,4\%$ e $27,2 \pm 6,0\%$ respectivamente). Estes resultados mostram que o NO possui um efeito dual na maturação *in vitro* de oócitos bovinos, inibindo (10^{-3} M) a maturação nuclear e estimulando (10^{-5} M) a maturação citoplasmática, dependendo da sua concentração.

EFEITO DO ÁCIDO 3-INDOL-ACÉTICO SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIOS CAPRINOS

Matos, M.H.T.¹; Martins, F.S.¹; Santos, R.R.¹; Luque, M.C.A.²; Silva, J.R.V.¹; Celestino, J.J.H.¹; Bão, S.N.²; Figueiredo, J.R.¹

¹Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Pré-Antrais, LAMOFOPA, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Av. Paranjana, 1700, Fortaleza - CE, 60740-000, Brasil. htmatos@yahoo.com; ²Laboratório de Microscopia Eletrônica, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil

O papel dos fatores de crescimento e hormônios na regulação do desenvolvimento de folículos pré-antrais permanece pouco conhecido. Os objetivos do presente estudo foram avaliar os efeitos do Ácido 3-Indol-Acético (IAA) sobre a sobrevivência, ativação e crescimento de folículos pré-antrais caprinos utilizando análises histológica e ultra-estrutural. Para isto, fragmentos de córtex ovariano caprino foram cultivados por 1 ou 5 dias à 39°C em atmosfera contendo 5% de CO₂, em Meio Essencial Mínimo (MEM) (Cultilab, Rio de Janeiro, Brasil) suplementado com insulina, transferrina, selênio, piruvato, glutamina, hipoxantina, BSA, estreptomicina e fungizona e com ou sem diferentes concentrações de IAA (10, 20, 40 or 100 ng/mL). O meio de cultivo foi substituído por meio fresco a cada dois dias. Um pequeno fragmento de cada tecido ovariano não cultivado, bem como daqueles cultivados por 1 ou 5 dias em determinado meio foi removido para Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e os fragmentos restantes foram processados para histologia clássica a fim de avaliar a morfologia dos folículos pré-antrais caprinos. Os folículos foram classificados como primordiais ou em desenvolvimento (transição, primários e secundários), bem como em normais ou degenerados, de acordo com a morfologia do oócito e das células da granulosa. A percentagem de folículos morfologicamente normais e a percentagem de folículos primordiais e em desenvolvimento em cada período de cultivo foram analisadas pelo teste do Qui-quadrado e as comparações entre os diâmetros oocitário e folicular entre o controle e os grupos cultivados foram analisadas por Mann-Witney ($P < 0,05$). Os resultados mostraram que o MEM sozinho ou suplementado com IAA (20 ng/mL) aumentou significativamente a percentagem de folículos morfologicamente normais quando comparado com outros tratamentos. Observou-se que o IAA nas concentrações de 20 ou 40 ng/mL afetou positivamente a proporção de folículos primordiais que entraram na fase de crescimento após 5 dias de cultivo. Na presença de 10 e 20 ng/mL de IAA, houve um aumento no diâmetro oocitário folicular no dia 5 de cultivo. Apesar dos bons resultados observados com a histologia clássica, a MET mostrou que a concentração de 20 ng/mL não manteve a integridade morfológica dos folículos pré-antrais caprinos após 5 dias de cultivo. Em conclusão, este estudo demonstrou que o IAA, na concentração de 20 ng/mL, pode estimular a ativação e o crescimento de folículos pré-antrais caprinos após 5 dias de cultivo. Entretanto, nessas mesmas condições, o cultivo de folículos pré-antrais inclusos em fragmentos de córtex ovariano caprino não foi eficiente para manter a integridade ultra-estrutural destes folículos.

Suporte financeiro: CNPq, FUNCAP e FINEP.

**MATURAÇÃO E VITRIFICAÇÃO DE OÓCITOS EQUÍNOS CULTIVADOS NA
PRESENÇA DE HORMÔNIO DO CRESCIMENTO EQUÍNO E FATOR DE
CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA-I**

Curcio, B.R.¹; Deschamps, J.C.¹; Nogueira, C.E.W.²; Pereira, G.R.³; Macedo Jr, M.C.¹;
Boff, A.L.N.¹; Rambo, G.¹; Lucia Jr, T.¹

¹Centro de Biotecnologia-UFPel; ²Departamento de Clínicas Veterinárias – FV - UFPel, Campus
Universitário s/n 96010-900, Pelotas-RS. ³Department of Population Health & Reproduction,
School of Veterinary Medicine, UC Davis, California 95616. enderlebr@terra.com.br

O objetivo do presente estudo foi determinar os efeitos da adição de hormônio do crescimento equino (eGH), fator de crescimento semelhante a insulina-I (IGF-I) e associação de ambos na maturação *in vitro* de oócitos equinos. Além de analisar a integridade estrutural de oócitos maturados e vitrificados em presença de copolímero sintético X-1000 (SuperColl X-1000TM; 21st Century Medicine). Complexos *cumulus oophorus* compactos (CCO) foram cultivados em TCM199 suplementado com 0,1% BSA e antibióticos. CCO's (n=122) foram divididos em quatro tratamentos: 1) Controle, sem adição de hormônios (n=34); 2) Adição de 400ng/ml eGH (n=31); 3) 200ng/ml IGF-I (n= 35) e 4) Adição de 400ng/ml eGH + 200ng/ml IGF-I (n=22), realizadas em três repetições. Após a maturação de 30h, para avaliação do processo de vitrificação, os oócitos foram fixados (n=37) ou submetidos à vitrificação (n=85). Os oócitos criopreservados foram expostos a 1,4 M dimetilsulfóxido (DMSO), 1,8 M etilenoglicol (EG) e 1% X-1000 por 3 min, transferidos para TCM com 2,8 M DMSO + 3,6 M EG + 0,6 M sacarose + 1% X-1000 por 1 min e envasados em palhetas abertas estendidas (OPS). As palhetas foram submetidas ao vapor de nitrogênio por 3 segundos e imersas em nitrogênio líquido. Para o descongelamento, os oócitos foram transferidos para PBS com concentrações decrescentes de sacarose: 0,5M, 0,25M, 0,125M e PBS com 0,4% BSA; permanecendo 5 minutos em cada solução. A avaliação da maturação nuclear e citoplasmática foi realizada por microscopia confocal a laser. A comparação dos índices de maturação foi realizada pelo Teste de Fisher. Os índices de maturação oocitária foram 26,1% grupo controle, 23,5% eGH, 31,8% IGF-I e 17,6% eGH + IGF-I, não sendo detectada diferença entre os grupos (p>0,05). Contudo o índice de retomada da meiose (MI+MII) no grupo com associação dos hormônios foi de 86,7%, sugerindo que a utilização de eGH e IGF-I poderia incrementar esse índice. O baixo número de oócitos utilizados pode ter dificultado a comprovação estatística. Não foram observadas, na totalidade dos oócitos (100%), dilatação celular, excitose prematura dos grânulos corticais ou extravasamento do conteúdo intracelular, indicando integridade da membrana plasmática. Não foi identificada vacuolização do citoplasma, assim como sinais de degeneração celular que promovessem perda da estrutura e localização do fuso mitótico. Pode-se concluir, que não houve diferença no índice de maturação nuclear e citoplasmático com a adição de eGH, IGF-I e associação de ambos. A vitrificação com utilização de X-1000 mostrou-se viável para a criopreservação de oócitos da espécie equina, os quais permaneceram com membrana plasmática íntegra, não ocorrendo vacuolização e degeneração celular. Mais estudos são necessários para avaliação da viabilidade de oócitos vitrificados pelo protocolo descrito. Este é o primeiro trabalho que descreve a utilização de X-1000 na vitrificação de oócitos equinos.

A TÉCNICA DE TRANSFERÊNCIA CITOPLASMÁTICA AFETA O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E A GESTAÇÃO A TERMO EM BOVINOS?

Ferreira, C.R.¹; Meirelles, F.V.²; Perecin, F.¹; Méo, S.C.³; Tetzner, T.A.D.¹; Saraiva, N.Z.¹;
Landim Jr.¹, L.P.; Yamazaki¹, W.; Vantini, R.¹; Garcia, J.M.¹

¹DMVPRA-FCAV-UNESP, 14884-900, Jaboticabal-SP, Brasil, ²ZAB-FZEA-USP, Pirassununga-SP, Brasil, ³CPDGRA-IZ, APTA/SAA, Nova Odessa-SP, 13460-000, Brasil.
chrisferreira13@yahoo.com.br

A transferência citoplasmática (TC) tem sido aplicada nos roedores para o estudo das interações nucleocitoplasmáticas e heranças heteroplásmicas de mtDNA (Renard *et al.*, Development, v.120, p.797-802, 1994; Meirelles *et al.*, Genetics, v.148, p.877-883, 1998) e na obtenção de gestações em mulheres diagnosticadas com “falha recorrente de implantação”, gerando discussões sobre a segurança deste procedimento e a necessidade de avaliar suas consequências em modelos animais. Nosso objetivo foi aplicar e avaliar a técnica de TC em bovinos, uma espécie doméstica em que o citoplasma influencia a produção animal e a seleção de genes mitocondriais de interesse. Oócitos de vacas de abatedouro foram maturados *in vitro* (MIV). Com 22h de MIV, oócitos doadores de citoplasma foram enucleados em MII e partenogeneticamente ativados (ionomicina 5µM/5min e 6-DMAP 2mM/4h). Produção de zigotos receptores: oócitos maduros foram fecundados *in vitro* (FIV). Após 10-12h zigotos receptores FIV tiveram as células do *cumulus* removidas e foram selecionados pela presença do segundo corpúsculo polar (CP). Zigotos receptores e doadores de citoplasma foram incubados (30min) em meio contendo 7,5µg/mL de citocalasina B antes da micromanipulação. Zigotos receptores tiveram segundo CP e citoplasma adjacente removidos antes da TC. Aproximadamente 10-15% do citoplasma doador foi introduzido no espaço perivitelínico do zigoto receptor e eletrofundidos (2 pulsos de 1,5kV/cm por 30µs em solução de Manitol 0,28M). O cultivo foi realizado em SOF suplementado com 2,5% SFB e 0,5% BSA. Para avaliar a segregação inicial das mitocôndrias do doador de citoplasma (corado com MitoTracker CMX ROS[®]) e divisão nuclear (Hoechst 33342), 9 embriões TC apresentando clivagem regular com 32h após FIV tiveram a ZP removida e foram analisados sob microscópio de epifluorescência (330-385nm e 545-580nm). Oitos dos 9 embriões clivados apresentaram mitocôndrias transferidas desigualmente distribuídas entre os blastômeros. Todos os blastômeros possuíam núcleo. Para avaliar o impacto da TC no desenvolvimento embrionário, as taxas de clivagem e blastocistos dos embriões TC e FIV (controle) foram submetidas a ANOVA. As taxas de clivagem dos embriões TC (n=196) e FIV (n=195) não diferiram (73,87 e 77,53%, respectivamente), mas a taxa de blastocisto foi menor (P<0,05) nos embriões TC quando comparados aos FIV (30,06 e 38,53%, respectivamente). A compatibilidade citoplasmática previamente observada entre *B. taurus* e *B. indicus* (Meirelles, Genetics, v.158, p.351-6, 2001) permitiu a TC envolvendo o Nelore Brasileiro (mtDNA *B. taurus*) como zigoto receptor e Nelore Puro de Origem Importado (POI) (mtDNA *B. indicus*) como doador de citoplasma. Onze embriões TC *taurus/indicus* foram transferidos para 8 receptoras, resultando 2 gestações simples. Uma gestação de feto masculino foi interrompida com 85 dias e uma bezerra nasceu normalmente. Esses resultados demonstram que a TC pode ser empregada em bovinos, pois permite o desenvolvimento de gestação a termo, embora afete negativamente o desenvolvimento embrionário.

Suporte financeiro: FAPESP proc.02/05054-7.

EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE FSH EM NOVILHAS DOADORAS DE OVÓCITOS PARA A TRANSFERÊNCIA NUCLEAR USANDO FIBROBLASTOS DE VACA CRIOLA JUNQUEIRA - RESULTADOS PRELIMINARES

Iguma, L.T.^{1,2}; Pivato, I.^{2,3}; Câmara, J.U.²; Damato, J.²; Pereira, D.C.²; Corrêa, G.A.²; Machado, G.M.⁴; Franco, M.M.²; Borges, J.R.J.⁴; Rumpf, R.²

¹Departamento de Biologia Molecular, UnB, Brasília, DF. ²Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. ³CIDASC, Florianópolis, SC. ⁴Hospital Veterinário da UnB, Faculdade de Agronomia e Veterinária, UnB, Brasília, DF. rodolfo@cenargen.embrapa.br

A importância da transferência nuclear de células somáticas adultas (TNCS), biotécnica conhecida como clonagem animal, está vinculada ao grande interesse nas suas aplicações potenciais em áreas estratégicas (biomedicina, conservação e produção animal, ciência básica) e ao impacto destas junto à sociedade. O presente trabalho objetivou avaliar os efeitos da administração de FSH em novilhas puncionadas para coleta de ovócitos usados na TN de células de uma vaca adulta de 9 anos de idade, da raça Junqueira. Este espécime pertence ao Banco Brasileiro de Germoplasma Animal (BBGA) por tratar-se de uma raça Criola em vias de extinção. No tratamento 1 (T1) um grupo de 16 novilhas teve os ovários aspirados pela técnica de *ovum pick up* (OPU). No tratamento 2 (T2) foram separadas 8 das 16 novilhas do T1 para OPU, sendo que neste grupo foram administradas 180 UI do hormônio FSH (Pluset, Calier, Espanha), S.C., 72h antes de cada punção, em aplicação única. Foram realizadas 7 repetições de cada tratamento e as sessões de OPU/TNCS ocorriam a cada 4 dias. Os ovócitos de ambos os tratamentos foram maturados *in vitro* por 19 a 21h e utilizados como citoplasmas receptores na TN de fibroblastos da orelha da vaca Junqueira 203, da 6^a a 11^a passagens no cultivo *in vitro*. A análise estatística dos dados foi realizada usando-se teste de qui-quadrado e $P < 0,05$ foi considerado significativamente diferente. Para efeito de controle dos processos de ativação artificial e cultivo *in vitro* de embriões, uma parte dos ovócitos de cada manipulação foi ativada partenogeneticamente e não foi observada diferença significativa nas taxas de clivagem (70,33% vs 78,31%) e blastocisto (53,38% vs 54,24%) entre T1 e T2, respectivamente. A média (\pm SE) do número de folículos aspirados e de ovócitos coletados por animal a cada sessão de OPU foi significativamente menor ($P < 0,01$) no T1 ($7,7 \pm 0,24$ e $5,3 \pm 0,29$) do que no T2 ($11,2 \pm 0,52$ e $8,1 \pm 0,50$). Porém, a taxa de recuperação foi similar em ambos os grupos (66,0 \pm 2,64% e 71,5 \pm 2,93%, para T1 e T2, respectivamente). Um total de 470 e 411 ovócitos foi recuperado em T1 e T2, respectivamente, sendo que, em média, 78% foram considerados viáveis nos 2 grupos. Com relação aos índices na TN, não observou-se diferença significativa entre T1 e T2 nas taxas de fusão (84,40% vs 89,08%) e blastocisto (46,36% vs 37,66%), enquanto que a taxa de clivagem foi maior em T1 (70,90%) do que em T2 (57,14%), significativamente ($P = 0,031$). Do T1, 46 embriões foram inovulados em 34 receptoras e do T2, 36 embriões em 29 receptoras. Avaliações ultrassonográficas revelaram que não houve diferença significativa entre T1 e T2 nos índices de prenhez inicial (61,76% vs 41,38%), prenhez aos 60 dias (26,47% vs 17,24%) e prenhez aos 90 dias (11,77% vs 10,35%) de gestação. Alguns embriões de ambos os grupos foram separados para posterior análise de expressão gênica. Os resultados deste experimento sugerem que a estimulação com FSH aumenta significativamente o número de ovócitos recuperados por OPU. Contudo, até então, a administração do FSH em doadoras de ovócitos com onda folicular sincronizada não influenciou os parâmetros de TNCS avaliados neste estudo. Apoio Financeiro: Embrapa Cenargen / CNPq

TRANSFERÊNCIA DE GAMETAS EM OVIDUTO DE FÊMEAS BUBALINAS COM OVULAÇÕES ÚNICA E MÚLTIPLAS

Carvalho, N.A.T.^{1,2}; Gimenes, L.U.¹; Sá Filho, M.F.¹; Vannucci, F.S.¹; Reichert, R.H.²;
Carvalho, J.B.P.³; Souza, R.J.⁴; D'Angelo, M.⁴; Chiari, J.R.⁵; Baruselli, P.S.¹

¹Departamento de Reprodução Animal, FMVZ-USP-SP, CEP:05508-000; ²APTA-Vale do Ribeira;

³APTA-Pindamonhangaba; ⁴Instituto Biológico-SP; ⁵SAMVET, Morrinhos-GO. nelcio@usp.br

Objetivou-se aferir o transporte de gametas bovinos e bubalinos pelo sistema genital de búfalas com ovulações única e múltiplas. Foram utilizadas 12 búfalas, divididas em 4 grupos (fatorial 2 x 2). Todas as búfalas receberam 2mg de benzoato de estradiol i.m. (Estrogin[®]; Farmavet, Brasil) e um dispositivo intravaginal de progesterona (DIB[®], Syntex, Argentina) em dia aleatório do ciclo estral (Dia 0). No Dia 4, os animais dos grupos G2 e G4 (ovulações múltiplas), receberam 2.500UI de eCG IM (Novormon[®], Syntex, Argentina). No Dia 8, o DIB[®] foi removido e administrou-se 0,150mg de PGF2 α i.m. (Prolise[®], Arsa, Argentina). As búfalas dos G1 e G3 (ovulação única) receberam 400UI de eCG (Novormon[®]) no Dia 8. No Dia 9, foi administrado GnRH i.m. (Gestran Plus[®]; 50 μ g Lecirelina, Arsa, Argentina) e foram realizadas inseminações artificiais 12 e 24 hs após com sêmen de búfalo (G1 e G2) e de bovino (G3 e G4). No Dia 10, todas as fêmeas foram submetidas à laparotomia do flanco direito e à exposição do oviduto ipsilateral à ovulação (G1 e G3) ou ipsilateral ao maior número de ovulações (G2 e G4). No G1 e no G2 foram inseridos no infundíbulo 10 oócitos bubalinos maturados e no G3 e G4 10 oócitos bovinos maturados. A recuperação das estruturas embrionárias foi realizada por lavagem uterina transcervical no D15 (G1 e G2) e no D16 (G3 e G4), com 1L de DPBS (Cultilab[®]). As taxas de ovulação para os G1, G2, G3 e G4 foram, respectivamente: 100,0 \pm 0,0%, 33,3 \pm 16,7%, 100,0 \pm 0,0%, 36,9 \pm 10,2%. Não foi recuperada nenhuma estrutura embrionária. Esse resultado pode ser devido ao comprometimento da taxa de recuperação embrionária em búfalas superovuladas (Baruselli et al., 2000; Theriogenology, v.53, p.491) ou à manipulação dos ovidutos que prejudicou o transporte dos gametas.

Agradecimentos: FAPESP (2003/00798-0), Tecnopec, Syntex, Cultilab e UPD-Registro (APTA).

RESUMOS

SELECIONADOS PARA

APRESENTAÇÕES

ORAIS

EFEITO DO MOMENTO DA APLICAÇÃO DE PGF2 α NO PROTOCOLO DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM TEMPO FIXO NAS TAXAS DE SINCRONIZAÇÃO E CONCEPÇÃO EM RECEPTORAS DE EMBRIÕES FIV

Sá Filho, O.G.¹; Vasconcelos, J.L.M.¹; Santos, R.M.¹; Oba, E.²; Perez, G.C.¹; Araújo, D.B.¹

¹Departamento de Produção e Exploração Animal – FMVZ/UNESP, Botucatu-SP, 18618-000, Brasil. ²Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ/UNESP, Botucatu-SP, 18618-000, Brasil. vasconcelos@fca.unesp.br

Este trabalho testou se a antecipação da aplicação de PGF2 α em um protocolo de transferência de embriões em tempo fixo (TETF) altera o diâmetro do folículo ovulatório, taxa de sincronização, diâmetro do CL, concentração sérica de P4 e taxas de concepção e prenhez em receptoras de embriões FIV. Foram utilizadas 153 novilhas mestiças, ECC 3,3 \pm 0,17 (escala de 1 a 5), as quais foram divididas em 4 grupos: G1 (n=42) Benzoato de Estradiol (BE; Estrogin, Farmavet, Brasil, 2mg i.m.) + CIDR novo - 7d - PGF2 α (Lutalyse, Pfizer, Brasil, 25mg i.m.) - 2d – retirada do CIDR - 1d - BE (0,8mg) - 8d - TETF; G2 (n=41) tratamento similar ao G1, porém com CIDR previamente utilizado (9 dias); G3 (n=35) BE (2mg) + CIDR novo - 9d – retirada do CIDR + PGF2 α - 1d - BE (0,8mg) - 8d - TETF; G4 (n=35) tratamento similar ao G3, porém com CIDR previamente utilizado (9 dias). Todas as novilhas com CL no dia da TE receberam embriões FIV frescos (Graus 1 e 2), transferidos por um técnico experiente. O diâmetro do folículo ovulatório no momento da retirada do CIDR, diâmetro do CL e concentração sérica de P4 no momento da TETF foram analisados por GLM; as taxas de sincronização (presença de CL à TETF), concepção e prenhez foram analisadas por regressão logística. Não houve efeito dos tratamentos no diâmetro do folículo ovulatório (10,58 \pm 0,56mm; 11,05 \pm 0,63mm; 11,05 \pm 0,58mm; 10,67 \pm 0,56mm; P=0,49), taxa de sincronização (83,33%; 65,85%; 82,86%; 80,00%; P=0,28), diâmetro do CL (18,93 \pm 0,66mm; 19,72 \pm 0,71mm; 19,20 \pm 0,66mm; 18,85 \pm 0,67mm; P=0,40) e concentração sérica de P4 (2,87 \pm 0,33 ng/mL; 2,28 \pm 0,33 ng/mL; 2,69 \pm 0,34 ng/mL; 2,05 \pm 0,35ng/mL; P=0,77) para os grupos 1, 2, 3 e 4, respectivamente. Os tratamentos tenderam a afetar as taxas de concepção (38,23%; 30,77%; 13,79%; 25,00%; P=0,12) e prenhez (31,71%; 20,00%; 11,43%; 20,00%; P=0,14). As receptoras que receberam PGF2 α no dia 7 tenderam a apresentar maiores concentração séricas de P4 em relação às que receberam no dia 9 (G1+G3: 2,78 \pm 0,24ng/mL; G2+G4: 2,15 \pm 0,24ng/mL; P=0,06). Independente de tratamento, o diâmetro do folículo ovulatório afetou (P<0,001) a taxa de ovulação e o diâmetro do CL. As concentrações séricas de P4 foram afetadas pelo diâmetro do CL (P<0,05) e tenderam a ser afetadas pelo diâmetro do folículo ovulatório (P=0,07). As taxas de concepção e prenhez foram influenciadas (P<0,01) pelas concentrações séricas de P4 e pelo diâmetro do CL. Os dados sugerem que a antecipação da aplicação de PGF2 α em um protocolo TETF, apesar de não alterar o diâmetro do folículo ovulatório, a taxa de sincronização e o diâmetro do CL, aumenta as concentrações séricas de P4, o que influencia positivamente a concepção.

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM PROGESTERONA NA RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA DURANTE A PRIMEIRA ONDA FOLICULAR EM DOADORAS NELORE (*Bos indicus*)

Nasser, L.F.T.¹; Bó, G.A.²; Reis, E.L.¹; Menegati, J.A.¹; Marques, M.O.¹; Gimenes, L.U.¹; Sá Filho, M.F.¹; Mapletoft, R.J.³; Baruselli, P.S.¹

¹Departamento de Reprodução Animal, FMVZ/USP, São Paulo/ SP, Brasil. ² Instituto de Reproduccion Animal Córdoba (IRAC), Córdoba, Argentina. ³University of Saskatchewan, SK, Canadá. barusell@usp.br

Um total de vinte vacas Nelore (n=20) foram subdivididas homoganeamente em dois grupos experimentais (1ªOnda e 1ªOnda+P4). As fêmeas foram pré-sincronizadas com 2mg de benzoato de estradiol mais 50mg de progesterona (P4) i.m. (Index Farmacêutica, Brasil) e dispositivo intravaginal de P4 (CIDR, Pfzier, Brasil) no Dia 0. No Dia 5, administrou-se PGF2 α (Preloban, Intervet, Brasil). No Dia 9, removeu-se os dispositivos e, 24 horas após, administrou-se 12,5mg de LHp (Lutropin, Vetrepharm, Canadá). O tratamento superestimulatório foi realizado com 133mg de FSHp (Folltropin, Vetrepharm, Canadá), subdividido em dez doses equivalentes em intervalos de 12/12 horas do Dia 11 ao Dia 15. No dia 15, as fêmeas receberam duas doses de PGF2 α (manhã e tarde) e na tarde do Dia 16 receberam 25mg de LHp. O Grupo 1ªOnda+P4 recebeu o mesmo tratamento, adicionado de um dispositivo intravaginal de P4 durante o tratamento com FSH. As doadoras foram inseminadas na manhã e tarde do Dia 17 e a colheita dos embriões foi realizada no Dia 23. Os dados foram analisados pelos testes de Anova e Qui-quadrado. Os resultados para os grupos 1ªOnda vs. 1ªOnda+P4 foram, respectivamente: número de folículos ≥ 8 mm no 2º LH ($19,9 \pm 2,2$ vs. $14,5 \pm 3,5$; $p > 0,05$), número de CLs na colheita ($5,36 \pm 1,7^a$ vs. $9,1 \pm 2,2^b$; $p = 0,06$), taxa de ovulação ($76,9 \pm 7,6$ vs. $69,2 \pm 8,4\%$; $p > 0,05$), taxa de recuperação embrionária ($31,0 \pm 10,7$ vs. $54,8 \pm 11,1\%$; $p > 0,05$), total de estruturas colhidas ($4,0 \pm 1,5$ vs. $4,7 \pm 1,1$; $p > 0,05$), embriões transferíveis ($1,3 \pm 1,3^a$ vs. $3,9 \pm 1,1^b$; $p < 0,05$), embriões congeláveis ($1,2 \pm 1,2^a$ vs. $3,0 \pm 0,9^b$; $p < 0,05$), estruturas não fecundadas ($2,5 \pm 0,75^a$ vs. $0,2 \pm 0,2^b$; $p < 0,05$) e concentração plasmática de P4 durante o tratamento ($1,32 \pm 0,16^a$ vs. $3,5 \pm 0,3^b$ ng/ml; $p < 0,05$). Os resultados indicam que é possível superovular vacas Nelore durante a 1ª onda de crescimento folicular, desde que suplementadas com P4 exógena durante o tratamento superovulatório.

(Agradecimentos: FAPESP 02/06363-0, Bioniche e Tecnopec)

EFEITO DA SUPEROVULAÇÃO COM O EXTRATO DE PITUITÁRIA EQUINA NO TRANSPORTE DE OÓCITOS PARA O OVIDUTO DE ÉGUAS (Resultados Parciais)

Carmo, M.T.¹; Losinno, L.²; Aguilar, J.J.²; Araujo, G.H.M.¹; Alvarenga, M.A.¹

¹Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, UNESP – Botucatu, SP – Brasil.

²Universidade de Rio Cuarto, Rio Cuarto – Argentina. mtc.vet@uol.com.br

Há mais de três décadas inúmeros pesquisadores vêm se empenhando em desenvolver um protocolo eficiente para produzir uma boa resposta superovulatória na espécie eqüina. Protocolos mais recentes desenvolvidos em nosso laboratório utilizando-se o Extrato de Pituitária Eqüina (EPE) têm permitido uma boa resposta superovulatória. Contudo o número de embriões recuperados ainda tem sido inferior ao das ovulações, em consequência de fatores ainda não determinados. O objetivo do presente estudo foi avaliar se a baixa recuperação embrionária de éguas superovuladas (SO) está relacionada a falhas na captação e/ou migração dos oócitos para o oviduto. Neste experimento que foi desenvolvido na Universidade de Rio Cuarto (Argentina) em conjunto com a Universidade Estadual Paulista (UNESP - Botucatu,SP-Brasil), foram utilizadas 18 éguas de 3 – 12 anos, com peso médio de 400Kg (06 éguas controles “solução fisiológica”; 12 éguas tratadas “EPE”). Estes animais foram mantidos com livre acesso a feno de alfafa e água, sendo palpadas e ultra-sonografadas via retal diariamente até se detectar um folículo de 30 mm, quando então, passaram a ser examinadas duas vezes ao dia. O protocolo superovulatório utilizado consistiu na administração de 25mg, de EPE duas vezes ao dia intramuscular (2ml) tendo o seu início no sétimo dia pós-ovulação, havendo no ovário corpo lúteo evidente e de folículos não maiores que 20mm. Este foi interrompido quando as maiorias dos folículos atingiram um diâmetro de 35mm, neste momento foi administrado 2.500UI de hCG endovenosa. As éguas foram abatidas entre 12 e 24h após a detecção da primeira ovulação, sendo removido os ovários, ovidutos e útero. Estes foram acondicionados em uma caixa térmica contendo DPBS previamente aquecido (37°C) e transportado ao laboratório (tempo decorrente do abate ao laboratório de 20min.). Os ovidutos foram removidos dos ovários e útero, e posteriormente dissecados e lavados internamente com 20ml de DPBS aquecido a 37°C. Este lavado foi levado a um estereomicroscópio e aferido a presença ou não dos oócitos. O grupo controle recebeu solução fisiológica procedendo ao mesmo protocolo do grupo tratado com EPE. Foi utilizado para análise estatística o teste de Tukey e ANOVA para avaliar o número médio de ovulações e o número médio de oócitos viáveis por égua, e o qui-quadrado para o percentual médio de oócitos viáveis por égua. Observou-se diferença estatística ($p < 0,05$) entre o grupo controle e o superovulado quanto ao número médio de ovulações por égua ($1,167 \pm 0,408 / 4,417 \pm 2,906$) e o número médio de oócitos viáveis recuperado por égua ($1,0 \pm 0,632 / 2,67 \pm 1,614$), contudo, a despeito de um decréscimo numérico, não foi observada diferença estatística ($p > 0,05$) quanto ao percentual de oócitos viáveis recuperados por ovulação na éguas SO (85,71 / 60,38). Este mesmo percentual de decréscimo tem sido observado quando da recuperação de embriões de éguas SO. Os resultados obtidos até o presente momento indicam que pode haver uma falha na captação e/ou na migração do oócito para o oviduto de éguas SO. As razões determinantes desta falha, bem como o grau de maturação dos oócitos recuperados estão sendo estudados.

Apoio - FAPESP

TRATAMENTO DE ÉGUAS DA RAÇA MANGALARGA MARCHADOR COM PROGESTERONA (P4) OU ALTRENOGEST VISANDO SUA UTILIZAÇÃO COMO RECEPTORAS DE EMBRIÕES NO SEGUNDO DIA APÓS A OVULAÇÃO.

Caiado, J.R.C.¹; Fonseca, F.A.¹; Silva, J.F.S.¹; Fontes, R.S.¹

0

¹Universidade Estadual do Norte Fluminense-Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias.
Avenida Alberto Lamego-100. Campos dos Goytacazes-RJ. jrcaiado@hotmail.com

Durante as estações de monta de 2001 e 2002, 43 éguas da raça Mangalarga Marchador, receptoras de embriões, foram tratadas aleatoriamente, via intra-muscular, com 200 mg/dia de progesterona oleosa (P4) e um outro grupo de 41 éguas da mesma raça com 0,044 mg/kg/dia de altrenogest, aleatoriamente via oral, objetivando sua utilização precoce na transferência de embriões. Ambos tratamentos foram efetuados entre Dia 0 (D0) ao Dia 5 (D5) após ovulação, e as receptoras avaliadas no Dia 2 (D2) e, se consideradas aptas, inovuladas. Dois grupos de 85 éguas da mesma raça foram utilizadas aleatoriamente como controle, não recebendo nenhum progestágeno, sendo da mesma forma avaliadas e inovuladas em D2 ou D5, se consideradas aptas. Os grupo D2 com P4 e D5 sem progestágeno, tiveram um maior ($P<0,05$) número de éguas consideradas excelentes ou boas (aptas) no momento da avaliação, respectivamente 55 (64,71%) e 25 (65,12%), pelo método do qui-quadrado. O grupo D2 com altrenogest, apresentou um número estatisticamente igual de receptoras consideradas aptas para inovulação e descartadas (20 e 21 éguas respectivamente), no momento da avaliação. O grupo D2 sem progestágeno apresentou uma quantidade significativamente maior de receptoras descartadas ($P<0,05$) nesta avaliação (65 ou 76,47%). Quanto a relação entre éguas gestantes e não gestantes após a inovulação, os grupos D2 com P4 e D5 sem progestágeno apresentaram, um número maior ($P<0,05$) de receptoras prenhes, respectivamente 72,72% (16 de 22) e 76,36% (42 de 55) de taxa de prenhez. O grupo D2 com altrenogest apresentou uma taxa de prenhez de 52,38% (11 de 21), e o grupo D2 sem progestágeno uma quantidade significativamente menor de éguas gestantes (30% - 6 de 20). Estes dados nos permitem inferir que por meio do tratamento com P4 do D0 ao D5, pode-se antecipar a inovulação de receptoras para o D2, com resultados semelhantes ao D5.

EXPRESSÃO GÊNICA NA TRANSIÇÃO MATERNO-ZIGÓTICA EM EMBRIÕES BOVINOS FECUNDADOS *IN VITRO* OU PRODUZIDOS POR TRANSFERÊNCIA DE NÚCLEOS DE CÉLULAS SOMÁTICAS

Camargo, L.S.A.¹, Powell, A.M.², Viana, J.H.M.¹, Sá, W.F.¹, Ferreira, A.M.¹, Ramos, A.A.³, Wall, R.J.²

¹Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brasil. 36038-330. ²Biotechnology and Germplasm Laboratory, BARC, USDA, Maryland, EUA. 20705. ³Epamig, Juiz de Fora, MG, Brasil. 36045-560. camargo@cnppl.embrapa.br

O genoma embrionário, durante o período inicial do desenvolvimento, sofre uma reprogramação, ativando a expressão de determinados genes enquanto reprimindo outros. Tem sido sugerido que o procedimento de transferência de núcleos possa provocar alterações na expressão de genes nesse período. Objetivou-se comparar a expressão de transcritos durante a fase transição materno-zigótica entre embriões bovinos fecundados *in vitro* (FIV) ou produzidos por transferência de núcleos de células somáticas (TNCS). Embriões foram produzidos por meio da fecundação *in vitro* ou por transferência de células somáticas obtidas de músculo de fetos com três meses de gestação. Zigotos FIV e embriões TNCS foram cultivados em meio G1.1 na ausência de soro, por 72h a 38,5°C em 5% CO₂, 5% O₂ e 90% N₂. Embriões em estágios de 8-16 células foram congelados e armazenados em N₂ líquido até extração do RNA. O mRNA extraído foi amplificado e todos os genes foram avaliados em embriões individuais. Avaliou-se a expressão em 23 embriões FIV e em 24 embriões TNCS. Os genes analisados codificam as proteínas GLUT5 (transportador de glicose, isoforma 5), Na⁺/K⁺ ATPase α 1 e LDHA (lactato desidrogenase isoenzima A), cujas expressões embrionária iniciam-se nos estágios de 8-16 células. Avaliou-se também o gene que codifica o fator de transcrição OCT-4, específico de células totipotentes, e o gene do colágeno 6 α 1, específico para fibroblastos. A quantificação foi realizada utilizando-se PCR em tempo real e normalizada com a expressão do gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), usado como gene de referência endógeno. Os resultados foram analisados por ANOVA. Não se observou diferença (P>0,05) na quantidade relativa dos transcritos analisados entre embriões FIV e TNCS. A expressão do colágeno 6 α 1 foi ausente nos embriões FIV e TNCS, porém presente nas células doadoras de núcleos. Esses resultados mostram que os embriões TNCS foram aptos a ativar a expressão dos genes avaliados durante o desenvolvimento inicial semelhantemente aos embriões de FIV, incluindo um gene associado à totipotência, enquanto reprimiram a expressão de um gene de caráter somático, sugerindo que a transferência de núcleos não altera a expressão desses genes durante o período de transição materno-zigótica, quando comparado com embriões FIV.

EFICIÊNCIA DE DUAS TÉCNICAS NA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES CLONES BOVINOS

Feltrin, C.; Forell, F.; dos Santos, L.C.; Vieira, A.D.; Rodrigues, J.L.

Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução, FAVET, UFRGS
CP 15004, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil – cristianofeltrin@terra.com.br

O objetivo deste experimento foi comparar o número de estruturas reconstituídas por rotina, utilizando duas técnicas de clonagem, o Handmade Cloning (HMC), descrita por Vajta (2003) e modificada por Bertolini (comunicação pessoal), com a técnica de clonagem convencional por micromanipulação (CC). Seiscentos oócitos bovinos foram selecionados após a escarificação da córtex de ovários colhidos em abatedouro e maturados *in vitro* durante 19 horas, em TCM199 suplementado com 10% de SVE, 0,5 µg/mL de FSH e 0,03UI de hCG à 39°C em atmosfera úmida contendo 5% CO₂ em ar. Após a remoção das células do *cumulus oophorus*, os oócitos em MII (234 no HMC, 219 no CC) foram transferidos para gotas, sob óleo mineral, de SOF modificado, suplementado com hepes (25 mM) e 0,4% de BSA à 37°C. Os oócitos do grupo HMC tiveram a zona pelúcida digerida por enzimas, sendo em seguida, divididos manualmente e reconstituídos pela exposição à fitohemoaglutinina (500µg/mL). Finalmente, os complexos oócitos receptores-núcleos doadores foram fusionados com o auxílio de uma câmara de eletrofusão. No procedimento convencional foi realizada a introdução da célula somática no oócito enucleado e a eletrofusão com o auxílio de um micromanipulador. A indução da ativação nos dois grupos foi realizada pela exposição à 5 µM de ionomicina (5 min) e 2mM de 6-DMAP (3h e 30min). O cultivo *in vitro* foi realizado em meio SOFaa com 10% de SVE à 39°C em atmosfera úmida contendo 5% CO₂, 5% O₂ e 90% N₂. A taxa de clivagem foi avaliada 48hs após o início do cultivo e a de desenvolvimento embrionário no 7º dia de cultivo. No HMC, em três replicações, dos 234 oócitos maturados foram manipulados 220 (94%), alcançando a reconstituição de 98 (44,5%) estruturas embrionárias. A taxa de clivagem foi de 74,4% (73/98) e a de desenvolvimento embrionário até blastocisto de 18,3% (18/98). Em três replicações, no CC, foram micromanipulados 105 (48%) dos 219 oócitos maturados, conseguindo reconstituir 37 (35,22%) estruturas. A taxa de clivagem foi de 56,7% (21/37) e a de desenvolvimento embrionário até blastocisto de 13,5% (5/37). O HMC permitiu maior número de manipulações de oócitos e de reconstruções de estruturas por rotina (p<0,01) que, por sua vez, clivaram com maior eficiência (p<0,05). Por outro lado, a taxa de desenvolvimento embrionário até blastocisto foi semelhante nos dois grupos.

Apoio: CNPq

INFLUÊNCIA DO GRAU DE SANGUE NELORE NA PRODUÇÃO *IN VIVO* DE OÓCITOS

Rubin, K.C.P.¹; Pontes, J.H.F.²; Nonato Jr., I.²; Ereno Jr., J.C.²; Pansard, H.³; Seneda, M.M.¹

¹Departamento de Clínicas Veterinárias, CCA, Universidade Estadual de Londrina, PR, 86051-990.

karinac8@aol.com; ²In Vitro Brasil – Central de Biotecnologia da Reprodução – Mogi Mirim;

³Fazenda Santa Gabriela - Uraí – PR.

Atualmente, o Brasil possui um rebanho bovino com cerca de 180 milhões de cabeças, das quais 80% zebuínos ou cruzados com zebu e 95 milhões destes são da raça Nelore (Nogueira, 2004). Baseado nesta citação, o presente trabalho tem por objetivo analisar a influência da porcentagem de sangue da raça Nelore na produção de ovócitos. Para isso, analisou-se a produção de oócitos de 172 vacas, sendo 41 da raça Aquitânica, 44 da raça Nelore e 87 Canchim. Estes animais foram submetidos à recuperação dos oócitos através da aspiração folicular em um momento aleatório do ciclo estral. Para os animais da raça Aquitânica obteve-se média por sessão de aspiração de 3,7 oócitos aspirados. Para os animais da raça Canchim a média foi de 13,6 oócitos aspirados e na raça Nelore obteve-se média de 18,4 oócitos aspirados. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) em relação a média de oócitos aspirados nas três raças. Desta forma, torna-se evidente que ao aumentarmos a porcentagem de sangue Nelore na constituição racial, há também um incremento na produção de ovócitos, visto que a maior média de oócitos aspirados foi encontrada nas fêmeas da raça Nelore e a segunda maior média nas fêmeas da raça Canchim que contém em sua constituição racial 5/8 de sangue Charolês e 3/8 de sangue Nelore. Finalmente, a menor média foi encontrada nas fêmeas da raça Aquitânica, que não apresentam sangue Nelore em sua constituição racial. Embora estes dados estejam de acordo a outros trabalhos presentes na literatura, ressalta-se que estes resultados são preliminares, e melhor avaliação destes resultados será possível com a continuidade dos trabalhos.

EFEITO DA PROGESTERONA EXÓGENA EM VACAS DOADORAS DE OVÓCITOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO FOLICULAR E A PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

Pfeifer, L. F.¹; Schneider, A.¹; Castilho, E. M.¹; Luz, E. M.¹; Ataíde, P. F.¹; Dionello, N. J. L.²; Pivato, I.³; Rumpf, R.⁴; Corrêa, M. N.¹

¹Faculdade de Veterinária, NUPEEC – Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária. - 96010 900 - Pelotas/RS ²Faculdade de Agronomia - Universidade Federal de Pelotas - 96010 900 - Pelotas/RS. ³CIDASC- Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrário de Santa Catarina, 89130 000, Indaial- SC, Brasil. ⁴EMBRAPA-Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia. -70770 901- Brasília-DF, Brasil. lpfeifer@ufpel.edu.br

A técnica de punção folicular (PF) possibilita maximizar o aproveitamento de ovócitos que fisiologicamente sofreriam atresia, aumentando assim a eficiência reprodutiva e o ganho genético em rebanhos bovinos, mostrando-se viável até mesmo em fêmeas com limitações reprodutivas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o número de folículos dispostos à PF, a quantidade e a qualidade de ovócitos e a produção *in vitro* de blastocistos oriundos de doadoras submetidas à diferentes tratamentos com progesterona. Para a realização deste experimento foram utilizadas 15 vacas mestiças. Antes do início do experimento, todas as vacas receberam por 8 dias um CIDR[®] (dispositivo intravaginal liberador de progesterona). Dois dias antes da retirada dos dispositivos, todas as vacas receberam 0,150 mg de D-cloprostenol por via intramuscular. No dia da retirada dos CIDRs[®] todas vacas foram submetidas à PF. Após esta 1^o PF as vacas foram divididas aleatoriamente em 3 grupos distintos e todas submetidas à PF a cada 4 dias totalizando 6 sessões: G1: animais que receberam 1 CIDR[®] usado; G2: animais que receberam 2 dispositivos novos, e G3: animais que não foram submetidos à tratamentos com CIDR[®]. As trocas dos CIDRs[®] do G1 e G2 foram realizadas a cada 8 dias, assim como a aplicação de 0,150 mg de D-cloprostenol, nos três grupos. Os resultados demonstram um aumento ($p < 0,01$) na média de folículos pequenos, com diâmetro de até 5 mm, nos G1 (9,44) e G2 (9,44) em relação ao G3 (6,12). Houve diferença ($p < 0,05$) na taxa de recuperação apenas entre o G2 (68,77%) e G3 (47,19%), e um aumento ($p < 0,01$) na média de ovócitos coletados/vaca/punção do G1 (6,56) e G2 (6,96), em relação ao G3 (3,36). Também foi observada diferença ($p < 0,05$) na média de ovócitos de qualidade I e II por punção entre os grupos 1 e 3, não havendo diferença ($p > 0,05$) entre os grupos 1 e 2 e grupos 2 e 3, sendo: 13 para o G1, 5,6 para o G2 e 2,6 para o G3. A taxa de clivagem dos ovócitos de qualidade I e II do G1 (80%) foi superior ($p < 0,05$) ao G2 (75%) e G3 (61,5%). A taxa de blastocistos, oriundos de ovócitos de qualidade I e II foi superior ($p < 0,05$), no G1 (46,15%) em relação ao G3 (15,38%), porém não houve diferença do G1 para o G2 (32,14%) e do G2 para o G3. Não foi detectada diferença ($p > 0,05$) na taxa total de blastocistos entre os grupos G1, G2 e G3, sendo: 28,20% ($6,6 \pm 2,15$), 16% ($3,8 \pm 2,15$) e 15% ($1,8 \pm 2,15$), respectivamente. Os resultados indicam que vacas tratadas com implantes de progesterona apresentam aumento do número de ovócitos, bem como folículos aptos à punção. O número de ovócitos de qualidade I e II recuperados e a taxa de produção e clivagem de blastocistos oriundos destes foram maiores quando as doadoras eram submetidas a apenas 1 CIDR[®] reutilizado. A taxa de clivagem total foi maior quando as vacas foram submetidas à tratamentos com progesterona, porém não houve diferença na taxa de blastocistos total entre os grupos.

COMPARAÇÃO DAS PERDAS GESTACIONAIS DE RECEPTORAS INOVULADAS COM EMBRIÕES *Bos indicus* PRODUZIDOS *IN VIVO* E *IN VITRO*

Borsato, E.A.¹; Ludwig Jr, H.E.¹; Silva, D.R.M.¹; Barreiros, T.R.R.²; Seneda, M.M.³

¹Embriogen, Campo Mourão, PR, ²Faculdades Integrado de Campo Mourão, PR; ³Departamento de Clínicas Veterinárias, CCA, UEL, PR, 86051- 990 thalesrigo@grupointegrado.br

As diferenças das taxas de prenhez entre o período embrionário e fetal da gestação tem sido alvo de muitas pesquisas no intuito de aumentar a eficiência reprodutiva em rebanhos bovinos submetidos à biotécnicas de reprodução assistida. O objetivo do presente experimento foi comparar as perdas gestacionais em receptoras inovuladas com embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* da raça Nelore. Foram utilizadas 165 novilhas *Bos taurus* x *Bos indicus* cíclicas mantidas a pasto na região de Campo Mourão, Estado do Paraná. Estes animais foram selecionados após um tratamento prévio para transferência de embriões em tempo fixo (TETF). Este tratamento consistiu em implantar, em momento aleatório do ciclo estral, um dispositivo intravaginal de 1,9 g de P4 (CIDR, Pfizer, Brasil) simultaneamente à aplicação IM de 2 mg de BE (Estrogin, Farmavet, Brasil). No oitavo dia, os dispositivos foram retirados e os animais receberam 500 µg de Cloprostenol (Sincrocio, Ouro fino, Brasil) por via IM. Após 24h todos os animais receberam uma aplicação de 1 mg de BE, por via IM. A identificação e avaliação ultra-sonográfica (Aloka, SSD 500, 5 MHz) do CL foi realizada dezesseis dias após o início do tratamento. Os animais foram divididos em dois grupos de acordo com a origem dos embriões a serem inovulados. No primeiro grupo (G-1, n=59) as receptoras foram inovuladas, logo após o exame ultra-sonográfico, com embriões produzidos por superovulação e colheita transcervical. No segundo grupo (G-2, n=96), as receptoras foram inovuladas com embriões produzidos *in vitro* vinte e quatro horas após a avaliação ultra-sonográfica. O diagnóstico de gestação foi feito aos 30 e 60 dias por ultra-sonografia. As perdas gestacionais foram calculadas com base na diferença nas taxas de prenhez estabelecidas aos 30 e 60 dias. Os dados foram analisados pelo teste do Qui-quadrado corrigido de Yates. Não houve diferença significativa nas taxas de prenhez entre os grupos G-1 e G-2, resultando, respectivamente, em 57,6% (34/59) e 52,1% (50/96) aos 30 dias de gestação e em 49,1% (29/59) e 40,6% (39/96) (P>0,05) aos 60 dias de gestação. As perdas gestacionais foram de 8,5% (5/59) para o G-1 e 11,4% (11/96) para o G-2 (P>0,05). A partir destes resultados, destaca-se a ausência de diferença nas taxas de prenhez e nas perdas gestacionais de receptoras submetidas à TETF, com embriões produzidos *in vitro* e *in vivo*. Estes dados mostram que independente da técnica de produção de embriões, é necessário o desenvolvimento de técnicas que visam diminuir as perdas gestacionais na transferência de embriões.

INVOLUÇÃO DO SACO VITELINO DE EMBRIÕES BOVINOS FIV E MONTA NATURAL (10 A 70 DIAS DE GESTAÇÃO)

Assis Neto, A.C.^{1,2}; Silva, T.C.B.¹; Verechia, F.T.V.¹; Ambrósio, C.E.²; Almeida, A.B.;
Meirelles, F.V.³; Garcia, J.M.⁴; Miglino, M.A.²

¹ Faculdade de Zootecnia -Dracena /UNESP, Dracena-SP, 17900-000, Brasil. ² Departamento de Cirurgia – FMVZ/USP, São Paulo-SP, Brasil. ³ FZEA/USP, Pirassununga-SP, Brasil. ⁴ Departamento de Reprodução Animal e Medicina Veterinária Preventiva – FMVZ/UNESP, Jaboticabal, Brasil.
antonioassis@dracena.unesp.br

O saco vitelino involui e se degenera muito cedo e nenhum vestígio é encontrado no final da gestação. Considerando que ele representa funções importantes para a circulação embrionária e transmissão de metabólitos para o conceito este trabalho tem como objetivo estudar morfometricamente a involução do saco vitelino em embriões bovinos provenientes da FIV e monta natural. Foram utilizados 59 embriões com idade gestacional variando de 10 a 50 dias; 09 fetos em fase inicial com idade de 60 a 70 dias e 06 embriões FIV com idade de 35 a 46 dias de gestação. O saco vitelino em fases iniciais da gestação apresentava-se com suas características macroscópicas bem definidas aos 10-20 dias, onde foi caracterizado por apresentar uma região central e duas extremidades livres. Com o evoluir da gestação esta estrutura foi diminuindo seu tamanho e a partir do 40-50 dias da gestação, o seu comprimento total diminuía consideravelmente em relação aos períodos anteriores. A involução do saco vitelino encontrava-se estabelecida em fetos com 60-70 dias de gestação. O Crown-Rump médio, o peso do embrião e o peso do saco gestacional cresceram linearmente com o evoluir da gestação. Nestes dois últimos parâmetros o crescimento foi mais acelerado a partir do período de 40-50 dias. Os sacos vitelinos dos embriões FIV tiveram um comprimento menor ($1,07 \pm 0,55$ cm) quando comparados com o grupo de monta natural ($5,53 \pm 3,14$ cm) no período gestacional de 30-40 dias. Conclui-se que o saco vitelino de embriões provenientes de monta natural cresceu até 40 dias de gestação; aos 70 dias o resquício estava presente e que nos FIV o saco vitelino era pouco desenvolvido aos 30 e 40 dias da gestação.

Apoio: FAPESP, CAPES

RESUMOS

Seção de Posters A

**EFEITO DE DIFERENTES PROTOCOLOS SUPEROVULATÓRIOS SOBRE A
PRODUÇÃO DE EMBRIÕES EM CAMUNDONGOS (*Mus musculus*)
DA LINHAGEM SWISS**

Wohlers, S.¹; Pinto, I.S.B.¹; Arashiro, E.K.N.²; Viana, J.H.M.^{1,2}

¹ Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG 36016-000

² Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG 36038-330 jhmviana@ig.com.br

A retroalimentação negativa exercida pela inibina, produzida pelos folículos dominantes, apresenta um importante papel na redução da concentração de FSH. A imunização contra a inibina tem sido utilizada para aumentar a taxa de ovulações naturais em diferentes espécies, e também em associação à superovulação convencional. O objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos de diferentes protocolos superovulatórios sobre a recuperação de embriões de camundongos (*Mus musculus*). Foram utilizadas 32 camundongas, distribuídas aleatoriamente em quatro tratamentos: controle (T1); superovulação convencional (T2); imunização ativa contra inibina bovina (T3); imunização ativa associada à superovulação (T4). As superovulações foram induzidas pela aplicação intraperitoneal de 10 U.I. de eCG, seguida de 10 U.I. de LH após 48h. Utilizou-se como imunógeno líquido folicular bovino livre de esteróides, obtido de folículos com mais de 9mm e em fase de crescimento, conjugado com adjuvante de Freund. Duas aplicações de reforço foram realizadas em intervalos de sete dias. Observou-se uma média geral de $10,90 \pm 1,16$ ovulações por animal, com a obtenção de $7,39 \pm 0,92$ estruturas, das quais $5,18 \pm 0,74$ foram classificadas como viáveis (67,0%). A imunização contra inibina não alterou o número de estruturas recuperadas ou de embriões viáveis, quando comparada com o grupo controle ($5,67 \pm 0,73$ e $3,12 \pm 1,06$ vs. $4,17 \pm 0,96$ e $2,33 \pm 1,35$ nos grupos T3 e T1; respectivamente; $P > 0,05$), mas potencializou o efeito do tratamento hormonal convencional sobre o número de ovulações e de estruturas recuperadas ($20,50 \pm 2,81$ vs. $9,00 \pm 1,84$ e $12,60 \pm 2,35$ vs. $9,40 \pm 0,96$ nos grupos T4 e T2, respectivamente, $P < 0,05$). Contudo, T4 apresentou uma menor porcentagem de embriões viáveis que o T2 (63,5 vs. 74,5%), resultando em um número semelhante de embriões viáveis recuperados ($5,71 \pm 1,96$ vs. $7,00 \pm 1,35$; $P > 0,05$). Estes resultados sugerem que a imunização contra inibina bovina afeta a resposta à superovulação em camundongos, e este efeito pode ser utilizado com modelo experimental para o estudo das ações da inibina na fisiologia ovariana.

INCIDÊNCIA DE MÚLTIPLAS OVULAÇÕES NA RAÇA CAMPOLINA E SUA INFLUÊNCIA NA RECUPERAÇÃO EMBRIONÁRIA

Greco, G.M.¹; Oliveira, G.D.M.²; Pinna, A.E.²; Pinho, T.G.³; Queiroz, F.J.R.²

¹ Aluno de Graduação e Iniciação Científica - CNPq - Dep. de Fisiopatologia da Reprodução – UFF, Niterói-RJ, CEP: 24230-340, Brasil ² Médico Veterinário Autônomo ³ Dep. de Fisiopatologia da Reprodução – UFF. gabvet@ig.com.br

As ovulações múltiplas são desejáveis em programas de transferência de embriões, pois permitem a recuperação de mais de um embrião por lavagem uterina trans-cervical realizada, otimizando seus resultados. Os eqüinos são classificados como animais mono-ovulatórios; no entanto, a incidência de duplas ovulações na espécie é variável, dependendo da raça do animal, de sua linhagem (MCKINNON, A.O., *Equine Reproduction*, p.125, 1993) e até mesmo de sua idade (MOREL, M.C.G.D., *Animal Reproduction Science*, 66: p.59-70, 2001). Trata-se de uma ocorrência comum, variando entre 4 a 50% (MCKINNON, A.O., *Equine Reproduction*, p.125, 1993; CARMO et al., *ICAR 2004 Abstracts*, Vol.2, p.406, 2004), o que torna necessário o seu estudo em populações diferentes. O presente experimento objetivou identificar, na raça Campolina, a incidência dos diferentes padrões ovulatórios, bem como a influência dos mesmos sobre a recuperação embrionária. Através da palpação retal e de exame ultrassonográfico, 109 éguas tiveram seus ciclos estrais acompanhados durante a estação de monta de 2002 - 2003, totalizando 364 ciclos. As avaliações foram realizadas a partir dos primeiros sinais de estro ou, em fêmeas que já se encontravam no processo de coleta de embriões, de cinco dias após a lavagem uterina, até 24 horas passadas da primeira ovulação. Inseminações artificiais foram realizadas com sêmen de garanhões comprovadamente férteis. Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística utilizando-se o teste Qui-Quadrado. As ovulações múltiplas ocorreram em 30,8% (112/364) dos ciclos; 69,2% dos ciclos (252/364) culminaram em ovulações simples, 15,4% (56/364) em ovulações duplas unilaterais e 13,2% (48/364) em ovulações duplas bilaterais. A incidência de ovulações triplas foi de apenas 1,9% (7/364), e de quádruplas somente 0,3% (1/364). Observou-se que a maioria das ovulações simples ocorreu no ovário esquerdo (52,8% (133/252) contra 47,2% (119/252) no direito); sem que ao fato coubesse qualquer relevância estatística. Do total de 364 lavados realizados, 249 (68,4%) obtiveram como resultado a recuperação de um ou mais embriões, chegando-se à taxa de recuperação embrionária final de 81,9%. As ovulações duplas bilaterais resultaram em maior taxa de recuperação embrionária ($p < 0,05$) quando comparadas com as unilaterais (137,5% contra 101,8%, respectivamente). Da mesma forma, o número de lavados onde se recuperou dois embriões foi maior ($p < 0,05$) naqueles ciclos onde ocorreram ovulações duplas bilaterais (54,2% contra 33,9%). Através da análise destes dados, podemos concluir que a raça Campolina possui considerável incidência de ovulações múltiplas (30,8%) e duplas (28,6%), já que a média de ovulações duplas na espécie é de 16% (BLANCHARD, T.L., *Manual of Equine Reproduction*, p.11, 2002). Podemos detectar que as ovulações duplas bilaterais resultam em maiores taxas de recuperação embrionária que as unilaterais, conferindo evidências, mais uma vez, de que existem fatores capazes de resultar em fertilidade inferior naquelas ovulações múltiplas de um mesmo ovário. Possivelmente, a incidência de ovulações triplas e quádruplas detectada poderia ter sido maior, caso houvesse o acompanhamento por mais de 24 horas após detecção da primeira ovulação.

CORRELAÇÃO ENTRE O DIÂMETRO DO CORPO LÚTEO FORMADO A PARTIR DE OVULAÇÕES SIMPLES E DUPLAS E O NÍVEL PLASMÁTICO DE PROGESTERONA EM JUMENTAS

Conceição, J.C.¹; Araujo, G.H.M.¹; Oliveira, J.V.²; Oba, E.¹; Carvalho, L.R.³; Meira, C.¹

¹ Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ/UNESP, Botucatu-SP, 18618-000, Brasil. ² Pólo Regional de Desenvolvimento Tecnológico da Alta Mogiana – E.E.Z., Colina-SP, Brasil, ³Dpto Biostatística – IB/UNESP, Brasil. julianazuppi@bol.com.br

O presente estudo teve como objetivo comparar o diâmetro dos corpos lúteos (CL) oriundos de ovulações simples e duplas e correlacionar esse evento aos níveis plasmáticos de progesterona (P4). Embora haja muitos trabalhos sobre o desenvolvimento do CL em éguas, há uma lacuna de estudos sobre este tema na espécie asinina. Sete jumentas, da raça Marchador Brasileiro, em plena atividade reprodutiva foram divididas em dois grupos: Grupo 1, jumentas com ovulações simples (n=4); Grupo 2, jumentas com duplas ovulações sincrônicas [sincrônica=intervalo<24h entre ovulações (n=3)]. Os ovários foram avaliados por ultra-sonografia transretal e o sangue colhido diariamente, durante o ciclo estral. O sangue foi centrifugado e o plasma armazenado a -20°C para dosagem de P4 por radioimunoensaio. Para se comparar os valores médios (diâmetros e dias) entre os dois grupos utilizou-se ANOVA, nas concentrações diárias de P4 e diâmetro de corpo lúteo utilizou-se o teste-t não pareado, todos a 5% de probabilidade de erro. Regressão linear foi utilizada para analisar a concentração de P4 vs o diâmetro do CL. No primeiro dia pós-ovulação, o diâmetro médio e desvio padrão do CL formado por ovulações simples foram de $26,22 \pm 4,44$ e de $22,08 \pm 2,67$ mm para os CL de ovulações duplas, não havendo diferença estatística entre esses valores ($p>0,05$). Os folículos que originaram as ovulações duplas tinham o diâmetro numericamente menor que os das ovulações simples ($34,63 \pm 1,65$ e $39,44 \pm 2,71$ mm, respectivamente), porém sem diferença estatística ($p>0,05$). Quando comparados dia-a-dia os diâmetros médios dos CL dos dois grupos, verificamos que essa diferença numérica se manteve até a última observação dos mesmos (Grupo 1: $12,25 \pm 2,5$ dias e Grupo 2: $10,33 \pm 1,75$ dias, $p>0,05$). Os CL formados tinham, portanto, 66,1% e 64,1% do tamanho do folículo pré ovulatório de simples e duplas ovulações, respectivamente ($p>0,05$), semelhante às observações em éguas que variam de 50 a 75% (Ginther, 1992; *Reproductive biology of the mare, 2nd ed., Equiservices, Cross Plaine*). Não houve diferença entre as comparações diárias dos valores médios de P4 plasmática (ng/ml) entre os Grupos 1 e 2, a despeito da presença de dois CL nas jumentas do Grupo 2, porém, os valores numéricos médios de P4 plasmática sempre foram superiores. Esses dados estão de acordo com as observações feitas na espécie equina, nas quais apesar da presença de dois CL o nível plasmático de P4 não é duas vezes maior que o das éguas com um CL (Ginther, 1992). Informações também corroboradas na espécie asinina por Meira *et al.* (*Biol. Reprod. Mono. 1, p.403-10 1995*). Observou-se o nível de platô da P4 plasmática entre os dias 6 e 14 pós ovulação em ambos os grupos, com valores médios e erro padrão da média, do Grupo 1 de $26,05 \pm 1,21$ ng/ml e do Grupo 2 de $30,23 \pm 1,05$ ng/ml, valores superiores aos níveis de P4 encontrados na égua, com a luteólise ocorrendo por volta do dia 17 (P4 <2 ng/ml). Foi observada correlação linear negativa entre a concentração de P4 e o diâmetro do CL tanto para ovulações simples (R= -0,86) como para duplas (R= -0,73). A partir desses dados concluí-se que a fisiologia da jumenta possui algumas particularidades que merecem estudos mais minuciosos.

Financiado parcialmente pela FUNDUNESP

EFEITO DO TRATAMENTO COM eFSH® SOBRE A FUNÇÃO LUTEAL DE ÉGUAS TRANSICIONAIS SUPEROVULADAS

Peres, K.R.¹; Fernandes, C.B.²; Oba, E.²; Alvarenga, M.A.²;
Landim-Alvarenga, F.C.²

¹Dep. Reprodução Animal – FMVZ/USP – São Paulo-SP, 05508-900, Brasil

² Dep.Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ/UNESP – Botucatu-SP, 18618-000,
Brasil krperes@usp.br

Recentemente, muitos progressos têm sido alcançado em relação à indução de múltiplas ovulações em éguas. Entretanto, pouco tem se discutido sobre as implicações hormonais de tais tratamentos. Diante disto, este trabalho teve por objetivo determinar a concentração sérica de progesterona de éguas, em fase transicional, submetidas ao tratamento com FSH equino purificado (eFSH® - Bioniche Animal Health Inc., Canadá). Vinte e seis éguas mestiças, de três a quinze anos, foram divididas de forma alternada em dois grupos (n=13/grupo) a partir do momento que elas adquiriram o primeiro folículo com diâmetro igual ou superior a 25 mm, sendo grupo 1 (controle) e grupo 2 (tratamento com administração intramuscular de 12,5 mg de eFSH®, duas vezes ao dia, até que metade dos folículos maiores que 30 mm adquirissem 35 mm de diâmetro). A indução da(s) ovulação(ões) foi realizada com a administração endovenosa de 2500 UI de hCG (Vetecor® - Laboratórios CALIER do Brasil Ltda, São Paulo). Sete a oito dias após a detecção das ovulações, realizou-se coleta de amostras de sangue por punção da jugular. As amostras foram centrifugadas e o soro foi armazenado a -16° C até que fosse realizada a análise laboratorial da concentração sérica de progesterona determinada por radioimunoensaio (Kit de progesterona Coat-A-Count – Diagnostic Products CO Medlab, São Paulo, SP). Foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson para se estudar a correlação entre o número de ovulações e a concentração sérica de progesterona. As éguas do grupo controle tiveram apenas uma ovulação e apresentaram uma concentração média de progesterona igual a $7,39 \pm 2,11$ ng/ml. Uma égua do grupo tratado também teve apenas uma ovulação e apresentou uma concentração similar ao apresentado no grupo controle (8,02 ng/ml). Contudo, as demais éguas do grupo tratado tiveram mais de uma ovulação, e a concentração de progesterona mostrou-se positivamente correlacionada com o número de ovulações ($p < 0,001$), como se segue: duas éguas tiveram duas ovulações e apresentaram uma concentração média de P_4 igual a $14,53 \pm 2,46$ ng/ml; três, tiveram quatro ovulações e uma concentração de P_4 igual a $18,44 \pm 2,57$ ng/ml; três éguas, tiveram cinco ovulações com concentração de P_4 igual a $24,38 \pm 11,03$ ng/ml e uma, teve seis ovulações e uma concentração igual a 44 ng/ml. Além destas, outras três éguas tiveram 10, 12 e 17 ovulações e concentrações de P_4 iguais a 24,9; 38,5 e 45 ng/ml, respectivamente. A detecção de altas concentrações de progesterona nas éguas submetidas ao tratamento e que tiveram múltiplas ovulações demonstram que os corpos lúteos são funcionais. Os altos níveis de progesterona presentes em éguas superovuladas podem estar ligados às baixas taxas de recuperação embrionária relatadas na literatura, devido a possível alteração do transporte dos ovócitos e/ou embriões no interior do oviduto.

Agradecimentos:

Bioniche Animal Health Inc., Canadá

Laboratórios CALIER do Brasil Ltda, São Paulo

EFEITO DA DESLORELINA E DO EXTRATO DE PITUTÁRIA EQUINA NA INDUÇÃO DA OVULAÇÃO EM ÉGUAS

Melo, C.M.; Papa, F.O.; Medeiros, A.S.L.; Dell'aqua, Jr, J.A.; Carmo, M.T.,
Araújo, G.H.M.; Alvarenga, M.A

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, UNESP Botucatu SP Brazil -
malvarenga@fmvz.unesp.br

A indução farmacológica da ovulação é um procedimento fundamental na maximização e sucesso dos diferentes protocolos com utilização do sêmen equino. Esta ferramenta tem sido amplamente utilizada nas inseminações com sêmen transportado, congelado e na sincronização para transferência de embriões. O hormônio mais comumente utilizado para este fim é o hCG (gonadotrofina coriônica humana), uma grande molécula glicoproteica, que quando utilizada em repedidas aplicações promove o desenvolvimento de anticorpos tornando-a ineficiente promotora da ovulação. Devido a grande utilização de algumas éguas como doadoras de embriões, fármacos alternativos têm sido desenvolvidos com o intuito de substituir o hCG como indutor de ovulação e ao mesmo tempo minimizar seus efeitos indesejados como promotor de anticorpos. O GnRH sintético a deslorelina e o extrato de pituitária equina (EPE), estão se apresentando como alternativas eficazes para desencadeamento da ovulação em tempo pré-determinado sem a ocorrência de formação de anticorpos, desta forma podendo ser utilizados em vários ciclos consecutivos. O objetivo deste trabalho foi verificar a eficiência do GnRH e do EPE em baixas concentrações como indutores da ovulação para inseminação. Sessenta e nove éguas, em estro apresentando folículos de 35 mm e presença de edema uterino foram utilizadas, e receberam 1 mg de deslorelina (IM) ou 10 mg de EPE (EV). Após 24 horas das aplicações eram examinadas por ultrasonografia e a partir deste momento o monitoramento era a cada seis horas até a confirmação da ovulação. Os resultados das ovulações foram agrupados em cinco categorias C1 ovulações até 24 horas pós-aplicação, C2 de 24 a 36 horas, C3 36 a 48 horas, C4 48 a 60 horas e C5 mais que 60 horas. A deslorelina apresentou as seguintes porcentagens por momentos avaliados C1 = 13,8%, C2 = 10,3%, C3 = 69,0%, C4 = 0% e C5 = 6,9% comparados ao EPE C1 = 17,5%, C2 = 45,0%, C3 = 35,0%, C4 = 2,5% e C5 = 0%. Em 6,9% (2/29) das éguas tratadas com deslorelina 1mg não responderam ao tratamento, e foram retiradas da análise da hora média de detecção da ovulação. O tempo médio da ovulação nos grupos deslorelina 1 mg e EPE 10 mg foram, respectivamente, $38,89 \pm 7,38^a$ e $34,75 \pm 6,72^b$ horas, sendo observada diferença estatística entre esses valores ($p < 0,05$). Com base nos resultados obtidos conclui-se que ambos indutores da ovulação sincronizam com grande eficácia o tempo da ovulação e o EPE adianta em aproximadamente 4 horas o momento da ovulação em relação a deslorelina sendo a dose 10 mg de EPE eficiente para indução da ovulação.

Agradecimentos: Purina

Apoio: FAPESP

PERFIL HORMONAL DE ÉGUAS SUPEROVULADAS COM FSH EQUÍNO PURIFICADO-RESULTADOS PARCIAIS

Machado, M.S.¹; Araújo, G.H.M.¹; Roser, J.F.²; Alvarenga, M.A.¹

¹Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária - UNESP-Botucatu/SP, 18618-000-Brasil - ²Animal Science, Endocrinology Laboratory, California University, Davis, USA.misima@bol.com.br

O extrato de pituitária equina (EPE) é o único composto capaz de induzir consistentemente ovulações múltiplas em éguas. Contudo, a despeito de uma boa resposta superovulatória, apresenta taxa de recuperação embrionária abaixo do esperado. Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram uma resposta superovulatória e recuperação embrionária mais satisfatórias quando usado o FSH equino purificado (Laboratório Bioniche-Canadá). Nosso trabalho tem como proposta avaliar o perfil endócrino de éguas tratadas com FSH equino purificado (Bioniche-Canadá) comparado com o grupo não tratado, bem como com o Extrato de Pituitária Equina (EPE). Foram utilizadas seis éguas em bom estado nutricional e reprodutivo e as mesmas éguas foram utilizadas em todos os grupos. GI (FSH equino purificado 12,5mg/IM, duas vezes ao dia) e GII (Controle). Essas éguas foram monitoradas diariamente por ultra-sonografia para a detecção da ovulação e o tratamento iniciado no sétimo dia pós-ovulação até quando a maioria dos folículos atingiu diâmetro de ≥ 35 mm, neste momento foi administrado 3000UI de hCG. As amostras de sangue para as dosagens de Estradiol, Inibina e Progesterona foram colhidas diariamente desde dois dias antes do início do tratamento até dois dias após a ovulação. As mensurações foram realizadas no Laboratório de Endocrinologia da Universidade da Califórnia, em Davis. Para a análise comparativa entre as concentrações dos hormônios esteróides (progesterona e estradiol) e do hormônio protéico inibina foi utilizado o teste t não pareado ($p \leq 0,05$). O perfil das concentrações plasmáticas de estradiol ao longo do tratamento apresentou-se semelhante ao do grupo controle, porém as concentrações do grupo tratado foram estatisticamente superiores ao controle nos dias -4, 0, 1 e 2 (dia 0=ovulação). As concentrações de inibina do grupo I (eFSH) apresentaram um aumento significativo a partir do -7 até o dia 2 em relação ao grupo controle, sendo que no dia da ovulação pode-se observar um pico nas dosagens desse hormônio. As concentrações plasmáticas de progesterona não apresentaram diferenças estatísticas entre os dois grupos avaliados durante o período de tratamento e ovulação, permanecendo baixas (menores a 1ng/ml) em ambos os grupos. O aumento das concentrações de estradiol observadas no grupo superovulado corresponde ao aumento do número de folículos pré-ovulatórios e demonstrando sua competência esteroidogênica. O aumento significativo das concentrações de inibina do grupo tratado em relação ao controle, observadas a partir do dia -7 pode estar relacionado com o aumento da população de folículos durante a onda, e o seu pico observado no dia da ovulação está relacionada ao número de ovulações, já que este hormônio aumenta durante a ovulação possivelmente em resposta ao extravasamento do fluido folicular para a cavidade abdominal. Os resultados parciais do presente estudo permite-nos concluir que os perfis endócrinos de Estradiol e Inibina em éguas superovuladas diferem do grupo controle proporcionalmente ao número de folículos, demonstrando que estes folículos são competentes quanto a capacidade de secretar inibina e estradiol. Este estudo está em evolução para a avaliação do perfil hormonal dos hormônios protéicos (FSH e LH) e destas mesmas éguas tratadas com EPE.

UTILIZAÇÃO DO EXTRATO DE PITUITARIA EQUINA COMO AGENTE INDUTOR DA OVULAÇÃO EM ÉGUAS.

Medeiros, A.S.L.; Silva Junior, B.L.; Melo, C.M.; Carmo, M.T.; Papa, F.O.; Puoli Filho, J.N.P.; Araujo, G.H.M.; Alvarenga, M.A.

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ/UNESP, Botucatu-SP, 18618-000, Brasil. malvarenga@fmvz.unesp.br

A utilização de drogas indutoras da ovulação no manejo reprodutivo de éguas tem um papel fundamental na otimização dos resultados de técnicas da reprodução como, inseminação artificial com sêmen refrigerado e transportado, sêmen congelado e programas de transferência de embriões. A gonadotrofina coriônica humana (hCG) é amplamente utilizada para este propósito, apresentando algumas vantagens como a concentração da maioria das ovulações em 48 horas após sua administração. Mas a despeito de suas vantagens o hCG apresenta a inconveniência de estimular a produção de anticorpos o que reduz sua eficiência após sucessivas injeções (Barbacini, et al.2000, *Equine Vet Edu*, 2:404-410). Pesquisadores franceses investigaram o extrato de pituitária equina para indução de ovulação de éguas como uma droga alternativa ao hCG e verificaram que as doses de 25 e 50mg foram eficientes para este propósito (Duchamp et al., 1987. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, v.35, p.221-8). Este trabalho objetivou comparar baixas doses do extrato de pituitária equina (EPE) como agente indutor de ovulação de éguas na estação de monta de 2004 e 2005. Utilizaram-se 25 éguas e um total de 97 ciclos dos quais 40 tiveram as ovulações induzidas com 10mg de EPE (T1) e 57 com 5mg (T2). Ao ser diagnosticado o estro, as éguas foram monitoradas uma vez ao dia por ultra-sonografia até os folículos alcançarem um diâmetro de 35mm, quando foram administradas pela via endovenosa as drogas referentes ao tratamento T1 e T2, a partir de então foram monitoradas a cada 12h até a ovulação. Foram avaliados os períodos de ovulação de 12 a 24h (P1), 24 a 36h (P2), 36 a 48h (P3) e 48 a 60h (P4). Dos ciclos que ovularam no período P1, 17,5%^a (7/40) foram do T1 e 3,5%^b (2/57) do T2, no período P2 ovularam 45 %^a (18/40) do tratamento T1 em comparação com 29,8%^b (17/57) do T2, no período P3 o T2 apresentou uma maior concentração das ovulações 66,7%^a (38/57) em comparação a 35%^b (14/40) do T1, no período P4 somente o tratamento T1 apresentou ovulações num percentual de 2,5% (1/40) dos ciclos avaliados. Em média, o tempo da detecção da ovulação do T1 e T2 foi de 34,75 ± 6,72^a e 37,54 ± 3,05 horas (p<0,05). Diante destes resultados demonstrou-se que ambas doses foram eficazes em induzir a ovulação no período de 48 horas, utilizando uma dose bem inferior a preconizada pela literatura, tornando-se uma alternativa como agente indutor de ovulação em programas onde se requer uma precisão deste processo, como a inseminação com sêmen congelado. Na maioria das éguas foram administradas mais de quatro vezes o EPE nesta estação e não se constatou uma diminuição de sua eficiência. Este fato decorrente da droga ser de origem homologa e conseqüentemente não estimular a formação de anticorpos.

Suporte financeiro: FAPESP

EFEITO DE BAIXAS DOSES DE EXTRATO DE PITUITÁRIA EQUINA E FSH PURIFICADO EQUINO NAS TAXAS DE OVULAÇÃO E RECUPERAÇÃO EMBRIONÁRIA EM ÉGUAS

Rocha Filho, A.N.¹; Lopes, E.P.²; Araujo, G.H.M.¹; Alvarenga, M.A.¹

¹Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ/UNESP, Botucatu-SP, 18618-000, Brasil. ²Haras Santa Esmeralda, Esmeraldas-MG, Brasil. arochavet@hotmail.com

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficácia de doses baixas de EPE e eFSH (Bioniche, Canadá) em aumentar as taxas de ovulação e recuperação embrionária em éguas. Doadoras de embrião da raça Mangalarga Marchador foram utilizadas de outubro a dezembro. Após uma colheita de embrião no dia 8 pós-ovulação, as éguas receberam uma injeção de dinoprost (7,5 mg/IM; Lutalyse, Pharmacia, Brasil) e foram alocadas em um de dois grupos experimentais: EPE (n=11) ou eFSH (n=14). Para todas as éguas estudaram-se dois intervalos entre uma colheita de embrião e a ovulação subsequente, sendo o primeiro o ciclo controle (sem tratamento) e o segundo o ciclo tratado. Em ambos os ciclos ultrasonografia transretal dos ovários e útero foi realizada diariamente. Durante o estro as éguas foram inseminadas a cada 48h com sêmen a fresco do mesmo garanhão e receberam hCG (2.500 UI/IV; Vetecor, Lab. Calier, Brasil) mediante a detecção de pelo menos um folículo com 35 a 40 mm de diâmetro. Os tratamentos consistiram em administração de EPE (4 mg/IM/s.i.d.; Grupo EPE) ou eFSH (5 mg/IM/s.i.d.; Grupo eFSH) do dia 8 (dia 0 = ovulação) até o dia anterior à indução das ovulações com hCG. As colheitas de embrião foram realizadas no oitavo dia pós-ovulação e sempre seguidas da administração de luteolítico. O percentual de éguas com mais de uma ovulação foi comparado pelo teste de Fischer e o número médio de ovulações e embriões pelo teste *t* pareado entre ciclos dentro do mesmo grupo ou pelo teste *t* não pareado entre grupos diferentes, a 5% de probabilidade de erro. Não houve diferença significativa no percentual de éguas com mais de uma ovulação entre os tratamentos EPE e eFSH (36,4% e 50,0%, respectivamente). Maior ($P<0,05$) número médio de ovulações e embriões recuperados foi observado no ciclo tratado com EPE em relação a seu controle ($1,36 \pm 0,5$ vs. $1,0 \pm 0,0$ e $1,18 \pm 0,6$ vs. $0,63 \pm 0,5$, respectivamente). O tratamento com eFSH resultou em maior ($P<0,05$) média de ovulações em comparação ao controle ($1,64 \pm 0,7$ vs. $1,0 \pm 0$), sem diferença significativa no número médio de embriões recuperados ($1,0 \pm 0,7$ e $0,78 \pm 0,4$, respectivamente). As taxas de recuperação embrionária em função do número de ovulações diferiram ($P<0,05$) entre os tratamentos EPE e eFSH (87,5% e 60,8%, respectivamente). No entanto, não houve diferença significativa entre os tratamentos EPE e eFSH no percentual de embriões recuperados por lavado (127,3% e 100%, respectivamente). Concluímos que a administração de baixas doses de EPE ou eFSH a éguas aumenta o número médio de ovulações no rebanho e possibilita a recuperação de um embrião em média por lavado, sendo necessário aperfeiçoar os protocolos para garantir que um maior percentual de indivíduos responda ao tratamento.

Agradecimentos: Lab. Bioniche e CAPES

EFEITO DA INDUÇÃO DA OVULAÇÃO COM GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA NOS NÍVEIS PLÁSMÁTICOS DE PROGESTERONA EM ÉGUAS NA FASE INICIAL DE DIESTRO

Araujo, G.H.M.¹; Dutra, F.O.²; Carmo, M.T.¹; Oba, E.¹; Alvarenga, M.A.¹

¹Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ/UNESP, Botucatu-SP, 18618-000, Brasil. ²Haras Estrela do Oriente - Três Rios-RJ, Brasil.

gustavoaraujo@veterinaria.com.br

O objetivo do presente experimento foi avaliar a interferência da indução da ovulação com hCG no aumento dos níveis plasmáticos de progesterona, para averiguar a possibilidade de se utilizar mais precocemente como receptoras de embriões éguas com ovulações induzidas. O experimento foi realizado durante a estação de monta 2003-2004, utilizaram-se 42 éguas da raça Mangalarga Marchador, sadias e em plena atividade reprodutiva, as éguas foram divididas em dois grupos: Grupo Controle (n=22), sem indução da ovulação; Grupo hCG (n=20), com a ovulação induzida com hCG (2500 UI, IV, Vetecor-Lab Calier -SP) quando detectada a presença de um folículo de 35 a 40 mm. Os animais de ambos os grupos foram avaliados por ultra-sonografia transretal diariamente até a detecção da ovulação, iniciando-se então a coleta diária de sangue (D0=ovulação) dos animais até o dia 3 pós-ovulação. As amostras de sangue foram centrifugadas e o plasma congelado para realização posterior das dosagens de progesterona plasmática por radioimunoensaio. A comparação dos níveis plasmáticos médios de progesterona dos diferentes dias de um mesmo grupo foi realizada por ANOVA e Tukey, e para comparar as diferenças diárias entre os dois grupos realizou-se o test-t não pareado, ambos com 5% de probabilidade de erro. Foi verificada diferença estatística ($p < 0,05$) dos valores médios de progesterona plasmática, com desvio padrão, entre os diferentes dias coletados (D0, D1, D2 e D3) dentro de cada grupo. Comparando-se diariamente o grupo controle e o hCG observamos os valores médios de progesterona (ng/ml) nos diferentes dias: D0 $0,33 \pm 0,055$ e $0,594 \pm 0,162$; D1 $1,001 \pm 0,12$ e $1,302 \pm 0,246$; D2 $2,348 \pm 0,243$ e $2,607 \pm 0,236$; D3 $4,115 \pm 0,413$ e $4,35 \pm 0,433$, não constatou-se diferenças estatísticas nos valores médios de progesterona entre os grupos. Observou-se uma diferença percentual entre os valores médios de progesterona no dia da ovulação de 80%, no D1 de 30%, no D2 de 11% e no D3 de 5,7%, demonstrando, numericamente, uma superioridade dos níveis plasmáticos de progesterona no grupo hCG, diferença esta que foi diminuindo ao longo dos dias até o D3. Apesar da observação de valores de progesterona numericamente superiores no momento da detecção da ovulação, concluímos que não há um incremento nos níveis plasmáticos de progesterona nas éguas tratadas com hCG que possa nos permitir utilizar essas éguas como receptoras de embriões mais precocemente que outras éguas não tratadas. A não manutenção da diferença inicial nos níveis plasmáticos de progesterona merece atenção, pois pode estar relacionada com a meia vida do hCG, observação que está sendo melhor estudada.

PERDA EMBRIONÁRIA PRECOCE EM ÉGUAS RECEPTORAS DE EMBRIÃO EM ANESTRO TRATADAS COM PROGESTERONA DE LONGA DURAÇÃO

Testa, A.C.¹; Carmo, M.T.²; Alvarenga, M.A.²

¹Médica Veterinária Autônoma, Nova Friburgo, RJ, Brasil, ²Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ - UNESP – Botucatu, SP, Brasil - testavet2004@yahoo.com.br

A utilização de éguas em anestro como receptoras de embrião permite um início mais precoce e um final mais tardio dos programas de TE em eqüinos, pois sabidamente receptoras entram em anestro mais precocemente e reiniciam a atividade ovariana mais tardiamente que as éguas doadoras. O uso de éguas não ciclantes tratadas com Progesterona de longa duração (P4 LA), vem sendo rotineiramente utilizado em programas de TE comercial no Brasil. Poucos estudos entretanto se preocuparam em verificar os índices de perda embrionária precoce (PEP) em receptoras tratadas com este protocolo. O presente trabalho objetivou comparar os índices de PEP após TE em éguas na ciclantes tratadas com progesterona de longa duração. Foi avaliado o percentual de perda precoce entre 15 e 50 dias de gestação de 34 receptoras sendo destas 20 ciclantes e 14 não ciclantes. Estas receptoras se encontravam alojadas em uma mesma propriedade, sendo os embriões provenientes de diferentes doadoras cobertas por um único garanhão. As éguas foram classificadas como estando em fase de inatividade reprodutiva sazonal, após realização de 2 exames ginecológicos por ultra-sonografia realizados com intervalo de 10 dias. As receptoras não ciclantes foram inicialmente tratadas uma vez ao dia, com doses decrescentes (5, 3, e 2mg) de Cipionato de Estradiol (ECP) IM, durante 3 dias consecutivos. No dia posterior a última aplicação de ECP iniciava-se o tratamento com 1.500 mg progesterona de longa duração IM (Laboratório BET, USA) somente nas receptoras que apresentavam na avaliação ultra-sonográfica um bom edema de útero. Embriões de 8 dias foram transferidos entre 4 e 6 dias após a primeira aplicação de P4 LA. Uma nova dose de P4 foi administrada nas receptoras 6 dias após a primeira administração. Em todas as éguas com gestação confirmada aos 12 dias de idade do embrião repetia-se a cada 7 dias o tratamento com P4 LA até que o feto completasse 120 dias. Das 14 éguas receptoras não ciclantes tratadas com P4 LA 2 (13%) perderam a gestação até os 50 dias, um índice de perda similar ($p>0,05$) foi observado nas éguas ciclantes onde 3 perdas entre 20 gestações foram observadas (15%). Concluímos que o uso de P4 LA, nas condições em que foi utilizado no presente experimento, foi seguro em manter as gestações de receptoras de embriões eqüinos.

COMPARAÇÃO ENTRE DOIS DIFERENTES MEIOS PARA TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM ÉGUAS DA RAÇA MANGALARGA MARCHADOR.

Caiado, J.R.C.¹; Fonseca, F.A.¹; Silva, J.F.S.¹; Fontes, R.S.¹

¹Universidade Estadual do Norte Fluminense-Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias.
Avenida Alberto Lamago-100. Campos dos Goytacazes-RJ. jrcaiado@hotmail.com

Diferentes tampões são utilizados nos meios de lavagem e manutenção embrionária durante os procedimentos de transferência de embriões em eqüinos. Os tampões carbonato, fosfato e Zwitteriônico são os mais usados. Durante os procedimentos de transferência é comum que o embrião permaneça por um tempo maior que o previsto, em espera no meio de manutenção utilizado. Este experimento foi realizado com o objetivo de comparar o custo benefício de dois meios contendo tampões diferentes DPBS (fosfato) e Embriocare (zwitteriônico), na transferência de embriões em éguas da raça Mangalarga Marchador. Os embriões foram divididos aleatoriamente em dois grupos: A (Zwitteriônico) e B (fosfato) permanecendo em descanso por diferentes períodos de tempo(0, 30, 60 ou 120 minutos) em ambos os grupos, em temperatura ambiente que variou de 28 a 35°C. O número de embriões foi assim distribuído: Grupo A (Zwitteriônico) P0 (15embriões), P30 (15 embriões), P60 (16 embriões), ou P120 (14 embriões).Grupo B (Fosfato) P0 (13 embriões), P30 (18 embriões), P60 (16 embriões), ou P120 (19 embriões). Os resultados indicaram que ambos são igualmente eficientes($P>0,05$), de acordo com o método de qui-quadrado, nos processos de rasteamento, lavagem, manutenção à temperatura entre 28 a 35°C por diferentes períodos de tempo (0 a 120 minutos) e inovulação de embriões em éguas da raça mangalarga marchador, em ambiente tropical, com taxas médias de prenhez de 65% e 69,7%, para os grupos A e B (zwitteriônico e fosfato, respectivamente). Como a aquisição do Embriocare foi mais onerosa, o DPBS apresentou o melhor custo benefício.

UTILIZAÇÃO DO hCG VISANDO MELHORIA DE ALGUMAS CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS DE ÉGUAS RECEPTORAS DE EMBRIÕES

Sousa, F.A.C.¹; Fleury, P.D.C.²; Alonso, M.A.²; Arruda, R.P.¹

¹ Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal - VRA/FMVZ/USP, Pirassununga-SP, 13630-000, Brasil. ² Central Fleury de Reprodução Equina, São José do Rio Pardo-SP, Brasil.
dr.fer@terra.com.br

O objetivo deste estudo foi avaliar o uso de hCG, sobre características reprodutivas de éguas receptoras de embriões. Foram utilizadas 84 receptoras da raça Mangalarga, entre 4 e 12 anos, divididas aleatoriamente em 3 grupos, com 28 animais cada, que receberam os seguintes tratamentos: (G1) 1ml de solução fisiológica, IM, quando o folículo dominante atingiu =35mm; (G2) 2500UI de hCG (Vetecor®, Calier, Barcelona, Espanha), IM, quando o folículo dominante atingiu =35mm e (G3) 2500UI de hCG, IM, no dia seguinte da ovulação (D1). Foram colhidas amostras de sangue nos dias D0, D2, D4, D6, D8, para dosagens de progesterona. Todas as receptoras foram avaliadas no D6 quanto as seguintes características reprodutivas: tônus uterino e cervical, avaliados por palpação retal recebendo escores de 1 (mínimo) a 4 (máximo), morfoecogenicidade uterina, visualizada pelo ultra-som, classificada por escores de 1 (mínimo/imagem homogênea) a 4 (máximo/imagem heterogênea) e do corpo lúteo, classificado em corpos lúteos de centro ecogênico e não ecogênico e ordem de escolha da receptora, que variou de 1º (melhor receptora) a 4º (pior receptora), classificadas subjetivamente baseadas nas avaliações acima citadas. Foi realizada a ANOVA e o teste de qui-quadrado, contidos no programa SAS. Foram encontradas diferenças estatísticas ($P \leq 0,05$) nas concentrações plasmáticas de P4 no D2 entre o G1 e G2, (3,86ng/mL e 5,65ng/mL, respectivamente) e no D4, onde todos os grupos diferiram entre si (G1:8,42ng/mL, G2:16,01ng/mL e G3:14,85ng/mL). Foi detectada diferença estatística entre os grupos para tônus uterino ($P \leq 0,05$), sendo que, o G3 apresentou uma baixa ocorrência do tônus 1 e alta do tônus 4. Em relação ao tônus cervical existiu diferença estatística ($P \leq 0,05$), apresentando uma alta frequência de tônus 1 no G1, de tônus 2 em G2 e tônus 4 em G3 e baixa frequência de tônus 2 em G3. Quanto a morfoecogenicidade uterina, o G1 apresentou alta ocorrência do escore 3 e baixa do escore 2; já no G3 ocorreu baixa do escore 3, apresentando diferenças estatísticas ($P \leq 0,05$) entre eles. Não foram observadas diferenças estatísticas na morfoecogenicidade do corpo lúteo entre os grupos ($P > 0,05$). Houve diferença na ordem de escolha da receptora entre os grupos ($P \leq 0,05$), sendo que foi observado baixo número de éguas de 1º escolha no G1 e de 4º escolha no G3 e alto número de éguas de 4º escolha no G1, de 2º escolha no G2 e de 1º escolha no G3. Conclui-se que o tratamento com hCG em receptoras de embriões com folículos pré-ovulatórios (≥ 35 mm), ou no D1, melhora as características reprodutivas, portanto disponibilizando um número maior de fêmeas aptas à receber embrião.

Agradecimento: à FAPESP.

ESCORE NA BIÓPSIA ENDOMETRIAL E APTIDÃO REPRODUTIVA EM ÉGUAS RECEPTORAS DE EMBRIÃO-RESULTADOS PARCIAIS

Losinno, L.; Alonso, C.; Castaneira, C.

Cátedra de Producción Equina, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, (5800) Río Cuarto, Argentina. llosinno@ayv.unrc.edu.ar

Nas últimas décadas a eficiência reprodutiva de tem melhorado com o emprego da transferência de embriões e outras biotecnologias, na maioria das vezes com uso de receptoras para embriões de doadoras valiosas. Sabidamente a receptora é um dos mais importantes fatores envolvidos no sucesso de programas comerciais de transferência de embriões em equinos. Este estudo tem por objetivo correlacionar o escore endometrial com a idade em éguas selecionadas para serem receptoras. Nos testamos a hipótese de que o exame clínico rotineiramente utilizados para selecionar receptoras em programas de transferência de embriões não é o melhor indicador de aptidão reprodutiva. Foram avaliadas setenta e cinco biopsias endometriais de receptoras selecionadas em um centro comercial de transferência de embriões localizado na Argentina. Todas as éguas foram submetidas aos exames clínico de rotina do trato reprodutivo, incluindo: idade, escore corporal, ausência de sinais de doença sistêmica, palpação retal, e ultra-sonografia do aparelho reprodutor. Dois Veterinários de nosso laboratório, em um experimento duplo cego, classificaram as amostras de biópsia endometrial de acordo com a classificação de Kenney & Doig (1986). Os escores de biópsia endometrial foram comparados entre as diferentes idades utilizando CATMOD (SAS). Os resultados foram demonstrados em faixas etárias e seu correspondente escore endometrial (%): 2–4 anos (n=9), I(55,5), IIa(22,2), IIb(11,1), III(11,1); 5–7 anos (n=14), I(35,7), IIa(50), IIb(14,3), III(0); 8–10 anos (n=32), I(31,2), IIa(25), IIb(37,5), III(6,2); 11–13 anos (n=4), I(0), IIa(50), IIb(25), III(25); 14–16 anos (n=10), I(10), IIa(20), IIb(50), III(20); 17–19 anos (n=6), I(0), IIa(16,6), IIb(50), III(33,3). Quando os resultados foram demonstrados em duas faixas etárias: Group A: <14 anos (n=59) and Group B: ≥ 14 anos (n=16) o escore de biópsia endometrial dos grupos foi respectivamente (%): I(33,9 and 6,5), IIa (33,9 and 18,5), IIb (27,1 and 50), III (5,1 and 25). Sugerindo estes dados, de acordo com trabalhos anteriores, que existe uma correlação entre escore endometrial e idade. Considerando-se as alterações degenerativas endometriais e sua correlação com baixa performance reprodutiva em éguas, éguas classificadas nos escores II b e III não devem ser utilizadas como receptoras em um programa de transferência de embriões, independente da idade e avaliação clínica. O percentual de éguas no grupo “jovem” classificadas nos escores IIb e III foi significativamente menor do que no grupo das éguas idosas (32,2 vs. 75 %; $p < 0,05$) contudo este percentual certamente levará a um impacto econômico negativo importante. Ou seja, 32% das éguas com menos de 10 anos de idade as quais foram aprovadas como receptoras pelas avaliações usuais, tem suas chances de manter uma gestação á termo bastante comprometida. Baseados nos resultados preliminares deste estudo nós podemos concluir que éguas com mais de 14 anos de idade não devem ser utilizadas como receptoras de embrião e que éguas com menos de 14 anos devem ser submetidas por um exame ginecológico completo que inclua a biópsia endometrial antes de serem utilizadas como receptoras de embrião.

EFEITO DO SÊMEN REFRIGERADO SOBRE A TAXA DE RECUPERAÇÃO EMBRIONÁRIA EM EQÜINOS

Duarte, M.B.¹; Vieira, R.C.²

¹Médico Veterinário, Mestre, Pça das Rosas 80, Uberaba; Brasil. ²Departamento de Produção Animal, UFU, Uberlândia; Brasil. mb.duarte@terra.com.br

O uso de sêmen refrigerado é uma das alternativas para ampliar as opções de acasalamento na transferência de embriões em eqüinos. O presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito do sêmen refrigerado na taxa de recuperação embrionária em eqüinos. Foram utilizadas 187 doadoras das raças Quarto de Milha e Paint horse, com idades entre 2 e 25 anos, durante as estações de monta de 2001/2002 a 2004/2005. Monitoraram-se os ovários por ultra-sonografia a partir do início do cio, sendo que a partir da presença de folículos ≥ 35 mm com moderado edema uterino as éguas foram separadas em dois grupos. No Grupo I estas foram inseminadas com sêmen à fresco contendo a dose inseminante aproximadamente $1,0 \times 10^9$ espermatozóides móveis a cada 48 horas até ocorrência da ovulação. No Grupo II as éguas receberam 2000 ui de hCG IV e inseminadas uma única vez 24 horas após com sêmen refrigerado contendo a dose inseminante no mínimo 1×10^9 espermatozóides totais. O sêmen foi diluído a base de leite desnatado (Kenney) e mantido em caixas de isopor (Max-sêmen*) à temperatura de 18°C. As inseminações foram realizadas entre 12 a 24 horas pós-colheita. Efetuaram-se as colheitas de embrião no oitavo dia pós-ovulação, no estágio de blastocisto expandido, utilizando a solução de Ringer lactate. Foram efetuadas 971 lavagens uterinas, compreendendo 886 no Grupo I e 85 no Grupo II. Foram recuperados 671 embriões, sendo 626 (70,6%) para o Grupo I e 45 (52,9%) para o Grupo II. Os resultados foram submetidos ao teste qui-quadrado. A taxa de recuperação embrionária utilizando-se sêmen fresco foi maior ($P < 0,05$) comparativamente ao uso do sêmen refrigerado (70,6% e 52,9% para os Grupos I e II, respectivamente).

*EHG Agrofarma, SP, Brasil.

Palavras-chave: Eqüino, sêmen refrigerado, recuperação embrionária.

EFEITO DA IDADE DA DOADORA SOBRE A TAXA DE RECUPERAÇÃO EMBRIONÁRIA EM EQUÍNOS

Duarte, M. B.¹; Vieira, R. C.²

¹Médico Veterinário, Mestre, Pça das Rosas 80, Uberaba; Brasil.

²Departamento de Produção Animal, UFU, Uberlândia; Brasil. mb.duarte@terra.com.br

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da idade das doadoras na taxa de recuperação embrionária em equínos. Foram utilizadas 152 doadoras das raças Quarto de Milha e Paint Horse, com idades variadas, durante as estações de monta de 2001/2002 a 2004/2005. Monitoraram-se os ovários por ultra-sonografia a partir do início do cio. Uma vez constatada a presença de um folículo ≥ 35 mm, as éguas foram inseminadas com sêmen fresco a cada 48 horas, até a ocorrência da ovulação, contendo a dose inseminante aproximadamente 1×10^9 espermatozoides móveis. Em função da idade as éguas foram alocadas em três diferentes grupos, ou seja, Grupo I de dois a quatro anos de idade, Grupo II de quatro a 16 e Grupo III acima de 16 anos. Efetuaram-se as colheitas dos embriões no oitavo dia pós-ovulação, no estágio de blastocisto expandido. Executaram-se até seis lavagens uterinas com solução de Ringer lactato, utilizando-se infusões sucessivas de 500 ml para o Grupo I e 1000 ml para os Grupos II e III, até a recuperação do embrião. Foram realizadas um total de 886 lavagens uterinas, sendo 85 no Grupo I, 653 no Grupo II e 148 no Grupo III. Foram recuperados 626 embriões (70,6%), sendo 69 (81,1%) no Grupo I, 478 (73,2%) no Grupo II e 79 (53,3%) no Grupo III. Os resultados foram submetidos ao teste qui-quadrado. A taxa de recuperação embrionária nos Grupos I e II foi maior ($P < 0,05$) comparativamente aos animais do Grupo III (81,1% e 73,2% versus 53,3% para os Grupos I, II e III respectivamente).

Palavras-chave: Equino, idade, recuperação embrionária.

EFEITO DA IDADE DA ÉGUA DOADORA NA TAXA DE PERDA EMBRIONÁRIA

Alonso, M.A.¹; Fleury, P.D.C.¹; Neves Neto, J.R.¹; Machado, M.S.²

¹Fleury Reprodução Equina – São Jose do Rio Pardo- SP, 13720-000, Brasil.²Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária - UNESP-Botucatu/SP, 18618-000-Brasil
gualonso@gmail.com

Éguas idosas constituem uma grande parte do contingente de doadoras em um programa de transferência de embriões, principalmente por estes animais já apresentarem uma progênie comprovada ou terem obtido bons resultados na carreira esportiva. As informações a respeito da perda de gestações, obtidas a partir de embriões provindos de éguas idosas, são conflitantes. Por este motivo, este trabalho objetivou a avaliação da taxa de perda embrionária, comparando doadoras jovens e idosas. Utilizou-se dados das estações de monta de 2002/2003, 2003/2004 e 2004/2005, do programa do programa de transferência de embriões comercial da Central Fleury Reprodução Equina. As doadoras utilizadas eram das raças Mangalarga Paulista, Mangalarga Marchador, Árabe, Puro Sangue Inglês de pólo e Campolina. As idades variaram entre 2 e 26 anos. Os embriões foram coletados de forma não cirúrgica nos dias 6 a 9 pós ovulação. Os embriões foram transferidos imediatamente ou mantidos entre 15 a 18° C por até 24 hs. A transferência do embrião foi realizada pela forma não cirúrgica. As receptoras eram Mangalarga Paulista ou mestiças, entre 3 e 14 anos, paridas ou solteiras. Os embriões foram transferidos em éguas entre 3 e 9 dias pos ovulação. A gestação era inicialmente detectada através de ultrassonografia entre os dias 13 e 16 da ovulação da doadora e a confirmação era realizada no dia 40 de gestação. Foram utilizados 453 embriões. Os grupos de doadoras foram separados da seguinte forma: Grupo I, éguas de 2 a 17 anos e Grupo II, éguas com 18 ou mais anos. Para o GI, tivemos 408 embriões, enquanto que para o GII foram 45 embriões, provindos de 27 diferentes doadoras. Para a análise comparativa dos dados foi utilizado o teste Qui-Quadrado. Os resultados obtidos para as perdas embrionárias foram para o GI de 12,5% e para o GII de 13,2%. Não houve diferença estatística entre os grupos, e os valores encontrados estão de acordo com a literatura em programas comerciais de transferência de embriões. Embora não tenha sido considerada a variável receptora, idade ou diâmetro dos embriões e sincronia da ovulação, os resultados obtidos indicam que éguas receptoras que receberam embriões oriundos de doadoras idosas ou jovens apresentam probabilidade similar de ocorrência de perda embrionária até aos 40 dias de gestação.

**TAXA DE GESTAÇÃO APÓS TRANSFERENCI NÃO CIRÚRGICA DE EMBRIÕES
EQÜINOS MANTIDOS EM MEIO EMCARE OU VIGRO
POR 18 HORAS ENTRE 15 E 20°C**

Fleury, P.D.C.¹; Neves Neto, J.R.¹; Alonso, M.A.¹; Squires, E.L.²

¹ Fleury Reprodução Equina – São José do Rio Pardo- SP, 13720-000, Brasil. ²Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory Colorado State University, Fort Collins, CO 80523, USA.

fleury@rantac.com.br

Embriões podem ser coletados e enviados a 5°C ou 15 a 20°C, por 24 horas, para o local onde se encontra a receptora. Os meios de manutenção utilizados para embrião tem sido o Ham's F10, Vigro ou Emcare. Poucos estudos foram feitos visando comparar a viabilidade de embriões após a manutenção nos diferentes meios por períodos maiores do que 12 horas. O objetivo deste estudo foi comparar as taxas de gestação após a transferência não cirúrgica de embriões que foram mantidos nos meios de manutenção Vigro ou EmCare por 18hs entre 15 e 20°C. As doadoras eram de diferentes raças, com idade entre 3 e 26 anos, mantidas em diferentes haras e na central Fleury Reprodução Equina. Os embriões foram coletados de forma não cirúrgica 7 ou 8 dias após a ovulação. Após a identificação do embrião, seu tamanho, desenvolvimento e qualidade eram avaliados. Apenas embriões de grau I foram utilizados no experimento. Os embriões eram lavados, transferindo-os seqüencialmente entre, no mínimo, 10 gotas de 1 ml de meio de manutenção Vigro (Bioniche Animal Health, Athens, GA) ou EmCare (Professional Embryo Transfer Supply, Irving, TX) em uma placa de Petri. Os embriões eram então colocados em um tubo de transporte de 5 ml contendo 4 ml do mesmo meio utilizado na lavagem. A caixa plástica onde eles eram mantidos continha um bloco de gelo reciclável coberto por jornal, com mais duas folhas de jornal por cima. O tubo contendo o embrião era envolto em duas folhas de papel e colocado em cima do jornal. Os embriões eram mantidos por 18 horas antes da transferência para receptoras de diferentes raças com idade de 3 a 14 anos, que estavam entre 3 e 9 dias após a ovulação. As receptoras foram mantidas na central Fleury Reprodução Equina. O diagnóstico de gestação foi realizado por meio da ultra-sonografia entre 14 e 16 dias após a ovulação da égua doadora. Os dados foram analisados usando o teste Qui-Quadrado. As taxas de gestação foram similares para os embriões mantidos no EmCare (15/22, 68%) e aquele mantidos em Vigro (18/21, 86%). Os resultados permitem concluir que os dois meios de manutenção são eficientes para manter a viabilidade embrionária por 18 horas antes da transferência. Apesar de embriões a fresco não terem sido incluídos, as taxas de gestação são semelhantes às reportadas após transferência de embriões a fresco.

PRIMEIRO NASCIMENTO DE DOIS PRODUTOS ORIUNDOS DE BIPARTIÇÃO DE EMBRIÃO EQUINO NA AMÉRICA LATINA

Silveira, L.L.^{1,2}; Pimentel, C.M.¹; Melo, N.S.S.¹; Souza, R.V.²; Rumpf, R.²

¹ Universidade de Brasília-UnB/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária-FAV, 70910-900 Brasília-DF, Brasil; ² Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica, 70770-900 Brasília-DF, Brasil. silveiraleoluz@yahoo.com.br

Nasceram as duas primeiras potras obtidas através da técnica de bipartição embrionária na América Latina, no Campo Experimental Sucupira – CES da Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF. Estas foram chamadas de Branca e Neve em alusão a pelagem e ao famoso conto Branca de Neve e os Sete Anões. Branca nasceu no dia 23 de dezembro de 2004 e Neve no dia 4 de janeiro de 2005, pesando 52 e 54 kilos respectivamente. As gêmeas idênticas foram geradas em úteros distintos, desenvolvidas a partir de um único embrião, dividido em duas partes iguais, que foram transferidas para duas éguas receptoras. A técnica de bipartição de embriões representa uma vitória para o país, tanto do ponto de vista comercial, como de preservação, pois permite aumentar o número de descendentes de um animal de alta qualidade com mais rapidez e eficiência. Essa técnica é especialmente importante para equinos, podendo utilizá-la em conjunto com a superovulação, bem como em embriões congelados, portanto, a bipartição de embriões pode se tornar uma alternativa viável para aumentar o número de potros por doadora/ano. Também é interessante o uso de gêmeos idênticos em experimentos na área de imunologia e farmacologia, bem como, em estudos para avaliar a influência do ambiente no desempenho dos mesmos.

ESTUDO GINECOLÓGICO DE FÊMEAS BOVINAS DESTINADAS A PROGRAMA DE INSEMINAÇÃO E RECEPTORAS DE EMBRIÕES: ACHADOS PRELIMINARES

Del Rei, A.J.¹; Bartolomeu, C.C.²; Neves, A.L.A.¹; Balbino, S.C.¹; Ferraz, P.C.¹

¹Centro Biotecnológico de Reprodução Animal, CBRA, DTRA, UESB - Itapetinga-BA, 45-700-000, Brasil, ²DCAA,CMV-UESC delrei@uesb.br

Com o objetivo de determinar a prevalência das várias apresentações morfofisiológicas de ovários de fêmeas bovinas para estabelecimento de um critério de seleção das fêmeas, por meio do “status” ovariano para emprego em programas de IA e receptoras de embriões em TE, foram examinadas 10.578 fêmeas de diferentes grupamentos genéticos (corte, leite e seus mestiços) criadas a campo em diferentes regiões do sudoeste e sul da Bahia no período de 2001 a 2004. Os exames foram realizados através da palpação retal. Os ovários foram classificados pelo tamanho, consistência, morfologia e aspecto, sendo estratificados em 16 combinações. Os resultados foram distribuídos em frequências e porcentagens, nas categorias estabelecidas para este estudo. Do total de fêmeas avaliadas, 6.040 / 10.578; (57,1%) apresentaram-se gestantes e 4.538 / 10.578; (42,9%) não gestantes. Do grupo de fêmeas não gestante foram amostradas ao acaso 1.101 (24%) sem anomalias aparente no útero e ovários, perfazendo um total de 2.202 ovários avaliados. Os ovários foram classificados em volumoso (vol), pequeno (peq), macio (mac), duro (dur), arredondado (arr), achatado (ach), liso (lis) e rugoso (rug). A partir dos resultados, foram estabelecidas as possíveis combinações: vol, mac,arr,rug (571 / 25,9%); vol, mac, arr e lis (295 / 13,4%); vol,mac, ach e lis (230 / 10,4%); vol, dur, arr e lis (210/9,5%); vol, dur, ach e lis (159 / 7,2%); vol, dur, ach e rug (120 / 5,4%); vol, mac, ach e rug (96 / 4,4%); vol, dur, arr e rug (53 / 2,4%); peq, mac, arr e lis (90 / 4,1%); peq, dur, arr e lis (87 / 3,9%); peq, mac, ach e lis (73 / 3,3%); peq, mac, arr e rug (27 / 1,2%); peq, dur, ach e lis (38 / 1,7%); peq, dur, ach e rug (57 / 2,6%); peq, mac, ach e rug (42 / 1,9%) e peq, dur, arr e rug(54 / 2,5%). A partir dos achados, em um segundo momento, irá se estabelecer dentre as várias combinações quais apresentarão melhores resultados nos programas de IA e como receptoras de embriões.

DIMENSÕES E NUMERO MÉDIO DE ESTRUTURAS NOS OVÁRIOS DE DOADORAS NULÍPARAS, *Bos indicus* DA RAÇA GIR E *Bos taurus* DA RAÇA HOLANDESA

Ferreira, M.B.D.¹; Lopes, B.C.²; Souza, J.C.³; Azevedo, N.A.⁴; Ordones, F.⁴

¹Pesquisador da EPAMIG – Centro Tecnológico do Triângulo e Alto Paranaíba CxP 351 - 38001970 – Uberaba, MG, brandao@epamiguberaba.com.br; ²DSc., MSc., Médica Veterinária – Prof. Dep. de Zootecnia - FAZU, biabrand@uai.com.br; ³Professor adjunto – Departamento de Zootecnia da UFLA, jcamisao@ufla.br; ⁴Médico Veterinário, Autônomo.

O presente estudo foi realizado durante o ano de 2003 na EPAMIG, Sete Lagoas MG. Objetivou-se a avaliação das dimensões e do número médio de estruturas presentes nos ovários de novilhas das raças Gir e Holandesas, no início do programa de superovulação. As análises foram realizadas entre o 8º e 12º dia do ciclo, no dia do cio da doadora e no dia da coleta de embriões. Utilizaram-se 22 novilhas Gir, de 33,63±4,46 meses e 16 Holandesas com 22,27±3,68, sincronizadas com 500 µg de Cloprostenol IM, em doses intervaladas de 11 dias. As novilhas Gir receberam no total 100 UI de FSH (Pluset®), por quatro dias consecutivos, em doses intramusculares decrescentes, intervaladas de 12 horas, e as Holandesas 200 UI. Todas as novilhas foram re-sincronizadas para 2ª e 3ª coleta. Os ovários foram mensurados pela ultra-sonografia para os parâmetros comprimento, largura e área, bem como medidos os folículos ≥ 3 e ≥ 7 mm, os folículos não ovulados e corpos lúteos. As médias foram comparadas pelo teste de T. O diâmetro do ovário direito (cm) no dia do início da superovulação foi 3,03±0,57 e 3,55±0,81; no dia do cio 3,43±0,74 e 3,98±0,74; no dia da coleta de 4,02±1,04 e 4,59±1,43 para as raças Gir e Holandesa respectivamente. A área do ovário direito (cm²) no dia do início da superovulação foi de 2,38±0,55 e 2,33±0,56; no dia do cio 2,70±0,91 e 2,86±0,55 e no dia da coleta de 2,99±0,92 e 2,96±0,70 para as novilhas Gir e Holandesa respectivamente. O diâmetro do ovário esquerdo no início da superovulação foi 2,59±0,48 e 2,90±0,88; no dia do cio 2,75±0,49 e 3,23±0,92; no dia da coleta de 3,90±1,24 e 3,73±1,42 e a área do ovário esquerdo no dia do início da superovulação 1,94±0,31 e 2,03±0,47; no dia do cio 2,55±0,40 e 2,34±0,72 e no dia da coleta 2,81±0,85 e 2,43±0,81 para as raças Gir e Holandesa respectivamente. O diâmetro dos corpos lúteos (CL)(cm) foi de 2,07 ± 0,58 e 2,35 ± 0,36; o diâmetro da cavidade luteal (cm) de 0,58 ± 0,36 e 0,83 ± 0,40; a percentagem de CL com cavidades de 16,6 e 22,2%; a área do corpo lúteo (cm²) no dia do início da superovulação de 2,99±0,54 e 4,21±1,30 e CL palpáveis no dia da coleta de 6,41±5,72 e 6,00±4,16 para as raças Gir e Holandesa respectivamente. A soma do número de folículos acima de 3 mm no dia do início da superovulação foi de 14,07±5,80 e 9,60±4,46 e no dia do cio de 13,42±6,16 e 13,90±9,2 para as raças Gir e Holandesa respectivamente. A soma do número de folículos acima de 7 mm no dia do início da superovulação foi de 3,69±3,77 e 3,20±1,42 e no dia do cio da doadora de 9,57±3,90 e 13,45±9,6 e a soma do número de folículos não ovulados no dia da coleta foi de 2,25±2,59 e 2,90±2,51 para as raças Gir e Holandesa, respectivamente. O número médio de estruturas recuperadas na coleta dos embriões foi de 6,21±4,32, das quais 3,57±3,08 eram viáveis para ambas as raças. Para a raça Gir o número médio de estruturas recuperadas foi de 6,97±4,23, das quais 3,39±3,14 viáveis. Com exceção da área do CL todas as medidas foram semelhantes entre as raças. Concluiu-se que o FSH usado estimulou de maneira satisfatória e similar os ovários das novilhas tanto da raça Gir como Holandesa.

Palavra chave: novilha, superovulação, embriões, folículos, corpo lúteo.

CAPACIDADE OVULATÓRIA EM NOVILHAS *Bos indicus*

Gimenes, L.U.¹; Carvalho, N.A.T.¹; Sá Filho, M.F.¹; Santiago, L.L.¹; Carvalho, J.B.P.²;
Mapletoft, R.J.³; Barros, C.M.⁴; Baruselli, P.S.¹

¹Departamento de Reprodução Animal, FMVZ – USP, SP, CEP 05508-000, Brasil; ²Pólo Regional de Pindamonhangaba (APTA), SP, Brasil; ³Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan, Canadá; ⁴Departamento de Farmacologia, IBB – UNESP – Botucatu, SP, Brasil.
ligimenes@usp.br e barusell@usp.br

Em vacas Holandesas a capacidade ovulatória é adquirida quando o folículo atinge diâmetro ao redor de 10mm, cerca de 1,5mm após a divergência folicular (Sartori et al., Biol. Reprod., v.65, p.1403-09, 2001). O objetivo do presente estudo foi avaliar o diâmetro no qual o folículo dominante de novilhas *Bos indicus* atinge a capacidade ovulatória após o tratamento com LH. Para tanto, foram utilizadas 29 novilhas *Bos indicus* cíclicas, mantidas a pasto, com peso e idade acima de 350kg e 24 meses, respectivamente. Os animais foram previamente sincronizados, com protocolo hormonal à base de progestágeno e benzoato de estradiol. Após as ovulações (Dia 0), os folículos foram monitorados por ultra-sonografia a cada 24h, até que fossem alcançados os diâmetros de 7-8,4mm (n=9); 8,5-10mm (n=10) e >10 mm (n=10). Para a verificação da capacidade ovulatória, os animais foram tratados com 25mg de LH (Lutropin-V[®], Bioniche, Canadá). A partir do tratamento os animais foram monitorados por ultra-sonografia a cada 12h durante 48h. Para a análise estatística foram utilizados os testes Anova, Bartlett e Qui-quadrado. O diâmetro folicular médio (média±EPM) no momento da aplicação do LH foi de 0,76^a±0,01cm para o grupo 7-8,4; de 0,96^b±0,01cm para o grupo 8,5-10 e de 1,09^c±0,02cm para o grupo >10 (P<0.05). A taxa de ovulação após o tratamento com LH foi de: 33,3%^a (3/9); 80,0%^b (8/10) e 90,0%^b (9/10; P<0,05) para os grupos 7-8,4; 8,5-10 e >10mm, respectivamente. O momento de ovulação foi de 38,0±4,0h; 31,5±2,7h e 30,0±2,0h (P>0,05) para os mesmos grupos, respectivamente. Conclui-se que em novilhas *Bos indicus* a aquisição de capacidade ovulatória aumenta após os folículos atingirem diâmetro de 8,5-10 mm, diâmetro inferior ao observado na raça Holandesa (*Bos taurus*).

Agradecimentos: Bioniche/Tecnopec

ESTUDO ULTRA-SONOGRÁFICO DA DIVERGÊNCIA FOLICULAR EM NOVILHAS NELORE (*Bos indicus*)

Gimenes, L.U.¹; Sá Filho, M.F.¹; Madureira, E.H.¹; Trinca, L.A.²;
Barros, C.M.²; Baruselli, P.S.¹

¹Departamento de Reprodução Animal, FMVZ – USP, SP, CEP 05508-000; ²Departamento de Farmacologia e Bioestatística, IBB – UNESP – Botucatu, SP. ligimenes@usp.br e barusell@usp.br

Em bovinos, os folículos ovarianos apresentam um padrão de crescimento em forma de ondas, nas quais um grupo de folículos emergem e, em um determinado momento, um se destaca aumentando o crescimento e se tornando dominante. Neste estudo avaliou-se o diâmetro folicular (\emptyset) e o momento (MDIV) relacionados à divergência dos folículos durante a primeira onda em novilhas Nelore. Foram utilizadas 13 novilhas cíclicas, mantidas a pasto, com peso acima de 325 kg e idades entre 20 a 24 meses. Em dia aleatório do ciclo estral, os animais foram tratados com 2mg de benzoato de estradiol (BE) i.m. (Estrogin[®], Farmavet, Brasil) e um implante auricular de Norgestomet (Crestar[®], Intervet, Brasil). Oito dias após, os implantes foram removidos e administrou-se 0,15mg de d-cloprostenol i.m. (Preloban[®], Intervet, Brasil). Vinte e quatro horas após a retirada dos implantes, as fêmeas receberam 1mg de BE i.m.. A partir da retirada do implante, as novilhas foram avaliadas por ultra-sonografia transretal (Aloka SSD-500, Japão) a cada 12h até o sexto dia do ciclo estral (Dia 0 - Dia da ovulação) para verificar o momento da ovulação, o MDIV e o \emptyset na divergência folicular. Os ovários foram mapeados, registrando-se o diâmetro dos três maiores folículos ovarianos. Retrospectivamente foram determinados os dois maiores folículos, sendo classificados como folículo dominante (FD) e subordinado (FS). Definiu-se o MDIV como o primeiro exame no qual o crescimento do FD foi superior ao do FS (Ginther, Biol.Reprod., v.65, p.638, 2001). Após definido o MDIV, foram determinados o \emptyset do FD e do FS. O momento da divergência folicular ocorreu $64,6 \pm 5,5$ horas após a ovulação e os diâmetros do folículo dominante e do maior subordinado foram de $0,62 \pm 0,02$ e de $0,58 \pm 0,02$ (cm), respectivamente.

**EFICIENCIA DA INSEMINAÇÃO EM TEMPO FIXO COM PROGESTERONA
INTRAVAGINAL NA TAXA DE PREENHEZ EM BUFALAS CRIADAS EM DIFERENTES
SISTEMA DE PRODUÇÃO NA AMAZÔNIA**

Ribeiro, H.F.L.¹; Picanço, N.S.; Rolim Filho, S.T.; Pinho, R.O.; Araújo, C.V.; Vale, W.G.

¹Setor de Reprodução Animal, ISPA / UFRA. Belém-PA, Brasil - haroldo.ribeiro@ufra.edu.br

O sistema extensivo de criação de búfalos na Amazônia é responsável por um prolongado anestro após o parto, fator dos mais importantes na ineficiência reprodutiva na bubalinocultura regional. O objetivo foi aumentar a taxa de prenhez usando esteróides nos protocolos de inseminação artificial em tempo fixo, em búfalas criadas de forma semi-extensiva, (experimento I), e extensiva (experimento II) respectivamente. No experimento I, com 29 búfalas. O grupo 1(G1) com 14 fêmeas, no dia zero, recebeu um dispositivo vaginal com 1,0g de progesterona (Cronipres[®]) e mais 2ml intra-muscular (IM) de Benzoato de estradiol (BE) (Estrogin[®]), após 9 dias, na retirada do dispositivo, foi aplicado em dose reduzida 1ml/7,5mg (intra-submucosa-vulvar) de PGF2 α (Croniben[®]) e no dia 10 foi aplicado 1ml (IM) de BE. A inseminação, foi realizada 24h após a segunda dose de estrógeno. O grupo 2 (G2), com 15 fêmeas, recebeu o mesmo tratamento do grupo I, com exceção da progesterona. No experimento II, com 49 búfalas. O grupo 1 (G1) com 29 fêmeas, no dia zero recebeu um vaginal com 1,0g de progesterona (Cronipres[®]), associado a 1ml/100 μ g (IM) de gonadorelina. Após 7 dias, o Cronipres[®] foi retirado, associado à aplicação de 2ml/7,5mg (IM) de PGF2 α e no nono dia, 1ml/100 μ g (IM) de gonadorelina, sendo realizada a inseminação, 16hs após a segunda dose de gonadorelina. No grupo 2 (G2) com 20 fêmeas foi usado o ovsynch. As taxas de prenhez foram analisadas pelo teste de Qui-quadrado. No experimento I, a taxa de prenhez foi de 71,35% no G1 e de 59,75%, no G2, respectivamente, sem diferença ($p>0,05$), significativa. No experimento II, a taxa de prenhez no G1 foi de 65,5% e no G2 foi de 60%, também não houve diferença significativa entre os tratamentos ($p>0,05$). Os resultados estão de acordo com a revisão sobre o uso de esteróides associados ou não ao protocolo ovsynch realizado por Barros & Ereno (2005) em bovinos. Concluímos que no manejo da região amazônica, o uso da progesterona intravaginal nos protocolos de inseminação artificial em tempo fixo em bufalas mostrou-se eficiente.

EFEITO DE MANEJO SOBRE A TAXA DE PRENHEZ EM PROGRAMA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

Borges, J.C.¹; Silva, M.R.²; Guimarães, J.D.³

¹ DMVPRA FCAV-UNESP, -14884-900, Jaboticabal-SP, Brazil, ² DZOMA FCAV-UNESP, 14884-900, Jaboticabal-SP, Brazil ³DVT UFV, 36570-000, Viçosa-MG, Brazil. julicborges@yahoo.com.br

O objetivo deste estudo foi relacionar efeitos de manejo em diferentes estações reprodutivas em programa de inseminação artificial (IA) sobre a taxa de prenhez, numa propriedade na região Pantanal Sul Mato-grossense. Os efeitos avaliados foram: estação de monta (EM), número de serviços, horário de IA, aspecto do muco cervical, touro e inseminador. As taxas de prenhez foram obtidas em quatro estações de monta consecutivas, sendo estas fixadas nos períodos de Abril-Junho/2003 (EM 1), Novembro–Janeiro/2003-2004 (EM 2), Abril–Junho/2004 (EM 3), Novembro–Janeiro/2004-2005 (EM 4), com 71, 88, 119, 213 novilhas, respectivamente (com idade variando de 18 a 26 meses). Os dados foram analisados em tabelas de contingências e comparados pelo teste χ^2 e correlações simples de Pearson entre todos os parâmetros analisados. Observou-se que a taxa de prenhez da EM 4 (85,45) foi significativamente melhor ($p < 0,05$) do que as taxas das estações anteriores (69,01, 71,59, 64,71), respectivamente em ordem cronológica, devido ao aumento de animais de reposição e principalmente à evolutiva eficiência do manejo reprodutivo desde a implantação da IA. O número de serviços não diferiu ($p > 0,05$) entre estações, com exceção da terceira inseminação da EM 2 que diferiu ($p < 0,05$) das demais, pois alguns animais tardios da primeira estação foram mantidos no rebanho para uma segunda chance, sendo que as próximas estações foram rigorosas com o descarte desse tipo de matriz. A taxa de prenhez não diferiu ($p > 0,05$) quanto ao horário de inseminação, embora registrou aumento em valor absoluto quando realizadas pela manhã, sugerindo maior incidência de estro no final da tarde, possivelmente em função da temperatura ser mais amena. Não houve efeito do aspecto de muco cervical (limpo, sujo e não observado) sobre a taxa de prenhez ($p > 0,05$). A taxa de prenhez foi influenciada por diferentes inseminadores ou para o mesmo inseminador entre EM ($p < 0,05$), com comportamento semelhante para o efeito touro. Um trabalho sobre sincronização do estro em fêmeas bovinas verificou efeito de inseminador nas taxas de concepção (MIZUTA et al., *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.36:5, 1999) e vários trabalhos comprovam o fator individual touro. Essas duas variáveis indicam que embora o sucesso da técnica de inseminação artificial dependa de uma adoção de práticas eficientes de manejo nutricional, sanitário e reprodutivo, fatores individuais como inseminador e touro possuem relação com a taxa de prenhez.

COMPARAÇÃO DAS TAXAS DE PREENHEZ SEGUNDO O TAMANHO DO CORPO LÚTEO DE RECEPTORAS INOVULADAS COM EMBRIÕES *Bos indicus* PRODUZIDOS *IN VITRO*

Borsato, E.A.¹; Ludwig Jr, H.E.¹; Silva, D.R.M.¹; Barreiros, T.R.R.²; Seneda, M.M.³

¹Embriogen, Campo Mourão, PR, ²Faculdades Integrado de Campo Mourão, PR, ³Departamento de Clínicas Veterinárias, CCA, UEL, PR, 86051- 990 thalesrigo@grupointegrado.br

O objetivo deste experimento foi comparar as taxas de prenhez de receptoras de embrião segundo o tamanho do corpo lúteo. Foram utilizadas 203 novilhas *Bos taurus* x *Bos indicus*. No primeiro grupo (G-I, n=103), os animais com CL previamente detectados por ultra-sonografia transretal (Aloka SSD 500, 5 MHz) receberam PGF2 α - 500 (g de Cloprostenol (Sincrocio, Ouro fino, Brasil), por via IM e permaneceram sob observação de cio por 72 horas (grupo PGF). No segundo grupo (G-II, n=100), as novilhas receberam, em momento aleatório do ciclo estral, um dispositivo intravaginal de 1,9 g de P4 (CIDR, Pfizer, Brasil) simultaneamente à aplicação IM de 2 mg de BE (Estrogin, Farmavet, Brasil). No oitavo dia, os dispositivos foram retirados e os animais receberam 500 μ g de Cloprostenol (Sincrocio, Ouro fino, Brasil) por via IM. Após 24h todos os animais receberam uma aplicação de 1 mg de BE, por via IM. A identificação e a mensuração ultra-sonográfica do CL foi realizada após dez e dezessete dias após o início dos tratamentos para os grupos G-I e G-II, respectivamente. Todas as receptoras com CL, independente do tamanho, receberam embriões produzidos *in vitro*. O diagnóstico de gestação foi feito 38 dias após a inovulação, por ultra-sonografia. Os dados foram analisados pelo teste do Qui-quadrado corrigido de Yates. No G-I foram encontradas 1, 11, 8, 26, 20, 8 e 1 receptoras com CL de 12, 15, 16, 18, 20, 22 e 25 mm, respectivamente. No G-II obteve-se 4, 16, 9, 32 e 18 receptoras com CL de 12, 15, 18, 20, 22 mm, respectivamente. Os resultados foram agrupados em novilhas com CL de 12 a 18 mm e 20 a 25 mm em ambos os grupos. Foram observadas diferenças significativas nos dois grupos. O G-I apresentou 61,3% (46/75) e 37,9% (29/75); (P=0,008), respectivamente com tamanho do CL entre 12 e 18 mm e 20 a 25mm. No G-II observou-se mais novilhas com CL entre 20 a 22 (63,2%, 50/79) do que com 12 a 18 mm (36,7%, 29/79); (P=0,001). Entretanto, as taxas de prenhez apresentaram semelhança (P>0,05) nos dois grupos, resultando em 36,9% (17/46) e 37,9% (11/29) para o G-I e 34,4% (10/29) e 44% (22/50) para o GII. Embora não tenha havido diferença nas taxas de prenhez, destaca-se o aumento da proporção de receptoras com corpos lúteos maiores quando tratadas com progesterona para transferência de embriões em tempo fixo, em comparação às tratadas de forma convencional com cloprostenol.

VARIABILIDADE DO NÚMERO DE EMBRIÕES NA DETERMINAÇÃO DO NÚMERO IDEAL DE RECEPTORAS

Beltrame, R.T.¹; Barioni, L.G.²; Quirino, C.R.³; Fontes, R.S.³

¹ Bolsista Capes, aluno do curso de Pós Graduação em Produção Animal –LMGA – CCTA - UENF,

² Pesquisador da Embrapa Cerrados Rod. Brasília Fortaleza BR 020 Km 18 Planaltina - DF - Brasil
CEP: 73301-970; ³Professor associado do LMGA – CCTA - UENF.- rtbeltrame@terra.com.br

Em uma análise determinista, considera-se que o número ótimo de receptoras é igual ao número esperado de embriões a serem coletados. Entretanto, este número varia consideravelmente entre doadoras e para uma mesma doadora em diferentes coletas. Assim, mesmo utilizando-se o número ideal de receptoras, haverá, por vezes, número excessivo de embriões coletados e, por outras, número insuficiente para as receptoras aptas à inovulação. Um modelo, implementado em Microsoft Excel v. 8.0, foi utilizado para prever o número de prenhez em programas de transferência de embriões. Nesse modelo, o número de embriões viáveis coletados por doadora foi gerado de acordo com uma distribuição normal com média 6 e diferentes desvios-padrão. Para determinação do número ótimo de receptoras, adotou-se como critério o mínimo custo da prenhez. Adotaram-se coletas mensais de embriões, fixando-se 6 doadoras por coleta, e um período de simulação de 36 meses, sendo que os dados dos primeiros 12 meses foram descartados para que o efeito do estoque inicial de embriões fosse minimizado. Não houve individualização das doadoras e assumiu-se covariância nula entre coletas, de forma que o número de coletas e o intervalo entre coletas para uma mesma doadora não foram especificados. Considerou-se a sincronização da doadora com um protocolo que utiliza implante vaginal de progesterona (CIDR[®]) e superovulação utilizando FSH (Folltropin[®]). Assumiu-se taxa de sincronização de 70%, aptidão de 55%, gestação a fresco de 60% e gestação por descongelamento de 40% para as receptoras. Foram testados quatro níveis de custo mensal das receptoras no programa (R\$ 15,00; R\$ 30,00; R\$ 60,00; R\$120,00) e quatro níveis de variabilidade (desvio padrão = 3, 6, 9 e 12) no número de embriões viáveis coletados por doadora (EVCD). As estatísticas (médias e distribuições) foram obtidas repetindo-se a simulação 5000 vezes para cada caso. Obteve-se uma estimativa de 22,26 receptoras para cada doadora, independente do custo da receptora, para a análise determinista. Em contraste, as estimativas estocásticas variaram de 21,5 a 26,5, considerando-se a possibilidade de congelamento de embriões, e de 21 a 32,5, quando os embriões eram somente transferidos a fresco. Nas análises de sensibilidade observou-se redução da relação ótima entre o número de receptoras e doadoras com aumento do custo da receptora. Esse efeito foi mais acentuado quanto maior a variabilidade em EVCD. Adicionalmente, um menor número de prenhez foi obtido à medida que simulou-se níveis mais elevados de variação em EVCD. Nas simulações, o congelamento mostrou-se eficaz para aumentar o número de prenhez, reduzir sua variabilidade e seu custo. Ainda, a metodologia de cálculo determinista pode superestimar o número de prenhez obtidas no programa de TE, gerando subestimativa no custo por prenhez. Sendo assim, as estimativas de custo devem ser elaboradas através de um processo que considere a variabilidade do número de embriões.

CUSTO MÉDIO DA RECEPTORA DE EMBRIÃO

Beltrame, R.T.¹; Barioni, L.G.²; Quirino, C.R.³; Fontes, R.S.³

¹Bolsista Capes, aluno do curso de Pós Graduação em Produção Animal –LMGA – CCTA - UENF, ² Pesquisador da Embrapa Cerrados Rod. Brasília Fortaleza BR 020 Km 18 Planaltina - DF - Brasil CEP: 73301-970; ³Professor associado do LMGA – CCTA - UENF. - rtbeltrame@terra.com.br

A orçamentação de custos para aplicação de novas biotecnologias para reprodução animal (FIV e TE) tem recebido pouca atenção por parte da pesquisa e de extensionistas. Essa orçamentação é fundamental para a avaliação da viabilidade econômica e para o planejamento de sua aplicação comercial. Uma das dificuldades na orçamentação diz respeito ao custo das receptoras nesses programas. A dificuldade decorre do fato de que seus custos variam em função do tempo necessário para o estabelecimento da prenhez, o qual segue uma distribuição probabilística. Essa distribuição não é fixa, porém varia em função dos índices reprodutivos e de aspectos relacionados à gestão do sistema. Assim, essa análise demanda um modelo que permita estabelecer a distribuição probabilística de prenhez das receptoras em determinadas condições para permitir a estimação do custo médio esperado. Nesse estudo um modelo matemático dinâmico, implementado no pacote de simulação Stella 8.0, foi utilizado para simular o ciclo de um grupo de receptoras até sua prenhez ou descarte. Periodizou-se a análise onde os eventos aconteceram na seguinte seqüência: a) compra das receptoras; b) adaptação e sincronização; c) transferência de embriões; d) inovulações por embriões a fresco ou descongelamento; e) diagnóstico de gestação. A simulação permitia o reaproveitamento de receptoras provenientes de diagnóstico negativo apenas na primeira inovulação (a fresco ou por descongelamento). O diagnóstico negativo na segunda inovulação resultava em descarte do animal. As receptoras reaproveitadas passavam pelas fases “c” a “e”, da mesma forma que as receptoras de primeiro ciclo. Assumiram-se as seguintes taxas: ciclicidade 0,7; sincronização 0,7; aptidão = 0,55; gestação por inovulações a fresco = 0,6 e por descongelamento = 0,4. Custos atualizados para maio de 2005, foram utilizados. Fases foram estipuladas para o cálculo do custo mensal em reais (R\$). Adotou-se: 1) aquisição = 750,00; 2) adaptação = 54,21; 3) receptoras não inovuladas = 26,33; 4) aptas = 48,33; 5) diagnóstico de gestação = 28,47; 6) venda de receptoras vazias = 600,00. O custo total da receptora foi calculado a partir da previsão do fluxo de caixa mensal, calculado como a soma do produto da probabilidade da receptora estar na i-ésima fase e do custo mensal associado a esta fase. As receptoras descartadas foram consideradas como receita na determinação do custo médio da receptora prenha. O fluxo de caixa foi capitalizado até o final do período considerado (24 meses) utilizando uma taxa mensal de juros de 0,5%. O modelo prevê, utilizando os índices acima, que aproximadamente 83% das receptoras teriam emprenhado até o final do período simulado. O custo médio estimado por receptora foi de R\$ 1.212,80 (custo total / receptoras prenhas e vazias). O custo da receptora prenhe foi de R\$ 1.344,81(quociente entre custo total menos receitas por descarte e o numero de receptoras prenhas). Estas estimativas desconsideram o custo dos embriões no programa.

TAXA DE GESTAÇÃO DE NOVILHAS ALIMENTADAS COM DUAS FONTES DE GORDURA (MEGALAC® OU LINHAÇA EM GRÃO) NA DIETA RECEBENDO EMBRIÕES CONGELADOS DE VACAS LEITEIRAS ALIMENTADAS COM MEGALAC® OU LINHAÇA EM GRÃO

Cavaliere, F.L.B.¹; Santos, G.T.²; Petit, H.³; Morgan, J.⁴; Rigolon, L.P.R.^{1,2};
Ramos, F.S.R.¹; Capovilla, L.C.T.^{1,2}; Albuquerque, K.P.²

¹ Professores do Curso de Medicina Veterinária do Cesumar; ² Curso de pós-graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá; ³ AAFC, Dairy and Swine R&D Centre, Lennoxville, QC, Canada; ⁴ Kemptville College, Kemptville, ON, Canada. fabiobim@cesumar.br

O experimento foi conduzido no Colégio de Agricultura Kemptville pertencente à Universidade de Guelph – Ontário – Canadá. Foram utilizados 75 novilhas da raça Holandesa com peso médio de 350 kg divididas em dois tratamentos: T1 – Megalac® - omega 6 (39 animais) e T2 – Linhaça em grão – omega 3 (36 animais). As dietas foram fornecidas 8 semanas antes da sincronização do cio e até se completarem 50 dias de gestação. A inovulação dos embriões foi realizada sete dias após o cio com embriões congelados proveniente de vacas doadoras da raça holandesa alimentadas Megalac® ou Linhaça em grão. O delineamento experimental foi totalmente casualizado e os animais foram distribuídos em um esquema fatorial 2 x 2, sendo dois tratamentos (Megalac® ou Linhaça grão) e dois tipos de embriões de acordo com a alimentação dos animais doadores (Megalac® ou Linhaça grão). Para a análise da variável taxa de gestação foi utilizado a distribuição de probabilidade binomial e a função de ligação logística, estimados por meio da metodologia de modelos lineares generalizados (Nelder e Wedderburn, 1972), utilizando-se o software GLIM 4.0. Não houve efeito de tratamento ($p>0,05$) na taxa de gestação pós inovulação dos embriões nos animais alimentados com Linhaça em grão (38,89%) ou Megalac®(46,15%). No entanto, os animais que receberam embriões das vacas alimentadas com Linhaça apresentaram ($p<0,05$) um aumento na taxa de prenhez (58,82%) quando comparando aos embriões congelados provenientes das doadoras alimentadas com Megalac® (29,27%). Desta forma, podemos concluir que a alimentação de receptoras com Megalac® (ômega 6) e ou Linhaça em grão (ômega 3) não altera a taxa de gestação pós inovulação de embriões. Todavia, os embriões coletados de vacas alimentadas com Linhaça em grão poderiam ser mais resistentes ao congelamento do que aqueles coletados de vacas alimentadas com Megalac®.

EFEITOS DE DUAS FONTES DE GORDURA (MEGALAC® OU LINHAÇA EM GRÃO) NA DIETA NA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES EM VACAS LEITEIRAS DA RAÇA HOLANDESA

Cavalieri, F.L.B.¹; Santos, G.T.²; Petit, H.³; Morgan, J.⁴; Rigolon, L.P.R.^{1,2};
Ramos, F.S.R.¹; Capovilla, L.C.T.^{1,2}; Albuquerque, K.P.²

¹ Professores do Curso de Medicina Veterinária do Cesumar; ² Curso de pós-graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá; ³ AAFC, Dairy and Swine R&D Centre, Lennoxville, QC, Canada; ⁴ Kemptville College, Kemptville, ON, Canada. fabiochim@cesumar.br

O experimento foi conduzido no Colégio de Agricultura Kemptville pertencente à Universidade de Guelph – Ontário – Canadá, objetivando avaliar o efeito de duas fontes de gordura na produção de embriões em vacas leiteiras. Foram utilizados 30 vacas da raça Holandesa divididas em dois tratamentos com 15 repetições cada: T1 – Megalac® (ômega 9 e 6) e T2 – Linhaça em grão (ômega 3). As dietas foram fornecidas duas vezes ao dia a partir do 21o dia pós-parto, e oitenta dias após os animais foram sincronizados com um implante intravaginal (CIDR® - InterAg, Hamilton, New Zealand) e com a aplicação de 3 mg de estradiol 17β 24 horas após a inserção do implante. Quatro dias após os animais foram superovulados com 400 mg de FSH (Folltropin® – Vetrepharm, Canadá) em duas doses diárias decrescentes, durante 5 dias. Os animais foram inseminados 12, 24 e 36 horas após a detecção do cio com sêmen de um touro da raça Holandesa. A coleta dos embriões foi realizada pelo método não cirúrgico (aberto), sete dias após o cio, realizando duas coletas em cada vaca em um intervalo de 45 dias. Cinco animais de cada tratamento foram observados duas vezes por semana, a partir do início do experimento até o início do protocolo de sincronização, quantificando número de folículos pequenos (< 5 mm), médios (5,0 a 9,0 mm) e grandes (> 10 mm). O delineamento experimental foi totalmente casualizado, sendo que, para às variáveis número de folículos e embriões admitiu-se a função de distribuição de probabilidade Poisson e função de ligação logarítmica, estimados por meio da metodologia de modelos lineares generalizados (Nelder e Wedderburn, 1972), utilizando-se o software GLIM 4.0. Não houve efeito de tratamento ($p > 0,05$) no número de folículos pequenos (T1:1,79 e T2: 1,61), médios (T1:1,32 e T2:1,55) e grandes (T1:0,27 e T2:0,31) bem como no número de embriões totais (T1: 5,65 e T2: 6,57), embriões transferíveis (T1: 3,42 e T2: 2,38) e embriões degenerados (T1: 1,07 e T2: 1,42). Desta forma, podemos concluir que a alimentação de doadoras com Megalac® (ômega 6) e ou Linhaça em grão (ômega 3) não altera o número de folículos e a produção de embriões.

DETERMINAÇÃO DE PROPORÇÕES ANCESTRAIS EM RAÇAS SINTÉTICAS DE BOVINOS USANDO MARCADORES DE DNA: APLICAÇÃO A ANIMAIS ESPECÍFICOS DA RAÇA GIROLANDO.

Bicalho, H.M.S.; Pimenta, C.G.; Mendes, I.K.P.; Pena, H.B., Lopes, C.; Queiroz, E.M.; Rocha, J.L.F.; Pena, S.D.J.

Gene/Genealógica Central de Genotipagem de Animais Ltda., Belo Horizonte-MG.
genegenealogica@genealogica.com.br

As subespécies *indicus* (Zebu) e *taurus* (taurinos) de *Bos primigenius* divergiram evolucionariamente há mais de 600.000 atrás. Ao longo do tempo, os seus genomas acumularam diferenças que podem ser avaliadas por testes de DNA, especialmente usando microssatélites. A partir da primeira metade do século XX, foram desenvolvidas diversas raças sintéticas pelo cruzamento do gado Zebu e taurino, destacando-se hoje no Brasil as raças Girolando (Gir X Holandesa), Brangus (Brahman X Angus) e Simbrasil (Guzerá X Simental). Todas estas raças têm como padrão 3/8 de Zebu e 5/8 de taurino. Certamente é de grande interesse a determinação das proporções de ancestralidade Zebu e taurino em animais específicos para fins de reprodução e de registro. Neste trabalho investigou-se a eficácia de um conjunto de nove microssatélites na análise de ancestralidade em animais da raça Girolanda. Este conjunto é recomendado pela ISAG (*International Society of Animal Genetics*) e é adotado oficialmente para determinação de parentesco no Brasil pelo Ministério da Agricultura. Os genótipos de 50 animais Gir e 50 animais Holandeses foram obtidos para os microssatélites BM1824, BM2113, ETH10, ETH225, INRA23, SPS115, TGLA122, TGLA126 e TGLA227. Foram também tipados 20 animais Girolando nos quais havia informação genealógica da proporção da mistura de gens das raças Gir e Holandesa. Observaram-se diferenças significativas nas frequências alélicas da maioria dos locos. Os genótipos foram analisados pelo programa de computador *Structure 2.0*, que usa um algoritmo Bayesiano de agregação do tipo "k-means". Com base nos perfis genotípicos dos animais Gir e Holandês, o programa atribuiu a cada um dos 20 animais Girolando um percentual genômico de Zebu e taurino. Os resultados obtidos foram comparados com os dados genealógicos dos animais, obtendo-se um coeficiente de correlação altamente significativo de 0,84 ($P < 0,0001$). Conclusão: o painel de nove microssatélites foi capaz de estimar com fidelidade a proporção ancestral Gir e Holandês em animais Girolando específicos, mostrando elevada confiabilidade nesse tipo de análise. Potencialmente essa confiabilidade pode ainda ser aumentada pela inclusão de marcadores genômicos adicionais.

TAXAS DE PREENHEZ EM RECEPTORAS DE EMBRIÕES TRATADAS COM DISPOSITIVOS INTRAVAGINAIS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PROGESTERONA

Peres, L.C.^{1,2}; Pincinato, D.^{1,2}; Balla, E.^{1,2}; Tribulo, R.²; Bó, G.A.^{1,2}

¹ Universidade Nacional de Córdoba, Argentina. ² Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC), Jerónimo Luis de Cabrera 106, X5000GVD, Córdoba, Argentina.

gabrielbo@iracbiogen.com.ar

Foi feito um experimento para comparar as taxas de prenhez em receptoras de embriões tratadas com dispositivos intravaginais com progesterona (P4) Triu-B (Biogénesis, Argentina) contendo 0,5 ou 1 g de P4 e transferidas em tempo fixo (TETF). As vacas utilizadas eram cruzas *Bos taurus* x *Bos indicus* secas, cíclicas (com um CL ou um folículo >10 milímetros e tônus uterino detectado por palpação retal), com uma condição corporal (CC) de 3 a 4 (escala 1 a 5). No Dia 0, todas as vacas receberam 2 mg de benzoato de estradiol (EB Bioestrogen, Biogénesis) e foram divididas aleatoriamente para receber um dispositivo intravaginal Triu-B com 0,5 g de P4 (Triu-B Monodose), ou um Triu-B com 1 g de P4. No Dia 5, todas as vacas receberam 400 UI de eCG (Novormón 5000, Syntex, Argentina) mais 150 µg D(+) cloprostenol i.m. (Enzaprost-DC, Biogénesis). No Dia 8, os dispositivos foram retirados e todas as vacas receberam 1 mg de EB no Dia 9. No Dia 17, se revisaram todas as receptoras por palpação retal e aquelas com um CL receberam embriões frescos por transferência não cirúrgica no corno ipsilateral ao CL. Os embriões utilizados eram 41 Grau 1 e 8 Grau 2 (IETS). Os diagnósticos de prenhez foram realizados por ultrasonografia aos 70 dias depois da TETF. As taxas de prenhez não foram influenciadas pelo grau do embrião (P=0,4) nem a condição corporal das receptoras (P=0,1). Ademais, não foram encontradas diferenças na taxa de aproveitamento (Triu-B 0,5 g: 23/30, 76,7% vs Triu-B 1g: 26/30, 86,7%; P=0,31), na taxa de prenhez/transferidas (Triu-B 0,5 g: 15/23, 65,2% vs Triu-B 1 g: 12/26, 46,1%; P=0,13) nem na taxa de prenhez/tratadas (Triu-B 0,5: 15/30, 50,0% vs Triu-B 1 g: 12/30, 40,0%; P=0,43). Concluiu-se que os dois dispositivos avaliados são igualmente eficazes em um programa de sincronização para TETF em receptoras cruza *Bos indicus* x *Bos taurus*. Novos experimentos deverão ser realizados para confirmar os achados do presente trabalho.

TAXAS DE PRENHEZ EM RECEPTORAS DE EMBRIÕES TRATADAS COM DISPOSITIVOS INTRAVAGINAIS COM PROGESTERONA E BENZOATO DE ESTRADIOL NO MOMENTO DA REMOÇÃO DO DISPOSITIVO OU 24 H DEPOIS

Peres, L.C.^{1,3}; Pincinato, D.^{1,3}; Balla, E.^{1,3}; Maraña Peña, D.^{1,3}; Borges, L.F.K.²;
Cutaia, L.³; Bó, G. A.^{1,3}

¹Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, ²Universidade Federal de Santa María, Brasil,

³Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC), Jerónimo Luis de Cabrera 106, X5000GVD, Córdoba, Argentina. gabrielbo@iracbiogen.com.ar

Foi feito um experimento comparando as taxas de prenhez em receptoras de embriões tratadas com dispositivos com progesterona (DIB, Syntex, Argentina) mais benzoato de estradiol (EB, Syntex) e eCG (Novormon 5000, Syntex), cuja ovulação foi induzida com EB no momento da remoção do dispositivo ou 24h mais tarde. Se utilizaram 478 vacas cruza zebu multíparas, secas cíclicas e com condição corporal de 2,5 a 3,5 (escala de 1 a 5). Todas vacas receberam um DIB e 2mg de EB no Dia 0 e 400UI de eCG mais 150µg de D(+)cloprostenol i.m. (Ciclase, Syntex) no Dia 5. No Dia 8, os DIB foram retirados e as vacas foram divididas aleatoriamente para receber 1mg de EB i.m. nesse momento (Grupo EB0) ou 24h mais tarde (Dia 9; Grupo EB24). Se observaram os cios entre o Dia 8 e 13. No Dia 16, todas as vacas foram examinadas por ultrassonografia e aquelas com mais de 1 CL ou um CL >256mm² foram transferidas em tempo fixo (TETF) com embriões frescos ou congelados no Dia 16 (EB0) ou 17 (EB24). Se utilizaram 253 embriões Grau 1, 65 Grau 2 e 33 Grau 3 (IETS). Se realizou ultrassonografia no Dia 0 para determinar ciclicidade [somente vacas com um CL ou um Folículo >10mm e tônus uterino foram utilizadas e aos 30 dias da TEFT para detectar a prenhez. (100 Falco Vet., Pie Medical, transdutor 8,0MHz)]. As variáveis quantitativas foram comparadas por ANAVA e as taxas de prenhez por regressão logística. As variáveis embriões frescos ou congelados, operador, estado do embrião e área do CL não afetaram as taxas de prenhez (P>0,05). Entretanto a qualidade do embrião tendeu (P=0,06) a ser diferente (Grau 1: 152/253, 60,1%, Grau 2 32/65, 49,2%, Grau 3 11/33, 33,3%). O intervalo desde a remoção do DIB ao estro foi mais curto (P=0,0001) nas receptoras do Grupo EB0 (26,5±0,6h) que nas do Grupo EB24 (39,8±0,8h). Entretanto, as taxas de prenhez não foram diferentes (P=0,6) entre as receptoras observadas em cio (EB0: 83/137; 60,6% e EB24: 60/117; 51,3%) e nas que não foram vistas em cio (EB0: 27/43; 62,8% e EB24 25/54; 46,3%). Não houve diferença entre os grupos (P=0,5) na taxa de aproveitamento (EB0: 180/241; 74,7% e EB24: 171/237; 72,2%). Por último, as taxas de receptoras prenhas/transferidas e prenhas/tratadas foi maior (P=0,03) no grupo EB0 (110/180; 61,1% e 110/241; 45,6%) do que no grupo EB24 (85/171; 49,7% e 85/237; 35,9%). O uso de EB no momento da remoção do DIB permite reduzir o número de vezes que os animais passam pela manga e possivelmente melhorar as taxas de prenhez em um programa de TEFT.

TAXAS DE PREENHEZ EM RECEPTORAS DE EMBRIÕES TRATADAS COM IMPLANTES AURICULARES COM NORGESTOMET E BENZOATO DE ESTRADIOL OU DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE VALERATO DE ESTRADIOL

Peres, L.C.^{1,3}; Pincinato, D.^{1,3}; Maraña Peña, D.^{1,3}; Borges, L.F.K.²;
Tribulo, R.³; Cutaia L.³; Bó G.A.¹³

¹Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, ² Universidade Federal de Santa Maria, Brasil,

³Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC), Jerónimo Luis de Cabrera 106, X5000GVD, Córdoba, Argentina. gabrielbo@iracbiogen.com.ar

Foi feito um experimento para comparar as taxas de prenhez em receptoras de embriões que foram tratadas com implantes Crestar (Intervet, Brasil) mais benzoato de estradiol (EB, Syntex, Argentina) ou valerato de estradiol (EV, Intervet). Se utilizaram 216 vacas cruza zebu secas, cíclicas com uma condição corporal de 3,5 a 4,5 (escala de 1 a 5). Todos animais receberam um implante Crestar no Dia 0 e foram divididos aleatoriamente em 4 grupos. No Dia 0 o primeiro grupo recebeu 2mg EB mais 50mg de progesterona (Laboratório Rio de Janeiro, Argentina), o outro recebeu 5mg de EV mais 3mg de norgestomet e os outros dois grupos receberam 2mg de EV e 1,2mg de norgestomet. No Dia 5 todos animais receberam 400 UI de eCG (Folligon 5000, Intervet) mais 150 µg de D (+) cloprostenol sodico i.m. (Preloban, Intervet). Os Crestar foram retirados no Dia 8 (EB2 mg/8 d e EV2 mg/8 d) ou no Dia 9 (EV 2mg/9 d e EV 5mg/9 d) e todas vacas receberam 1 mg de EB 24 h mais tarde. Se observaram os cios entre o Dia 8 ao 13. No Dia 16, todas as vacas foram examinadas por ultrassonografia e aquelas com um CL >256 mm² foram transferidas com embriões congelados no Dia 17 (Grupos EB 2mg/ 8 d ou EV 2mg/8 d) ou no Dia 18 (EV 2mg/9 d e EV 5mg/9 d). Se utilizaram 145 embriões Grau 1 (IETS). O diagnóstico de prenhez foi realizado 28 dias após a TEFT. O intervalo desde a remoção do Crestar ao estro foi de 47,1±0,8h e não houve diferenças entre os grupos (P=0,4). Não houve diferença (P=0,8) na quantidade de CL por grupo (EB2 mg/8 d 1,4±0,1; EV 2mg/8 d 1,3±0,1; EV 2mg/9 d 1,2±0,1; EV 5mg/9 1,5±0,1) e na taxa de aproveitamento (P=0,5). As variáveis estadas do embrião, área do CL, se as vacas foram detectadas em cio ou não; não influenciaram na taxa de prenhez (P>0,4). As taxas de receptoras prenas/transferidas (EB 2mg/ 8 d: 22/35; 62,8%; EV 2mg/8 d : 26/40 65,0%; EV 5mg/9 d 18/32 56,3%) foi menor no grupo EV 2mg/9 d: 12/38 31,6% (P=0,004). As taxas de prenas/tratadas (P=0,02) também foram menores no grupos EV 2 mg/9 d (12/53 22,6%) quando comparado com os grupos EB/8 d: 22/50 44,0%; EV 2mg/8 d: 26/53 49,1%; EV 5mg/9 d: 18/54 33,3%. Os dados preliminares indicam que a redução da dose de EV a 2mg resultou em taxas de prenhez comparáveis aos outros dois grupos quando os Crestar foram removidos no Dia 8, mas não quando foram removidos no Dia 9.

AVALIAÇÃO DA SEGUNDA LAVAGEM UTERINA APÓS 24 HORAS DA COLHEITA NA TAXA DE RECUPERAÇÃO DE EMBRIÕES EM VACAS NELORE – DADOS PRELIMINARES

Barrreiros, T.R.R.¹; Bezerra, G.A.²; Azevedo, J.R.³; Seneda, M.M.⁴

¹Faculdades Integrado de Campo Mourão, ²Médico Veterinário Autônomo, ³Mestrando em Reprodução Animal, UEM, ⁴Departamento de Clínicas Veterinárias, CCA, UEL, PR, 86051-990
thalesrigo@grupointegrado.br

O presente experimento foi realizado com objetivo de analisar a viabilidade da colheita adicional após 24 horas da primeira recuperação de embriões. Foram utilizadas 5 doadoras cíclicas da raça Nelore e com condição corporal variando entre 3,5 e 4 (escala 1 a 5). Foram realizadas 10 colheitas de embriões, sendo 5 com observação de cio e 5 com IATF. No programa com observação de cio, os animais receberam um dispositivo intravaginal de 1,9 g de progesterona (Cronipress, Biogenesis, Argentina) e uma aplicação intramuscular (IM) de 2,5 mg de benzoato de estradiol (Estrogin, Farmavet, Brasil). Cinco dias depois, os animais receberam 250 UI de FSH (Pluset, Calier, Espanha) em 8 doses decrescentes, por via IM, a cada 12 horas, nos próximos 4 dias. Quarenta e oito horas mais tarde, aplicou-se pela manhã 150 µg, por via IM, de cloprostenol (Croniben, Biogenesis, Brasil) e retirou-se o dispositivo de progesterona à tarde. Os animais foram inseminados 12 e 24 horas após o início da manifestação de cio. No programa com IATF, o tratamento foi semelhante ao descrito anteriormente, com a retirada do dispositivo de progesterona realizada 24 horas após a aplicação do cloprostenol, mais aplicação IM de 1500 UI de hCG (Vetecor, Calier, Espanha), na manhã do nono dia do tratamento. Os animais foram inseminados 12 e 24 horas após a aplicação do hCG, sem observação de cio. Nos 10 procedimentos realizados, as colheitas de embrião foram procedidas dezesseis dias após o início do tratamento, com cateter de Foley posicionado no corpo do útero e 1 litro de DPBS (Nutricell, Campinas) por doadora. Após vinte e quatro horas foi realizada nova lavagem uterina, nos mesmos moldes, em todos os animais. Após colheita, os embriões foram classificados de acordo com os critérios estabelecidos pela IETS. Os dados a serem obtidos no restante do experimento serão analisados pelo teste de Tukey. Um total de 112 estruturas e 74 embriões viáveis foram obtidos na primeira lavagem e 11 estruturas e 9 embriões viáveis na segunda lavagem. No programa com observação de cio obtêve-se média de 12 estruturas e 8,6 embriões viáveis. Com utilização de IATF, recuperou-se em média 10,4 estruturas totais e 6,2 embriões viáveis. Foram recuperadas estruturas de apenas duas vacas com as lavagens uterinas adicionais, resultando em 9 estruturas totais e 7 viáveis, no programa com observação de cio, e 2 embriões viáveis de apenas uma doadora no programa com IATF, com média de 1,1 estruturas e 0,9 embriões viáveis por procedimento. Os dados preliminares do presente experimento mostram que a lavagem uterina adicional 24 horas após a colheita convencional pode aumentar taxa de recuperação de embriões produzidos *in vivo* em vacas submetidas a protocolos de superovulação com observação de cio.

AVALIAÇÃO DO CORPO LÚTEO, TÔNUS UTERINO E CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE PROGESTERONA E ESTRADIOL DE NOVILHAS RECEPTORAS NO DIA DA TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES

Leal, L.S.¹; Oba, E.¹; Fernandes, C.A.C.¹; Sá Filho, O.G.¹

¹Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária-FMVZ-UNESP-Botucatu-SP-Brasil
18618-000. lu_s_leal@yahoo.com.br

Os objetivos do presente trabalho foram avaliar o corpo lúteo (CL) por palpação retal e ultra-sonografia e o tônus uterino bem como, determinar a concentração plasmática de progesterona (P) e estradiol (17 β E) nas receptoras, no dia da transferência de embriões. Para isto foram utilizadas 60 novilhas receptoras, mestiças. A taxa de prenhez nas receptoras segundo o tamanho do CL à palpação retal foi 70,00% (pequeno), 38,89% (médio) e 60,00% (grande). Ao exame ultra-sonográfico 50,88% dos CL detectados continham cavidade cística. O diâmetro médio do CL foi $17,82 \pm 6,26$ mm e da cavidade cística $6,76 \pm 4,19$ mm. Os diâmetros do CL e da cavidade cística não interferiram nas taxas de prenhez. Os volumes médios foram para CL $4,36 \pm 9,09$ cm³, cavidade cística $0,40 \pm 0,97$ cm³ e massa luteal $4,16 \pm 8,42$ cm³. Os volumes do CL, da cavidade cística e da massa luteal não influenciaram as taxas de prenhez. No dia da inovulação a média da concentração plasmática de progesterona foi $4,91 \pm 2,97$ ng/mL e estradiol $4,45 \pm 6,03$ pg/mL. Não houve diferença estatística entre as concentrações de progesterona e estradiol para as receptoras prenhes ou não. Das 60 receptoras avaliadas, 49 (81,67%) apresentaram útero flácido (grau 1) e 11 (18,33%) útero em estágio intermediário (grau 2), apresentando índices de prenhez de 47,62% e 81,82%, respectivamente ($p < 0,05$ – Teste do Qui-quadrado), concluindo que receptoras cujos úteros foram classificados como grau 2 apresentaram os melhores resultados de gestação.

Apoio financeiro: FAPESP

COMPARAÇÃO DA TAXA DE PRENHEZ DE RECEPTORAS COM CORPO LÚTEO COMPACTO OU CAVITÁRIO APÓS PROTOCOLOS DE TRANSFERÊNCIA EM TEMPO FIXO OU COM PGF2?

Borsato, E.A.1; Ludwig Jr., H.E.1; Silva, D.R.M.1; Barreiros, T.R.R.2 ; Seneda, M.M.3

¹Embriogen, Campo Mourão, PR, 2Faculdades Integrado de Campo Mourão, PR; 3Departamento de Clínicas Veterinárias, CCA, UEL, PR, 86051- 990 thalesrigo@grupointegrado.br

O aproveitamento de receptoras com corpos lúteos cavitários tem gerado controvérsias, particularmente por um suposto aumento na incidência deste tipo de CL em protocolos sem observação de cio. O objetivo deste experimento foi avaliar as taxas de aproveitamento e prenhez em receptoras de embrião com corpo lúteo (CL) compacto ou cavitário, submetidas a protocolos com observação de estro ou transferência em tempo fixo. Foram utilizadas 203 novilhas *Bos taurus* x *Bos indicus*. No primeiro grupo (G-PGF, n=103), os animais com CL previamente detectados por ultra-sonografia transretal (Aloka SSD 500, 5 MHz) receberam PGF2 α - 500 μ g de Cloprostenol (Sincrocio, Ouro fino, Brasil), por via IM e permaneceram sob observação de cio por 72 horas (grupo PGF). No segundo grupo (G-P4, n=100), as novilhas receberam, em momento aleatório do ciclo estral, um dispositivo intravaginal de 1,9 g de P4 (CIDR, Pfizer, Brasil) simultaneamente à aplicação IM de 2 mg de BE (Estrogin, Farmavet, Brasil). No oitavo dia, os dispositivos foram retirados e os animais receberam 500 μ g de Cloprostenol (Sincrocio, Ouro fino, Brasil) por via IM. Após 24h todos os animais receberam uma aplicação de 1 mg de BE, por via IM. A identificação e avaliação ultra-sonográfica do CL foi realizada dez dias e dezessete dias após o início dos tratamentos, respectivamente para os grupos G-PGF e G-P4. Todas as receptoras com CL receberam embriões produzidos *in vitro*. O diagnóstico de gestação foi feito aos 45 dias de gestação por ultra-sonografia. Os dados foram analisados pelo teste do Qui-quadrado corrigido de Yates. Não houve diferença significativa nas taxas de aproveitamento de receptoras entre os grupos G-PGF e G-P4, resultando, respectivamente, em 72,8% (75/103) e 79% (79/100), $P > 0,05$. Na comparação das taxas de prenhez entre grupos foram obtidos 37,3% (28/75) para o G-PGF e 40,5% (32/79) para o G-P4 ($P > 0,05$). Detectou-se CL cavitário em 21,3% (16/75) das receptoras do G-PGF e 22,7% (18/79) para o grupo G-P4 ($P > 0,05$). Entre as receptoras com CL cavitário ou compacto, não houve diferença na taxa de prenhez 41,1% (14/34) e 38,3% (46/120), respectivamente, ($P > 0,05$). A partir destes resultados, destaca-se a semelhança nas taxas de prenhez de receptoras com corpos lúteos cavitários, em comparação às receptoras com CL compactos, independentemente da receptora ter sido submetida a protocolos convencionais (PGF) ou de transferência em tempo fixo. Adicionalmente, não foram encontradas diferenças nas taxas de aproveitamento de receptoras e de prenhez, após tratamentos com cloprostenol ou progesterona intravaginal. Ressalta-se, entretanto, a necessidade de identificação prévia do CL por palpação retal ou ultra-sonografia ao tratamento com cloprostenol e a expressiva facilidade de manejo com a adoção da transferência de embriões em tempo fixo.

EFEITO DO MOMENTO DA ADMINISTRAÇÃO DA PGF α E DA DOSE DE eCG NA SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA INOVULAÇÃO EM TEMPO FIXO EM NOVILHAS

Rezende, C.R.¹; Nasser, L.F.^{1,2}; Rezende, L.F.¹; Nunez, M.M.¹; Vieira, M.P.¹; Ayres, H.²; Sá Filho, M.F.²; Gimenes, L.U.²; Baruselli, P.S.²

¹FIRMASA, Campo Grande-MS, Brasil. ²Departamento de Reprodução Animal, FMVZ/ USP, São Paulo/SP, Brasil. . barusell@usp.br

Comparou-se a eficácia da utilização da PGF 2α no início do tratamento associado a deferentes doses de eCG no momento da retirada do dispositivo (fatorial 2x2) no protocolo de inovulação em tempo fixo (TETF) em novilhas *Bos taurus* x *Bos indicus*. Todas as novilhas (n=378) apresentavam boa condição corporal (>3,0, escala 1 a 5), sendo previamente examinadas por ultra-sonografia (US) para diagnóstico da ciclicidade (presença de CL) e subdivididas em quatro grupos de acordo com a administração ou não de PGF na inserção e a administração de 300 ou 400 UI de eCG (Folligon®, Intervet) na retirada do dispositivo intravaginal de progesterona (DIP4). Em dia aleatório do ciclo estral (Dia 0), as fêmeas receberam 2mg de BE, i.m. (Ric-BE®, Tecnopec, Brasil) e um DIP4 (Cronipres®, Biogenesis, Brasil). No Dia 8, removeu-se o DIP4 e administraram-se PGF 2α (Croniben®, Biogenesis, Brasil) e 0,5mg de cipionato de estradiol, i.m.(ECP, Pfizer, Brasil) As receptoras foram avaliadas por US no momento da inovulação (Dia 17), sendo que as aptas (CL \geq 18 mm de diâmetro) receberam um embrião produzido *in vitro*. O diagnóstico de gestação foi realizado por US 30 dias após a TETF. Foram analisadas as taxas de aproveitamento (APRO), de concepção (CONC), de prenhez (PREN) e o número de CL por receptora (NCL). Os resultados foram analisados pelo programa SAS. Os dados não apresentaram interações sendo as médias para os Grupos com vs. sem PGF no D0 e 300 vs. 400 UI de eCG no D8 foram, respectivamente: APRO [92,7% (177/191) vs. 92,5% (165/187) e 93,6% (176/188) vs. 91,6% (174/190)], CONC [48,6% (86/177) vs. 49,1% (81/165) e 45,4% (80/176) vs. 50,0% (87/174)], PREN [43,3% (81/187) vs. 45,0% (86/191) e 42,6% (80/188) vs. 45,7% (87/190)], NCL (1,15 \pm 0,03 vs. 1,11 \pm 0,04 e 1,11 \pm 0,04 vs. 1,15 \pm 0,03; P>0,05). Não foi verificado efeito da adição da PGF 2α no Dia 0 (p>0,05). Conclui-se que a administração de 300 UI de eCG apresentou eficácia semelhante ao tratamento com 400 UI (p>0,05), podendo ser empregada em protocolos de TETF em novilhas *Bos taurus* x *indicus*.

Agradecimento: Biogenesis

EFEITO DO INTERVALO LUTEÓLISE AO CIO, ÉPOCA DO ANO E DOSE DE FSH SOBRE A PRODUÇÃO DE EMBRIÕES EM BOVINOS DE CORTE

Brauner, C.C.¹; Bonotto, A.L.M.²; Pimentel, M.A.³; Pimentel, C.A.⁴

¹Aluno bolsista CnPq de Mestrado do PPG do Departamento de Zootecnia, FAEM, UFPel. Departamento de Zootecnia FAEM/UFPel, caixa postal 354, CEP 96010-970. Pelotas-RS. AC. Prof. Marcelo Pimentel. cassiocb@brturbo.com ²Médica Veterinária Autônoma. ³Professor Adjunto do Departamento de Zootecnia, FAEM, UFPel. ⁴Pesquisador do CnPq.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da época do ano, dose de FSH e intervalo entre aplicação do luteolítico e o cio sobre a eficiência da produção de embriões em bovinos de corte. Foram analisados dados referentes à 90 coletas de embriões, de vacas Aberdeen Angus realizadas em uma central de transferência localizada no município de Maçambará, região oeste do estado do RS, no período de 2002 a 2004. Os fatores fixos analisados foram quatro épocas do ano (janeiro a março; abril a junho; julho a setembro e outubro a dezembro), quatro doses de FSH (250; 287; 300 e 325 U.I.), e três intervalos entre a administração do agente luteolítico (PGF2 α) e a manifestação de cio (28 a 36 h, 36 a 44 h e 44 a 52 h). As variáveis analisadas foram: estruturas totais (ET), estruturas viáveis (EV) e estruturas não viáveis (NV), de acordo com IETS (1998). Os dados foram submetidos à análise da variância (ANOVA – GLM), no programa NCSS 6.0 (1996). As ET foram menores ($P < 0,05$) no intervalo de 44 a 52 h, com $9,1 \pm 1,6$; $9,0 \pm 0,7$ e $5,8 \pm 1,0$ para os três intervalos estudados, respectivamente. Já a época do ano e dose de FSH não apresentaram efeito sobre ET. As EV, não foram afetadas pelos efeitos fixos estudados. As NV foram maiores ($P < 0,05$) no intervalo de 36 a 44 h com $2,0 \pm 1,1$; $3,2 \pm 0,5$ e $1,1 \pm 0,7$ para os três intervalos estudados, respectivamente. A época do ano e dose de FSH não demonstraram efeito significativo sobre NV. Conclui-se que o maior intervalo entre a aplicação do luteolítico e a manifestação de cio tem efeito negativo sobre a produção de estruturas totais coletadas, entretanto, época do ano e dose de FSH não demonstram efeito sobre ET, EV e NV.

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

NCSS 6.0. Statistical System for Windows – User's Guide I, II, III. Kaysville, Utah, 1996. 2204p.

DINÂMICA FOLICULAR EM NOVILHAS E VACAS NELORE (*Bos indicus*) TRATADAS COM DISPOSITIVO INTRAVAGINAL DE PROGESTERONA NOVO OU REUTILIZADO ASSOCIADO OU NÃO À PROGESTERONA INJETÁVEL

Martins C.M.¹; Castricini, E.S.C.¹; Sá Filho, M.F.¹; Gimenes, L.U.¹; Baruselli, P.S.¹

¹Departamento de Reprodução Animal, FMVZ – USP, São Paulo – SP,
CEP 05508-000, Brasil. barusell@usp.br

Um total de 30 novilhas e 30 vacas Nelore lactantes (70-90 dias pós-parto) foram divididas homogeneamente em três grupos experimentais (DIBnovo, DIB3 uso e DIB3 uso+P4). Em dia aleatório do ciclo estral (Dia 0), as fêmeas foram tratadas com 2mg de benzoato de estradiol (BE) i.m. (RIC-BE[®], Syntex, Argentina) e com dispositivo intravaginal de progesterona (DIB[®], Syntex, Argentina) novos (n= 10 novilhas e 10 vacas) ou reutilizados (previamente utilizados por 16 dias; n= 10 novilhas e 10 vacas). Os animais do Grupo DIB3 uso+P4 (n= 10 novilhas e 10 vacas) receberam um DIB reutilizado mais 2mg de BE associado a 50 mg de P4 injetável (Progesterona 20mg/ml, Syntex, Argentina) no Dia 0. No D8, removeu-se os dispositivos e foi administrado 150mg de D-cloprostenol i.m. (PGF2 α ; Prolise[®], Syntex, Argentina) e 1mg de BE no Dia 9. Avaliou-se a dinâmica folicular por ultra-sonografia de 24/24 horas do Dia 0 ao Dia 8 e de 12/12 horas do Dia 9 ao Dia 12. Os dados foram analisados pelos testes de Anova, Qui-quadrado e Bartlett. Não houve interações entre vacas e novilhas nas variáveis analisadas, sendo os resultados para os Grupos DIBnovo, DIB3^ouso e DIB3^ouso+P4, respectivamente: Emergência da nova onda de crescimento folicular ($3,1\pm 0,22^{b,x}$, $2,8\pm 0,22^{b,x}$ e $4,2\pm 0,08^{a,y}$ dias; $p<0,05$), diâmetro máximo do folículo dominante ($1,42\pm 0,04$, $1,33\pm 0,03$ e $1,32\pm 0,03$ cm; $p> 0,05$), taxa de ovulação [95,0% (19/20); 95,0% (19/20) e 80,0% (16/20); $p> 0,05$] e momento da ovulação após a remoção dos dispositivos ($68,8\pm 2,2$, $71,4\pm 2,2$ e $66,4\pm 2,1$ h; $p>0,05$). O Grupo DIB3^ouso+P4 apresentou atraso no momento da emergência da nova onda de crescimento folicular, no entanto, esta foi mais sincronizada do que nos outros grupos. O DIB 3^ouso apresentou a mesma resposta que o DIB novo na sincronização da ovulação em vacas e em novilhas Nelore.

Agradecimentos: Tecnopec

TRANSFÊNCIA DE EMBRIÕES EM TEMPO FIXO EM NOVILHAS *Bos taurus* X *Bos indicus* TRATADAS COM eCG NO MOMENTO DA RETIRADA DO DISPOSITIVO INTRAVAGINAL DE PROGESTERONA E GnRH NA INOVULAÇÃO

Nasser, L.F.^{1,2}; Rezende, L.F.¹; Rezende, C.R.¹; Vieira, M.P.¹; Wisnesck, C.A.¹; Sá Filho, M.F.²,
Gimenes, L.U.²; Baruselli, P.S.²

¹FIRMASA, Campo Grande-MS, Brasil. ²Departamento de Reprodução Animal, FMVZ/ USP, São Paulo/SP, Brasil. barusell@usp.br

Avaliou-se o efeito da gonadotrofina coriônica equina (eCG) e/ou de um análogo de GnRH em protocolos de inovulação em tempo fixo (TETF) em novilhas *Bos taurus* x *Bos indicus*. Todas as fêmeas (n=239) apresentavam boa condição corporal (>3,0 escala de 1 a 5) e foram previamente examinadas por ultrasonografia (US; presença de corpo lúteo) e subdivididas em quatro grupos de acordo com a administração ou não de eCG (400UI, Folligon, Intervet, Brasil) na retirada do dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR, Pfizer, Brasil) ou do GnRH (Conceptal, Intervet, Brasil) no momento TETF (Fatorial 2 x 2). No início do tratamento (Dia 0) as fêmeas receberam um CIDR e 2mg de benzoato de estradiol i.m. (BE; Estrogin, Farmavet, Brasil) e ½ dose de PGF2 α (12,5mg de dinoprost, Lutalise, Pfizer, Brasil). No Dia 8, removeu-se o CIDR, e administrou-se 0,5mg de cipionato de estradiol (ECP, Pfizer, Brasil) e mais ½ dose de PGF2 α . O Grupo Controle não recebeu tratamento adicional, enquanto o Grupo eCG recebeu eCG no Dia 8 e o Grupo GnRH recebeu GnRH na TETF. O Grupo eCG+GnRH recebeu ambos os tratamentos. No Dia 16, as fêmeas foram avaliadas por US (CL \geq 18 mm de diâmetro) e receberam um embrião produzido *in vitro*. Os dados foram analisados no programa SAS. Não foram observadas interações entre os tratamentos, sendo os efeitos dos tratamentos com vs. sem eCG e com vs. sem GnRH, respectivamente: taxa de aproveitamento [89,9% (107/119) vs. 85,8% (103/120) e 87,3% (103/118) vs. 88,4% (107/121)]; taxa de concepção [49,5% (53/107) vs. 51,5% (53/103) e 51,5% (53/103) vs. 49,5% (53/107)] e a taxa de prenhez [44,5% (53/119) vs. 44,2% (53/120) e 44,9% (53/118) vs. 43,8% (53/121)]. Não foi observado efeito dos tratamentos sobre as variáveis analisadas (p>0,05). Isto possivelmente foi decorrente das ótimas condições de manejo nutricional e ciclicidade no início do tratamento. Conclui-se que, nas condições específicas deste experimento, os tratamentos com eCG ou com GnRH não promoveram incremento na eficiência de protocolos de TETF em novilhas.

Agradecimento: Pfizer

EFEITO DO NÚMERO DE IMPLANTES DE NORGESTOMET E DO MOMENTO DA ADMINISTRAÇÃO DO INDUTOR DE OVULAÇÃO EM VACAS HOLANDESAS SUPEROVULADAS

Rodrigues, C.¹; Mancilha, R.F.¹; Reis, E.L.²; Ayres, H.²; Gimenes, L.U.²;
Sá Filho, M.F.²; Baruselli, P.S.²

¹Clínica Samvet, São Carlos-SP, ² Dep. Reprodução Animal, FMVZ/USP,
São Paulo/ SP, Brasil. barusell@usp.br

Um total de 40 vacas holandesas (média de 39 litros/dia) foi subdividido em quatro grupos: 1CrestarGnRH48; 1CrestarGnRH60; 2CrestarGnRH48 e 2CrestarGnRH60 (fatorial 2x2). No Dia 0, as fêmeas receberam um ou dois implantes auriculares de Norgestomet (Crestar[®], Intervet, Brasil) e 3mg de benzoato de estradiol+100mg de progesterona i.m. (Index Farmacêutica, Brasil). A superestimulação foi realizada com 400 UI de FSHp (Pluset[®], Calier, Brasil) em 8 doses decrescentes a cada 12 horas a partir do Dia 4. No Dia 6, administraram-se duas doses (manhã e tarde) de PGF2 α (Preloban[®], Intervet, Brasil), e os implantes foram removidos 36 horas após a administração da primeira PGF2 α . Administrou-se GnRH i.m. (250 μ g, Fertagyl[®], Intervet, Brasil) 48 (GnRH48) ou 60 (GnRH60) horas após a administração da primeira PGF2 α . As inseminações em tempo fixo (IATF) foram realizadas 12 e 24 horas após o GnRH, sendo os touros utilizados distribuídos homogeneamente nos quatro tratamentos. A colheita dos embriões foi realizada no Dia 15. Os dados foram analisados por Anova e Qui-quadrado. Não houve interação entre as variáveis, sendo os efeitos para os tratamentos utilizando 1Crestar vs 2Crestar e GnRH48 vs GnRH60, respectivamente: número de CLs no Dia 15 (10,5 \pm 2,1 vs 9,6 \pm 1,8 e 10,2 \pm 2,1 vs 9,9 \pm 1,8; p>0,05), número de folículos >8mm no Dia 15 (2,6 \pm 0,4 vs 2,7 \pm 0,5 e 3,5 \pm 0,5^a vs 1,7 \pm 0,3^b; a \neq b, p<0,05), estruturas totais (8,4 \pm 2,3 vs 8,5 \pm 2,0 e 8,3 \pm 2,3 vs 8,6 \pm 2,0. p>0,05), embriões transferíveis (3,0 \pm 0,9 vs 3,8 \pm 1,2 e 2,7 \pm 0,8 vs 4,2 \pm 1,3; p>0,05) e embriões congeláveis (1,5 \pm 0,5 vs 3,0 \pm 1,0 e 1,6 \pm 0,6 vs 2,9 \pm 1,0; p>0,05). Pode-se observar que a adição de dois implantes de Norgestomet não influenciou as variáveis analisadas. O atraso de 12 horas para a aplicação do indutor de ovulação diminuiu o número de folículos >8mm na colheita (p<0,05). Apesar de não se observar aumento estaticamente significativo, a utilização de dois implantes (1,5 \pm 0,5 vs 3,0 \pm 1,0) e o atraso de 12h no indutor de ovulação (1,6 \pm 0,6 vs 2,9 \pm 1,0) aumentou o número de embriões congeláveis no protocolo de superovulação com IATF em vacas Holandesas de alta produção.

Agradecimentos: Intervet

SUPEROVULAÇÃO COM INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO EM DOADORAS *Bos indicus* TRATADAS COM FSHp OU COM eCG

Chiari, J.R.¹; Demétrio, D.¹; Sá Filho, M.F.²; Ayres, H.²; Baruselli, P.S.²

¹SAMVET, Morrinhos-GO. ²Dep. Reprodução Animal, FMVZ-USP, São Paulo-SP, Brasil.
samvetembrioes@vne.com.br; barusell@usp.br

Avaliou-se a utilização do hormônio folículo estimulante suíno (FSHp) ou da gonadotrofina coriônica equina (eCG) em protocolos de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo (SOTF) em doadoras Guzerá (*Bos indicus*). Um total de 8 fêmeas foram subdivididas em dois grupos (FSH e eCG). Cada fêmea recebeu ambos os tratamentos (FSH ou eCG; Cross-over) com intervalo de 60 dias. Empregou-se a mesma partida de sêmen por doadora em ambos os tratamentos. No Dia 0, todas as fêmeas receberam um implante auricular de Norgestomet (Crestar, Intervet, Brasil) e 2,0 mg de benzoato de estradiol + 50mg de progesterona i.m. (Index Farmacêutica, Brasil). No Dia 4, o Grupo FSH (n=8) foi superestimulado com 133mg de FSHp i.m. (Folltropin, Bioniche, Canadá) em 8 doses decrescentes com intervalo de 12 horas, enquanto que o Grupo eCG (n=8) recebeu dose única de 2000UI de eCG (Folligon, Intervet, Brasil). No Dia 6, foram administradas duas doses (manhã e tarde) de PGF2 α (Preloban, Intervet, Brasil) no Grupo FSH, enquanto que no Grupo eCG a segunda dose foi administrada na manhã do Dia 7. A remoção do implante foi realizada 24 horas (P24) e a administração de 250mg de GnRH (Fertagil, Intervet, Brasil) 48 horas após a primeira PGF2 α . Realizou-se a IA 12 e 14h após o GnRH. Avaliou-se a resposta por ultra-sonografia ovariana. Os dados foram analisados pelo teste de Anova. Os resultados para os Grupos FSH vs. eCG foram, respectivamente: folículos >8mm no dia da colheita (1,1 \pm 0,5 vs. 1,4 \pm 0,5; p>0,05), corpos lúteos no dia da colheita (6,9 \pm 1,2 vs. 7,0 \pm 1,2; p>0,05), total de estruturas (5,9 \pm 1,3 vs. 4,5 \pm 1,0; p>0,05), embriões transferíveis (4,4 \pm 1,3 vs. 2,9 \pm 1,0; p>0,05), embriões congeláveis (3,7 \pm 1,0 vs. 2,4 \pm 0,9; p>0,05), estruturas não fertilizadas (1,0 \pm 0,9 vs. 1,0 \pm 0,6; p>0,05) e estruturas degeneradas (0,5 \pm 0,3 vs. 0,6 \pm 0,3; p>0,05). Os resultados são sugestivos de que, mesmo com a redução numérica da quantidade de embriões viáveis, o tratamento com eCG possibilita diminuir o número de tratamentos para superovulação (8 para o FSH e 1 para o eCG) no protocolo de SOTF.

Agradecimento: Intervet

EFEITO DA SUPEROVULAÇÃO REPETIDA EM VACAS PARDO SUIÇO SOB CONDIÇÕES CLIMÁTICAS TROPICAIS

Solano, R.F.¹; Dias, J.M.B.¹; Solano, O.G.²

¹Universidade Estadual do Maranhão, Laboratório de Genética e Biotecnologia,

²Aluno de Iniciação Científica

O presente trabalho objetivou avaliar a eficiência de duas superovulações repetidas sobre a resposta ovárica em vacas Pardo suíço, utilizadas como doadoras em programas de transferência de embriões na fazenda Estrela, no município de Caxias, ao sul do Maranhão. Os animais foram manejados em sistemas de pastagem, suplementados com ração concentrada e sal mineral. O trabalho foi conduzido de setembro de 1997 a fevereiro de 1999. Neste período foram superovuladas 17 doadoras. Divididas aleatoriamente em GI (n=9) e GII (n=8) primeira e segunda superovulação com intervalos de 60 dias, empregando gonadotrofina sérica 300IU de FSH (Pluset, serono, Ltda) entre os dias 9 a 12 do ciclo estral, em ordem decrescente, por quatro dias com intervalo de 12 horas entre aplicações. No terceiro dia foi aplicada uma dose luteolítica de análogo de prostaglandina F2 α (500 μ g) e os animais foram inseminados 12 e 24 horas após aceitação da monta. A observação dos ovários foi realizada através da ultra-sonografia com transdutor linear de 5 MHz. As estruturas foram procuradas e avaliadas com o auxílio de um microscópio estereoscópio (70X) e classificadas conforme critérios da IEST. Os Valores médios e desvio padrão dos parâmetros avaliados nos GI e GII foram 6,44 \pm 1,21; 7,73 \pm 1,44 corpos lúteo; 4,78 \pm 0,95; 4,22 \pm 0,81 embriões colheitados e 3,17 \pm 0,78; 3,11 \pm 0,74 embriões normais respectivamente. O 44,4 % (4/9) e 50,0 % (4/8) das doadoras tiveram mais três embriões normais nas primeiras e segundas superovulação, As médias de folículos > de 10 mm observadas o dia da colheita foi de 4,22 \pm 1,16 e 3,61 \pm 0,97 nos GI e GII respectivamente. Concluímos que, a despeito do reduzido número de animais utilizados, os resultados indicam que as superovulação repetidas em intervalos de 60 dias não afeta à resposta em doadoras da raça Pardas suíço.

SUPERESTIMULAÇÃO EM VACAS DO GENÓTIPO MAMBI DE CUBA (3/4 H X 1/4 C) INDUZIDA COM FSH-P E PMSG EM CONDIÇÕES CLIMÁTICAS TROPICAIS

Solano, R.F.¹; Oliveira, S.A.¹; Carballo, J.I.²; Fuentes, D.S.²;
Veliz, J.²; Solano. O.G.³

(1) Universidade Estadual do Maranhão, (2) Universidade Estadual Havana-Cuba, (3) Acadêmico bolsista de Iniciação Científica. solanoferro@yahoo.com.br

Estudos prévios demonstraram que as vacas criadas em clima tropical apresentam maior sensibilidade as gonadotrofinas que aquelas criadas em clima temperado. O estudo objetivou comparar diferentes gonadotrofinas na superestimulação de 40 vacas do genótipo Mambi de Cuba (3/4 H x 1/4 Z) e analisar alguns fatores de variações, ambientais e fisiológicas que podem afetar a resposta ovariana. Para induzir a superestimulação os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos GI (n=15) tratados com PMSG 2,000 UI dose única; 48 horas depois 500µg de PGF2α e GII (n=25) receberam 220 mg de FSH-P (Folltropin-Vetrepharm, Canadá), fracionados em 8 aplicações decrescentes (35mg Bid; 30mg Bid; 25mg Bid; 20mg Bid) a cada 12 horas durante 4 dias. Sendo que com a 5ª aplicação de FSH as doadoras receberam 500mg de PGF2α (Estrumate, ICI 80996). Os embriões foram colhidos pelo método não-cirúrgico, nos dias 7 e 8 após à inseminação artificial. Os ovários foram examinados por laparoscopia no dia da colheita. Analisou-se o número de corpos lúteos (CL), estruturas recuperadas (ER) e embriões viáveis (EV). Os resultados foram analisados pelo método de classificação simples e comparação de proporções χ^2 (qui-quadrado). As médias de CL e EV foram significativamente superiores ($P < 0,05$) nas doadoras tratadas com FSH-P ($8,30 \pm 1,15$ vs $5,50 \pm 0,85$) do que nas tratadas com PMSG ($5,20 \pm 1,64$ vs $2,13 \pm 2,12$, respectivamente). Houve uma tendência ($P < 0,06$) para os folículos persistentes ($2,83 \pm 0,15$ vs $4,52 \pm 0,82$) nos GI e GII. Em 13,3% (2/15) das doadoras tratadas com PMSG, foi observada degeneração prematura do CL, e coletaram-se estruturas não fertilizadas. A taxa de embriões viáveis foi significativamente superior ($P < 0,05$) nas doadoras superestimuladas com FSH-P (66,6 %). Conclui-se que a superestimulação com FSH-P é mais eficiente que a PMSG em vacas desta raça.

ADMINISTRAÇÃO DE DIETAS COM SEMENTES DE CANOLA E LINHAÇA NA RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA, PRODUÇÃO E QUALIDADE DE EMBRIÕES EM VACAS NELORE*

Albuquerque, K.P.¹; Capovilla, L.C.T.²; Prado, I.N.^{3**}; Cavaliere, F.L.B.²; Rigolon, L.P.R.²; Ramos, F.S.⁴; Tesolin, L.C.⁵

¹Doutoranda de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá - UEM Av: Colombo, 5790 - 87020-900 Maringá-PR. ²Professor Doutor do Centro Universitário de Maringá - CESUMAR Av: Guedner, 1610, 87050-390 Maringá-PR. ³Professor Doutor Titular do Departamento de Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá - UEM Av: Colombo, 5790 - 87020-900 Maringá-PR. ^{**}Pesquisador Bolsista de Produtividade CNPq. ⁴Médica Veterinária do Centro Universitário de Maringá - CESUMAR Av: Guedner, 1610 - 87050-390 Maringá-PR. ⁵Aluna de Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá - UEM Av: Colombo, 5790 - 87020-900 Maringá-PR. lcapovilla@wnet.com.br

* Dados preliminares de tese de doutorado em andamento no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (PPZ) da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

A suplementação com lipídeos tem sido estudada por causar efeitos benéficos na reprodução, como o aumento na concentração sanguínea de progesterona, tamanho do folículo ovulatório, número de folículos ovarianos, modulação do corpo lúteo, taxa de concepção e gestação (Staples et al., 1996). O objetivo foi avaliar o efeito das fontes lipídeos ricos em ômega-9 (semente de canola - CAN) e ômega-3 (semente de linho - LIN) em comparação a ausência de lipídeos (SLI) sobre a resposta superovulatória, produção e qualidade de embriões em vacas Nelore. O experimento foi realizado na Fazenda Experimental de Iguatemi-UEM. Foram usadas 17 vacas Nelore (P.O.) alojadas em baias individuais de 10m². O período de alimentação foi 46 dias que correspondem 30 dias antes do protocolo até a colheita dos embriões. As vacas foram distribuídas aleatoriamente em um dos tratamentos que foram: SLI (n=6), CAN (n=6) e LIN (n=5). As dietas foram formuladas de segundo NRC (1996), sendo isoproteicos e isoenergéticos. A ração total do tratamento SLI foi: casca de algodão, milho, farelo de algodão, calcário e sal mineral 90. O tratamento CAN foi: de casca de algodão, semente de canola, milho, calcário e sal mineral 90. O tratamento LIN foi: casca de algodão, farelo de algodão, semente de linho, milho, calcário e sal mineral 90. As vacas foram sincronizadas com implante auricular, contendo 3,0 mg de norgestomet (D0) e aplicação de 2,5 mg de VE no D1 cedo. No D5, iniciou a superovulação por quatro dias, sendo o total de 250 UI de FSH. No D7 cedo foi aplicado 2 ml de PGF2 α . No D8 o implante foi retirado e 12 horas após aplicado hCG. No D10 as vacas foram inseminadas no período da tarde e manhã do dia seguinte. A resposta superovulatória foi obtida através da palpação retal. A colheita foi realizada através de prática de rotina. A avaliação dos embriões quanto ao estágio de desenvolvimento e qualidade foi feita segundo a classificação proposta pelo manual do IETS - International Embryo Transfer Society (1999): grau I (excelente ou bom), grau II (regular), grau III (pobre) e grau IV (morto ou degenerado). Nos três tratamentos foi observada presença de corpos lúteos, sendo, 83% para SLI, 83% para CAN e 100% para LIN. As estruturas recuperadas, para o tratamento SLI, foram 6,4 estruturas totais, 5,4 estruturas transferíveis, não houve estruturas degeneradas e 1,0 estruturas não fertilizadas. Para o tratamento CAN, 11,5 estruturas totais, 7,5 estruturas transferíveis, 2,3 estruturas degeneradas e 1,8 estruturas não fertilizadas. Para o tratamento LIN, 8,0 estruturas totais, não houve estruturas transferíveis, 2,8 estruturas degeneradas e 5,2 estruturas não fertilizadas. Referente a qualidade dos embriões, para o tratamento SLI 52% de ocorrência de embriões grau I, 33% embriões grau II e 15 % de embriões grau III. Para o tratamento CAN, 64% de embriões grau I, 18% de embriões grau II e 18 % de embriões grau III.

RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA EM NOVILHAS NELORE (*Bos indicus*) TRATADAS COM 250 OU 500 UI DE FSHp

Santiago, L.L.¹; Torres, C.A.A.²; Nogueira, E.T.³; Amorin, L.²;
Sá Filho, M.F.¹; Gimenes, L.U.¹; Baruselli, P.S.¹

¹Departamento de Reprodução Animal, FMVZ/USP, São Paulo/ SP; ²Departamento de Zootecnia, UFV – Viçosa/ MG; ³ Rua Joaquim Távora, 541, São Paulo/SP, CEP 04015-001, Brasil.
s21luciene@hotmail.com e barusell@usp.br

O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta superovulatória em 27 novilhas Nelore, tratadas com diferentes doses de FSHp (Pluset[®]; 250 UI – n=13 ou 500 UI – n=14). A hipótese era que animais superovulados com a maior dosagem teriam uma resposta superovulatória inferior devido ao produto apresentar 50% FSH; 50% LH. O tratamento superovulatório foi iniciado nove dias após o estro, sendo administradas 8 subdosagens decrescentes, num total de 10 mL, com aplicação de PGF2 α concomitante com a sexta e sétima dose de FSH. As novilhas foram inseminadas às 12, 20 e 28 horas após o estro. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa SAS (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA). Diferenças entre as médias foram calculadas pelo Teste *t*-Student. Todos os animais tratados com 250 UI responderam ao tratamento superovulatório (vs 64% com 500 UI de FSHp), havendo uma tendência para maior quantidade de estruturas recuperadas com 250 UI ($8,9 \pm 1,6$ vs $4,6 \pm 1,8$, $p = 0,10$). Entretanto, o tratamento com 250 UI de FSHp demonstrou uma tendência de maior número de embriões degenerados ($3,4 \pm 0,8$ vs $1,5 \pm 0,7$, $p = 0,09$) e teve maior quantidade de estruturas não-fertilizadas ($1,0 \pm 0,4$ vs $0,1 \pm 0,1$, $p=0,03$). Não houve diferença estatística para os tratamentos com 250 ou 500 UI de FSH, respectivamente, com relação à média de estruturas fertilizadas ($7,7 \pm 1,5$ vs $4,4 \pm 1,8$, $p = 0,20$), viáveis ($4,5 \pm 0,9$ vs $3,0 \pm 1$, $p = 0,37$) e congeláveis ($3,7 \pm 0,8$ vs $2,1 \pm 0,9$, $p = 0,22$), contudo houve diferença numérica nestes três parâmetros. Em conclusão, os resultados deste estudo confirmam os achados de estudos anteriores que são indicativos de que o tratamento com 500 UI de FSHp em novilhas Nelore pode ter causado prévia luteinização dos folículos (SANTIAGO et al., IRAC -2005) durante a superovulação pela presença de LH. Entretanto, estudos com maior número de animais por tratamento seria de grande valia para corroborar os dados preliminares do presente trabalho.

Referência bibliográfica:

L.L. Santiago, C.A.A. Torres, E.T. Nogueira, E.A. Moraes, M.F.Sá Filho, P.S. Baruselli. Concentração plasmática de progesterona e de estradiol em novilhas nelore (*Bos indicus*) tratadas com 250 ou 500 UI de FSHp. In: Anais do VI Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba, Junho 2005.

TRANSFERÊNCIA DE GAMETAS EM OVIDUTO DE FÊMEAS BOVINAS COM OVULAÇÕES ÚNICA E MÚLTIPLAS

Carvalho, N.A.T.^{1,2}; Gimenes, L.U.¹; Sá Filho, M.F.¹; Vannucci, F.S.¹; Reichert, R.H.²;
Carvalho, J.B.P.³; Andrade, J.B.⁴; Pires, R.M.L.⁴; Alvarez, R.H.⁴; Meirelles, F.V.⁵;
Chiari, J.R.⁶; Baruselli, P.S.¹

¹Departamento de Reprodução Animal, FMVZ-USP-SP, CEP:05508-000; ²APTA-Vale do Ribeira;
³APTA-Pindamonhangaba; ⁴IZ-Nova Odessa; ⁵FZEA-USP; ⁶SAMVET, Morrinhos-GO.
nelcio@usp.br

Objetivou-se aferir o transporte de gametas bovino e bubalino pelo sistema genital de vacas bovinas com ovulações única e múltiplas. Foram utilizadas 8 vacas, divididas em 4 grupos (fatorial 2x2). Todas as fêmeas receberam 2mg de benzoato de estradiol i.m. (Estrogin[®], Farmavet, Brasil) e um dispositivo intravaginal de progesterona (DIB[®], Syntex, Argentina) em dia aleatório do ciclo estral (Dia 0). No Dia 4, os animais dos G2 e G4 (ovulações múltiplas), receberam a aplicação de 2.500UI de eCG i.m. (Novormon[®], Syntex, Argentina). No Dia 8, o DIB[®] foi removido e 0,150mg de PGF2 α foi administrada i.m. (Prolise[®]) em todas as vacas, sendo que nas fêmeas dos G1 e G3 (ovulação única) foram também administrados 400UI de eCG (Novormon[®]). No Dia 9, administrou-se GnRH i.m. (Gestran Plus[®]; 50 μ g de Lecirelina, Arsa, Argentina) e, após 12 e 24 hs, as vacas foram inseminadas com sêmen bovino (G1 e G2) e de búfalo (G3 e G4). No Day 10, todas as fêmeas foram submetidas à laparotomia do flanco direito e à exposição do oviduto ipsilateral à ovulação (G1 e G3) ou ipsilateral ao maior número de ovulações (G2 e G4). Nos G1 e G2 foram inseridos no infundíbulo 10 oócitos bovinos maturados e no G3 e G4 10 oócitos bubalinos maturados. A recuperação das estruturas embrionárias foi realizada por lavagens uterinas transcervicais no Dia 15 para o G3 e G4 e no Dia 16 para o G1 e G2 com 1L de DPBS (Cultilab[®]). As taxas de ovulação para os G1, G2, G3 e G4 foram, respectivamente: 100,0 \pm 0,0%, 89,2 \pm 2,5%, 100,0 \pm 0,0%, 93,7 \pm 6,2%. Foram recuperados 8 embriões no G2 (23,5%; 8/34 – gametas transferidos + ovulações) e 1 embrião no G3 (9,1%; 1/11). No G1 e no G4 não foram recuperadas estruturas. A manipulação dos ovidutos para a inserção dos oócitos promoveu edema do órgão, o que pode ter comprometido o transporte dos gametas, ocasionando baixa taxa de recuperação embrionária. Agradecimentos: FAPESP (2003/00798-0), Tecnopec, Syntex, Cultilab e IZ Nova Odessa (IZ-APTA).

INFLUÊNCIA DO ESTAGIO DE DESENVOLVIMENTO NA TAXA DE GESTAÇÃO DE HEMI-EMBRIÕES

Fernandes, C.A.C.¹; Oba, E.²; Figueiredo, A.C.S.³; Ludgero, B.F.A.³; Oliveira, E.R.³; Gioso, M.M.⁴

¹Bolsista FAPESP, Pós-Doutorando Unesp-Botucatu-18618-000, Brasil; ²Profa. RARV-Unesp-Botucatu; ³Biotran Ltda; ⁴Doutoranda Unesp-Botucatu.

Uma das alternativas para se aumentar a taxa de gestação no caso de programas de transferência de embriões seria a bipartição dos mesmos. Embriões de qualidade boa e excelente poderiam ser bipartidos originando 2 hemi-embriões, dos quais a taxa de gestação somada seria superior ao embrião intacto que os originou (Khurana & Niemann, 2000). Além da qualidade, o estágio de desenvolvimento do embrião original pode alterar a taxa de gestação final. O objetivo principal deste trabalho foi verificar a taxa de gestação de hemi-embriões originados de estruturas intactas de diferentes estágios de desenvolvimento. Foram bipartidos embriões no estágio de mórula á blastocisto, com avaliação morfológica excelente (grau 1). Os embriões, bipartidos ou não, foram transferidos pela mesma técnica. Foram assim distribuídos para as receptoras. Grupo 1 (Controle – n=50) embrião intacto. Grupo 2 (hemi-mórulas–n=18), grupo 3 (hemi-blastocistos iniciais–n=19), grupo 4 (hemi-blastocistos–n=22). Foram comparadas pelo teste de χ^2 entre os grupos, as taxas de gestação média aos 28-31 dias, avaliadas por ultra-sonografia. Em relação ao total de embriões originais utilizados por grupo, a taxa de gestação aos 28-31 dias foi de 55,77^a; 62,50^a; 87,50^b e 109,09%^c para os grupos 1, 2, 3 e 4 respectivamente (P<0,05). Embora a bipartição de embriões no estágio de mórula seja mais fácil, pois independe da orientação, o menor número de células em embriões neste estágio favorece a maior perda (Escriba et al., 2002). Blastocistos, por apresentarem células em maior número e menor tamanho provavelmente apresentam menor perda de estabilidade e coesão da massa celular, daí a melhor taxa de gestação em hemi-embriões originados de outros de estágios mais avançados. Resultados semelhantes foram conseguidos neste trabalho, onde blastocistos iniciais e blastocistos bipartidos apresentaram melhores taxas de gestação.

ESCRIBA, M.J. et al. J. Reprod. Immunol.,55; 2,149-161, 2002.

KHURANA, N.K. & NIEMANN,H. Theriogenology, 54; 2, 313-326, 2000.

CARACTERÍSTICAS DA PREENHEZ DERIVADA DE HEMI EMBRIÕES BOVINOS RECONSTITUÍDOS *IN VITRO*¹.

Alvarez, R.H.²; Amaral, J.B.²; Pires, R.M.L.²; Martinez, A.C.²; Oba, E.³

²Centro de P&D Genética e Reprodução Animal, Instituto de Zootecnia-APTA, Nova Odessa-SP, 13460-000, Brasil. ³Depto de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ-UNESP, Botucatu-SP, Brasil. herrera@iz.sp.gov.br

Existe evidencia na literatura mostrando que as condições de manipulação e cultura *in vitro* dos embriões bovinos provocam alterações no padrão normal da gestação, do tamanho e do peso do bezerro. O presente estudo objetivou avaliar algumas características da prenhez após transferência de hemi embriões bovinos reconstituídos *in vitro*. Embriões (mórulas GI) recuperados de vacas Nelore e Caracu superovuladas foram distribuídos em três grupos experimentais. O grupo 1 foi formado por embriões intactos (inteiros) transferidos em receptoras (vacas e novilhas) imediatamente após a coleta (n= 36). O grupo 2 por hemi embriões transferidos (uma metade em cada receptora) após bipartição com micro lamina (n=38) e o grupo 3 por hemi embriões que evoluíram a blastocisto após cultura (em meio EARLE + 10% SFB em ambiente de 38,5°C e 5% CO₂) durante 24 horas antes da transferência (n=34). Os dados foram analisados por Anova e pelo teste não paramétrico de χ^2 . A taxa de desenvolvimento a blastocisto dos hemi embriões cultivados *in vitro* foi de 78,6%. A taxa de prenhez (aos 45 dias) dos grupos 1, 2 e 3 foi de 52,8%, 47,4% e 52,9%, respectivamente (P>0,05). A taxa de partição foi de 30,6%, (grupo 1), 26,3% (grupo 2) e 29,4% (grupo 3) (P>0,05). O peso médio (\pm epm) dos bezerros ao nascimento foi de 38,0 \pm 4,2 kg (grupo 1), 32,4 \pm 2,5 kg (grupo 2) e 36,2 \pm 2,6 kg (grupo 3) (P>0,05). Esses resultados sugerem que embriões bipartidos com ou sem cultura intermediária, antes da transferência, podem não afetar as características padrão de prenhez ou o peso dos bezerros.

¹Apoio: FAPESP

TAXA DE GESTAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS INTACTOS OU BIPARTIDOS

Fernandes, C.A.C.¹; Oba, E.²; Figueiredo, A.C.S.³; Gioso, M.M.⁴

¹Bolsista FAPESP, Pós-Doutorando Unesp-Botucatu-18618-000, Brasil; ²Profa. RARV-Unesp-Botucatu; ³Biotran Ltda; ⁴Doutoranda Unesp-Botucatu.

Embriões de qualidade boa e excelente poderiam ser bipartidos originando 2 hemi-embriões, dos quais a taxa de gestação somada seria superior ao embrião intacto que os originou (Khurana & Niemann, 2000). Uma alternativa para a redução do número de receptoras necessárias no caso da bipartição seria a inovulação dos dois hemi-embriões em uma mesma receptora (Lopes et al. 2001). O objetivo principal deste trabalho foi verificar a taxa de gestação de embriões intactos e um ou dois hemi-embriões, num programa comercial de transferência de embriões em bovinos. Somente foram bipartidos embriões no estágio de mórula compacta á blastocisto, com avaliação morfológica excelente (grau 1). Os embriões, bipartidos ou não, foram transferidos pela mesma técnica. Foram assim distribuídos para as receptoras. Grupo 1 (Controle – n=50) embrião intacto. Grupo 2 (1 hemi-embrião – n=50). 1 hemi-embrião. Grupo 3 (2 hemi-embriões – n=50) os dois hemi-embriões provenientes de uma bipartição. Estes dois hemi-embriões serão transferidos em conjunto. Foram comparadas pelo teste de χ^2 entre os grupos, as taxas de gestação média aos 28-31 e 60-80 dias, avaliadas por ultra-sonografia. Em relação ao total de embriões originais utilizados por grupo a taxa de gestação aos 28-31 dias foi de 55,77^a; 88,88^b e 60,78%^a para os grupos 1, 2 e 3 respectivamente (P<0,05). Aos 60-80 dias a taxa de gestação foi de 51,92^a; 70,37^a e 52,94%^a para os grupos 1, 2 e 3 respectivamente (P>0,05). A maior perda embrionária entre os dois períodos de avaliação da gestação no grupo 2, fez que a diferença inicialmente significativa entre os grupos, em relação a esta variável, observada ao primeiro período, existisse aos 60-80 dias. Os resultados mostram que a taxa de gestação de hemi-embriões deve ser avaliada mais tardiamente, pois a incidência de perda embrionária é maior.

KHURANA, N.K. & NIEMANN, H. Theriogenology, 54; 2, 313-326, 2000.

LOPES, et al. Theriogenology, 58; 1383-1392, 2001.

EFICÁCIA DA BIPARTIÇÃO DE EMBRIÕES DA RAÇA NELORE QUANTO À TAXA DE PREENHEZ

Silveira, E.C.¹; Constantino-Max, M.²; Blaschi, W.³; Padilha, L.C.³; Francisco, R.C.¹; Pansard, H.S.¹; Bortolotti, L.A.¹; Sgobero Filho, I.¹; Seneda, M.M.³

¹ Produtiva – Centro de Tecnologia Pecuária, Londrina –Pr, 86060-450, Brasil. ² Médica Veterinária autônoma, Londrina-Pr, ³ Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, 86051-990, Brasil. produtiva@zipmail.com.br

Com o objetivo de potencializar a produção embrionária *in vivo*, avaliou-se a relação entre as taxas de prenhez em embriões bovinos inteiros e bipartidos da raça Nelore. Com a utilização de microscópio invertido (Nikon®, TMS) e do micromanipulador (Narishige®, MN 151), foi possível bipartir mórulas e blastocistos classificados como de ótima qualidade. Utilizou-se como meio de bipartição Splitting - plus (AB-Nutricell®), e meio de cultivo Holding - Plus (AB-Nutricell®). Foram utilizados 39 embriões obtidos *in vivo* para o processo de bipartição. Obteve-se 78 hemi-embriões, transferidos imediatamente para receptoras previamente preparadas. Para fins de comparação, 125 embriões inteiros foram obtidos e transferidos sob as mesmas condições. Todas as receptoras foram submetidas a avaliação ultrassonográfica 60 dias após a transferência dos embriões, para diagnóstico de prenhez. Obteve-se uma taxa de 53,2% (42/78) de prenhez para as receptoras submetidas a TE com hemi-embriões. Para os embriões transferidos inteiros, a taxa de prenhez foi de 61.6% (77/125). Dos 39 embriões submetidos à bipartição, obtêve-se 42 prenhez, resultando em uma taxa de aproveitamento embriões/prenhez de 107,7%. Os resultados obtidos demonstram a bipartição embrionária para a raça Nelore como sendo uma alternativa viável para incremento na produção de embriões, particularmente, nas situações em que a produção *in vitro* não puder ser realizada, e/ou para as doadoras com boa capacidade de produção *in vivo* de embriões.

BISSECÇÃO DE EMBRIÕES CAPRINOS – RESULTADOS PRELIMINARES

Rêgo, T.P.¹; Souza, J.A.²; Melo, M.V.L.C.C.³; Carmo, D.R.³; Sobrinho, J.M.F.¹; Santos, P.A.C.¹;

¹Pós-graduanda em Ciência Animal/UFPI; ²Departamento de Clínica Veterinária/UFPI
(adalmir@ufpi.br); ³Médicos Veterinários Autônomos

Na micromanipulação de embriões várias são as opções de pesquisa: transferência de genes, determinação do sexo, estudo da relação entre núcleo e citoplasma, micromanipulação de blastômeros e bissecção de embriões, sendo esta a opção mais viável (BEM et al., 1987). A bissecção consiste na divisão mecânica de embriões obtendo-se produtos geneticamente iguais, chamados gêmeos monozigóticos ou verdadeiros. Nos animais domésticos os primeiros trabalhos foram realizados em ovelhas (WILLADSEN, 1979) e bovinos (WILLADSEN & POLGE, 1981). No Brasil, trabalhos em bovinos (BEM, 1987), caprinos (SALLES, 2001) e eqüinos (SILVEIRA, 2004) têm sido realizados. Em programas comerciais de transferência de embriões, a perspectiva de utilização da bissecção é muito importante por permitir elevar o número de gestações por colheita. O objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização da técnica de bissecção em caprinos. Utilizou-se dez fêmeas da raça Boer como doadoras, sincronizadas com progesterona (CIDR, Pharmacia, Brasil) durante 11 dias e superovuladas com 500 UI de FSH/LH (Pluset, Calier, Espanha), em doses decrescentes, de 12 em 12 horas, durante três dias, a partir do nono dia da colocação do implante. As coberturas foram realizadas na primeira detecção de estro e a cada 12 horas, até cessação dos sintomas. As receptoras foram sincronizadas com progestágenos (Esponja, Syntex, Argentina), receberam 300 UI de eCG (Folligon, Intervet) e 75µg de Cloprostenol (Ciosin, Coopers). As colheitas foram realizadas via cervical, no sétimo dia após a primeira cobertura, com o auxílio de um espelho, pinças e sonda nasogástrica. Das 80 estruturas recuperadas, 39 (mórulas ou blastocistos) de qualidade I e II foram utilizadas. De cada três embriões obtidos, um foi bipartido e as metades inovuladas na mesma receptora, enquanto os embriões inteiros foram inovulados aos pares. Para bissecção, utilizou-se um micromanipulador composto por dois braços apoiados sobre uma base adaptada a uma lupa estereomicroscópica. O embrião foi fixado por uma micropipeta de sucção, mantida em um dos braços e posicionado de modo a permitir que uma lâmina acoplada ao segundo braço realizasse o corte. Em seguida, os hemi-embriões foram envasados e inovulados por semi-laparoscopia. O diagnóstico de gestação foi realizado por ultra-sonografia trans-abdominal, 30 dias após as inovulações. Das 13 receptoras inovuladas com embriões inteiros, sete (53,84%) apresentaram prenhez, quatro com dois embriões (42,31% do total de embriões transferidos). Das 13 que receberam hemi-embriões, duas (15,38%) apresentaram prenhez de um embrião e uma (7,69%) apresentou prenhez de dois (30,76% do total de embriões transferidos). Embriões partidos em estágio de mórula, independente do grau de qualidade, não resultaram em gestação, já em estágio de blastocisto o índice foi 66,60% para estruturas de qualidade I. Os dados permitem concluir que o estágio de mórula não é indicado para bipartição em caprinos e que uma rigorosa classificação dos embriões é necessária para obtenção de melhores resultados.

FERTILIDADE DE RECEPTORAS E SOBREVIVÊNCIA EMBRIONÁRIA APÓS TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES DE OVINOS MORADA NOVA (VARIEDADE BRANCA) SUBMETIDOS A DOIS PROTOCOLOS DE DESCONGELAÇÃO

Lopes Júnior, E.S.¹; Maia, E.L.M.M.¹; Teixeira, D.I.A.¹; Padilha, R.T.¹; Almeida, A.P.¹;
Lima, I.M.T.¹; Albuquerque, C.P.¹; Pinheiro, E.S.P.¹; Rondina, D.¹;
Villaroel, A.B.S.²; Freitas, V.J.F.¹.

¹ Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução - FAVET/UECE, 60740-000, Fortaleza-CE, Brasil. ² Centro de Ciências Agrárias - FZ/UFC, 60455-760, Fortaleza-CE, Brasil. vjff@uece.br

Diferente do etilenoglicol, o uso de sacarose na descongelação de embriões bovinos requer um protocolo simplificado que reduz o tempo deste processo (Niemann H., Theriogenology, v. 17, p. 102). Todavia, poucos estudos sistemáticos têm sido realizados para determinar o protocolo ideal a ser utilizado no processo de descongelação de embriões ovinos. Assim, este estudo teve o objetivo de avaliar a sobrevivência embrionária após a transferência de embriões de ovelhas Morada Nova [variedade branca (MNb)], criopreservados em etilenoglicol (ETG) e descongelados em ETG ou sacarose (SAC). Para tanto os embriões foram submetidos a congelamento lento (Baril G., Manual de Formación Práctica para el Trasplante de Embriones en Ovejas y Cabras, 182p), utilizando 1,5 M de etilenoglicol em um congelador programável (Dominium K, BIOCUM, Brasil). Os estros de 14 ovelhas mestiças foram sincronizados com esponja vaginal impregnada com 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (Progespon[®], Syntex, Buenos Aires, Argentina) por 14 dias. No momento da retirada da esponja, as ovelhas receberam 300 UI de eCG. Pouco antes da inovulação, a qual ocorreu seis dias após o início do estro, os embriões foram descongelados por imersão em banho-maria a 37° C durante 30 segundos e, em seguida, transferidos para soluções contendo ETG (n = 17) ou SAC (n = 13). No grupo ETG, os embriões foram imersos em concentrações decrescentes, em intervalos de cinco minutos, de ETG (1,5 M, 1,0 M, 0,5 M, 0,0 M), enquanto os embriões do grupo SAC foram imersos em duas soluções de 0,25 M e mais duas de 0,0 M de SAC, em intervalos de cinco minutos. Em seguida, as receptoras foram submetidas a uma laparoscopia para avaliação ovariana, seguida de inovulação, a qual foi realizada por semi-laparoscopia. Cada receptora com, pelo menos, um corpo lúteo funcional, recebeu de dois a três embriões nos grupos ETG (n = 7) e SAC (n = 7). O diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias após a inovulação através de ultra-sonografia transretal, usando um aparelho modo B de tempo real (240 Parus, Pie Medical, Holanda), equipado com um transdutor de 6-8 MHz. Os dados foram expressos como média ± e.p. ou em percentagem. As taxas de sobrevivência embrionária e fertilidade foram comparadas pelo teste do Qui-quadrado. Foi observado 100,0% das receptoras em estro. O intervalo entre a retirada da esponja e início do estro foi de 33,7 ± 5,8 h, enquanto a taxa de ovulação foi de 2,0 ± 0,3. O grupo ETG mostrou uma maior sobrevivência embrionária (ETG = 55,6% vs. SAC = 0,0%; P<0,05) assim como uma maior taxa de fertilidade (ETG = 57,1% vs. SAC = 0,0%; P < 0,05). Os dados permitem concluir que a descongelação com ETG mostrou-se ser o método mais eficiente para promover melhores taxas de fertilidade e de sobrevivência embrionária em programas de MOTE que usam embriões congelados-descongelados de ovelhas MNb.

**CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE PROGESTERONA EM OVELHAS
OVARIECTOMIZADAS TRATADAS COM PROGESTERONA DE LONGA
DURAÇÃO(P4LA-150)**

Almeida, A.K.¹; Martins, L.E.P.¹; Biscarde, C.E.A.¹; Neves, T.A.¹; Chalhoub, M.¹; Ribeiro Filho, A. de L.¹; Bringel, B.A.²; Douglas, R.H.² Gusmão, A.

¹Escola de Medicina Veterinária/UFBA, Salvador-BA, 40170-110, Brasil. ²Bet Labs, Lexington - Kentucky, 40511-1209, USA. gusmao@ufba.br rhdouglas1222@aol.com

A sincronização do estro em ovelhas vem sendo amplamente realizada com implantes, dispositivos intravaginais ou esponjas impregnados de progesterona, por 12 ou 14 dias em tratamentos de longa duração, ou por 5 ou 6 dias em tratamentos de curta duração. A redução da mão de obra e a eliminação no risco de perdas de dispositivos vaginais e incidência de vaginites poderiam ser viabilizadas pela utilização de uma progesterona de longa ação aplicado em dose única. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação de uma progesterona de longa ação (Biorelease P4LA-150, BbioRelease Technologies) na manutenção dos níveis sérico de progesterona em ovelhas ovariectomizadas. Foram utilizadas quatro ovelhas ovariectomizadas sendo duas da raça Santa Inês e duas mestiças de Santa Inês x Dorper, mantidas em sistema intensivo. As ovelhas foram ordenadas ao acaso em um quadrado latino de tal maneira que cada ovelha foi tratada por via intramuscular com as seguintes doses de Biorelease P4LA-150: 0, 75, 150 e 300 mg. Amostras de sangue foram colhidas, de todos os animais, antes da aplicação da progesterona e no D1 (dia 1); D2; D5; D7; D8; D9; D10; D11 e D12 após a aplicação. As análises da progesterona sérica foram realizadas por radioimunoensaio em fase sólida (DPC – Medlab) e os dados avaliados por análise de variância. Os resultados mostraram que as concentrações de 75 e 150 mg mantiveram os níveis séricos de progesterona acima de 1 ng/mL até o D5 e a dose de 300 mg até o D9. Em suma, a P4LA-150, nas doses testadas, pode ser utilizada para a manutenção dos níveis séricos de progesterona acima de 1 ng/mL até o D5 ou D9. Estudos com animais cíclicos precisam ser realizados para a comprovação da eficácia do produto e das doses testadas, em protocolos de sincronização do estro em ovelhas.

RESPOSTA SUPEROVULATÓRIO DE CABRAS SAANEN LACTANTES A PROTOCOLOS CURTOS E A SOMATOTROPINA BOVINA RECOMBINANTE (rbST)*

Fonseca, J.F.¹; Viana, J.H.M.²; Bruschi, J.H.²; Zambrini, F.N.²; Palhão, M.P.²; Santos, A.F.A.²

¹Embrapa Caprinos, Estrada Sobral/Groaíras, Km 4, CP D10, Cep 62.011-000, Sobral-CE, Brasil, jeferson@cnpq.embrapa.br. ²Embrapa Gado de Leite, Rodovia MG 133, Km 42, 36.155-000, Cel Pacheco-MG, Brasil.

O objetivo deste estudo foi testar a eficiência de dois protocolos sobre a resposta superovulatória em cabras. Cinco cabras lactantes Saanen foram testadas em modelo cross-over em dois tratamentos (T1 e T2). Em ambos tratamentos, dispositivos intravaginais contendo progesterona (CIDR[®]) foram inseridos (dia 0) e removidos seis dias depois (dia 6) e 22,5 µg cloprostenol foram administradas pela via submucosa vulvar (dia 0). No dia 4, as cabras começaram a receber seis doses decrescentes de FSH (250 a 400 UI) intervaladas de 12 horas. Três doses de 50 mg flunixin meglumine foram administradas nos dias 9, 10 e 11 (IM). Em T1 e T2, os animais receberam duas doses de salina ou 250 mg rbST (IM) nos dias 0 e no momento da primeira detecção de estro, respectivamente. As cabras foram acasaladas até o final do estro e a colheita de embriões foi realizada pelo método transcervical sete dias após a primeira cobertura. O intervalo entre superovulações foi superior a 60 dias. Uma cabra não respondeu ao T2. Uma cabra apresentou 27 (19 oócitos) e 26 (22 oócitos) estruturas para T1 e T2, respectivamente. O número total de estruturas ($18,4 \pm 9,4$ e $15,7 \pm 11,0$) e as percentagens de oócitos (29,3 e 34,9), embriões viáveis (63,0 e 52,4), grau-1 (29,3 e 30,2), grau-2 (20,7 e 6,3), grau-3-4 (13,0 e 15,9) e degenerados (7,6 e 12,7) não diferiram ($P > 0,05$) entre T1 e T2, respectivamente. Protocolo curto de exposição à progesterona foi eficiente para a superovulação de cabras Saanen lactantes, mas a associação com rbST não elevou a quantidade nem a qualidade das estruturas recuperadas.

*Suporte financeiro: CAPRIMA, CNPq e Pfizer Saúde Animal.

RESULTADOS PRELIMINARES COM UM NOVO TRATAMENTO DE SUPEROVULAÇÃO EM CAPRINOS: PROTOCOLO DIA 0.

Menchaca, A.¹; Vilariño, M.¹; Rubianes, E.²

¹Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria; ²Departamento de Producción Animal, Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay. alejomen@adinet.com.uy

Uma maior resposta superovulatoria e lograda quando o tratamento com gonadotrofina e iniciado em ausencia de um folículo dominante. O “Protocolo Dia 0” foi desenhado para començar com a administração de FSH depois da ovulação (dia 0) ao momento da emergência da primeira onda folicular. O seguinte trabalho compara o Protocolo Dia 0 versus Protocolo Tradicional em cabras Alpinas múltiparas durante a estação de anestro (Outubro-Dezembro, Uruguay, 34° S). O Protocolo Dia 0 (n=17) a ovulação foi sincronizada antes da administração de FSH utilizando um tratamento curto com progesterona (Menchaca and Rubianes, *Reprod. Fertil. Develop.*, 2004;16:403-414), e a administração de FSH iniciou-se depois da detecção da ovulação por ultrasonografía (7.5 MHz, Aloka 500, Japan). O tratamento Tradicional (n=20) iniciou-se com a colocação de CIDR-G (0,3 g de progesterona, InterAg, Nova Zelanda) durante 11 días, e administrou-se FSH no día 9 associada com uma dose de um análogo de PGF2 α (160 μ g, delprostenate, Glandinex, Universal Lab, Uruguay). Para os dois grupos o tratamento de superovulação foi de 6 doses de FSHp (12 h de intervalos, 200mg NIH-FSH-P1, Folltropin, Bioniche, Canada). O Protocolo Dia 0 administraram-se duas meias doses do análogo de PGF2 α (cada uma de 80 μ g) junto as duas ultimas doses de FSH. Em os dois protocolos utilizou-se uma dose de um análogo de GnRH (8.0 μ g, acetato de bucerelina, Receptal, Hoechst, Argentina) 12 h depois da ultima dose de FSH e a inseminação artificial foi com semen congelado 16 e 24 hs depois. O diametro do folículo maior e o número dos folículos pequenos (<4,0 mm) foram determinados por ultrasonografia transrectal no começo do tratamento de FSH. O número de corpos luteos (CLs) foram determinados por laparoscopia no día da colheita dos embriões (7 dias depois da inseminação). Os embriões foram colheitados por laparotomia utilizando anestesia inalatoria (Halotano, Rhône-Poulenc, Uruguay). Tres cabras mostraram regressão prematura do CLs (dois do Protocolo Dia 0 e uma do Protocolo Tradicional). Os resultados foram analisados por ANOVA. O diametro do folículo maior ao inicio o tratamento com FSH foi menor para o Protocolo Día 0 (4,1 \pm 0,2 mm) que para o Protocolo Tradicional (6,6 \pm 0,4 mm; P<0,001). Ao momento da primera dose de FSH o numero de foliculos pequenos foi superior para o Protocolo Dia 0 (16,7 \pm 1,7) que para o Protocolo Tradicional (9,3 \pm 1,1; P<0,001). Ao dia da colheita, a média do número de CLs e os embriões transferiveis/coletados demostraram uma tendência a ser maior com o Protocolo Dia 0 (13,8 \pm 2,3 e 85/135, respectivamente) que com o Protocolo Tradicional (10,9 \pm 1,9 e 85/161, respectivamente; P<0,1). Os resultados confirman a efectividade do Protocolo Dia 0 ao iniciar o tratamento de superovulação em ausencia de um folículo dominante. Estes dados preliminares também sugerem resultados exitosos com o Protocolo Dia 0 em número de CLs e embriões transferiveis/coletados em caprinos.

TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM OVINOS: INOVULAÇÃO POR LAPAROTOMIA

Souza, J.A.T.¹; Lages, M.V.L.C.C.²

¹Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / UFPI, adalmir@ufpi.br;

²Fazenda Santo Antônio, Campo Maior-PI

A transferência de embriões (TE) é uma técnica de manejo que visa maximizar a capacidade reprodutiva de fêmeas de alto valor genético. Nos bovinos, essa técnica está bem consolidada, enquanto nos pequenos ruminantes, particularmente nos ovinos, o acesso trans-cervical é considerado fator limitante. Um programa de TE consiste nas seguintes etapas: seleção das doadoras e receptoras, sincronização do estro, superovulação, fertilização, colheita, avaliação, inovulação e conservação dos embriões (Andrioli-Pinheiro, 1993). O sucesso da TE está relacionado a fatores associados a doadoras, embriões e receptoras, e à interação destes com o ambiente. Apesar do acesso transcervical nos caprinos, a inovulação, comumente, é realizada pela técnica de laparotomia, laparoscopia ou semi-laparoscopia, esta última mais recomendada (Freitas & Simplício, 2002; Brebion et al., 1992), por proporcionar taxas de fertilidade equivalentes ou superiores à laparotomia. O objetivo deste trabalho foi registrar a eficácia da TE com inovulações realizadas por laparotomia, em caprinos da raça Boer. Os dados constituem registros de 43 colheitas, realizadas na Fazenda Santo Antônio, município de Campo Maior – PI. As fêmeas foram superovuladas com 300UI de FSH (Pluset[®]), em doses decrescentes, a cada 12 horas, a partir do nono dia após aplicação do progestágeno (CIDR[®]). O implante foi retirado na tarde do dia 11 e na manhã e tarde desse dia foram aplicados 50mg de cloprostenol (Ciosin[®]). As coberturas foram feitas ao primeiro sinal de estro e cada 12 horas até a cessação dos sintomas. As colheitas ocorreram sete dias depois da primeira cobertura, via trans-cervical, sem sedação, após pinçar e tracionar a cervice com o auxílio de um espéculo vaginal humano e duas pinças de *Allis*. Para lavagem uterina utilizou-se 180ml de PBS em três momentos de 60ml, com o auxílio de uma sonda de *Russh Nº 12*, sendo o líquido recuperado em filtro, ao tempo em que era introduzido no útero. Após identificação e classificação das estruturas segundo normas da IETS, os embriões foram mantidos em meio PBS com 0,4% de BSA até o momento das inovulações, estas feitas por laparotomia, após sedação das receptoras com cloridrato de xilazina (Rompun[®]). Os ovários foram expostos para avaliar os corpos lúteos e os embriões colocados no corno correspondente aos corpos lúteos de melhor qualidade. Foram realizadas 43 colheitas com obtenção de 360 estruturas, sendo 174 mórulas, 105 blastocistos, 30 não fertilizadas e 51 degeneradas, correspondendo a médias de $8,37 \pm 7,18$; $4,05 \pm 4,05$; $2,44 \pm 2,28$; $0,70 \pm 2,02$ e $1,19 \pm 1,61$ estruturas por coleta, respectivamente. Dos 279 embriões viáveis ($6,49 \pm 6,16$ por coleta), 264 foram transferidos para 144 receptoras: 28 receberam um, 112 dois e 4 três embriões. O índice gestacional aos 30-45 dias, obtido por ultrassonografia, independentemente do número de embriões recebidos foi de 56,98%, sendo 56,10% de simples e 43,90% de gestação dupla. Apesar da indicação de melhores resultados pela técnica laparoscópica ou semi-laparoscópica, os dados permitem concluir que a técnica de inovulação por laparotomia é viável.

DIAGNÓSTICO PRECOCE DE GESTAÇÃO POR ULTRA-SONOGRAFIA EM TEMPO REAL EM RECEPTORAS OVINAS INOVULADAS COM EMBRIÕES DA RAÇA MORADA NOVA (VARIEDADE BRANCA)

Santos, M.H.B.¹; Lopes Júnior, E.S.²; Paula, N.R.O.²; Arruda, I.J.²; Andrade, M.L.L.²; Padilha, R.T.²; Freitas, V.J.F.²; Oliveira, M.A.L.¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária - FAVET/UFRPE, 52171-900, Recife-PE, Brasil ²Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução - FAVET/UECE, 60740-000, Fortaleza-CE, Brasil. maico.henrique@uol.com.br

Devido à possibilidade de extinção da raça ovina Morada Nova, variedade branca (MNb), esforços estão sendo realizados no sentido de preservar as características genéticas da mesma. Neste caso, em programas de preservação de raças, a transferência de embriões pode ser uma ferramenta de especial importância. No entanto, é também essencial que seja realizado um diagnóstico precoce de gestação nas receptoras para que aquelas vazias possam ser rapidamente reaproveitadas. Este trabalho objetivou utilizar a ultra-sonografia em tempo real para o diagnóstico precoce de gestação em receptoras ovinas, além de observar o momento da migração do tubérculo genital (TG) dos fetos da raça MNb. Embriões ovinos MNb foram previamente colhidos de doadoras superovuladas e congelados pelo uso de curva em um congelador programável (Dominium K, BIOCUM, Brasil). Quatorze receptoras mestiças tiveram o estro sincronizado com esponja vaginal impregnada com 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (Progespon[®], Syntex, Argentina) por 14 dias, associada a uma aplicação de 300 UI de eCG no momento da retirada da esponja. Seis dias após o início do estro, os embriões foram descongelados e as receptoras foram inovuladas por semi-laparoscopia, utilizando-se dois ou três embriões por fêmea. A gestação foi verificada 30 dias após a inovulação através da ultra-sonografia por via transretal (240 Parus, Pie Medical, Holanda) com transdutor de 6-8 MHz. O acompanhamento dos fetos, para sexagem, foi realizado a cada 48 horas, entre o 36º e 53º dias de gestação. Foram classificados como machos aqueles em que o TG foi localizado imediatamente caudal ao cordão umbilical e consideradas fêmeas quando o TG encontrava-se próximo à cauda. Os dados foram expressos como média \pm e.p. ou como percentuais. A taxa de gestação foi 28,6% (4/14), sendo apenas uma dupla (25%). Foram observados cinco fetos, sendo que as proporções de machos e fêmeas foram 60% e 40% respectivamente. A definição ultra-sonográfica do sexo fetal ocorreu aos $41 \pm 3,0$ dias de gestação. Em conclusão, a ultra-sonografia mostrou-se útil tanto para o diagnóstico precoce de gestação, quanto para a observação do momento da migração do TG em fetos ovinos da raça MNb.

SEXAGEM FETAL ATRAVÉS DA ULTRA-SONOGRAFIA EM OVELHAS DA RAÇA SANTA INÊS

Santos, M.H.B.¹; Moraes, E.P.B.X.¹; Rabelo, M.C.¹; Melo, A.N.²; Lima, P.F.³; Oliveira, M.A.L.³

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária/UFRPE ²Curso de Graduação em Medicina Veterinária/UFRPE ³Departamento de Medicina Veterinária/UFRPE (maloufrpe@uol.com.br)

O presente estudo teve a finalidade de identificar o sexo e o dia da migração do tubérculo genital (TG) de fetos ovinos através da ultra-sonografia em tempo real. Em todos os experimentos (EI, EII, EIII), o sexo foi identificado levando-se em consideração a localização do TG, pênis, prepúcio, bolsa escrotal, tetas e vulva. No EI, os úteros gestantes (n = 32) entre cinco e dez semanas, obtidos em matadouro, foram examinados após imersão em recipiente contendo água, com transdutor linear de 6,0 e 8,0 MHz. No EII, as fêmeas (n = 17) foram monitoradas em intervalos de 12 horas, do 35º ao 46º dia de gestação, por via transretal com transdutor linear (6,0 e 8,0 MHz) e por via transvaginal com o micro-convexo (5,0 e 7,5 MHz). No EIII, as fêmeas (n = 30) com gestação de 55 a 75 dias foram examinadas apenas uma vez, utilizando-se os mesmos transdutores e vias de exame do EII. No EI, houve acerto em 90,6% (29/32) dos diagnósticos e os equívocos foram de fetos sexados como fêmeas. Das 17 fêmeas do EII, 11 (64,6%) tiveram seus fetos corretamente sexados, independente da gestação ter sido simples (7/11), dupla (3/11) ou tríplice (1/11). Em 6 (35,4%) gestações, 3 (17,7%) foram duplas, sendo impossível sexar um feto de cada gestação. Nas outras 3 (17,7%) gestações, os fetos foram corretamente sexados, apesar dos nascimentos não coincidirem com a quantificação. Num feto macho de uma gestação simples, a migração ocorreu no 37º dia e até o 46º, todos os fetos das outras gestações estavam corretamente sexados. Das 30 fêmeas do EIII, 16 (53,4%) apresentaram gestações simples e a acurácia da sexagem foi de 100%. Nas 14 (46,6%) restantes, as gestações foram duplas, sendo impossível, em quatro casos, determinar o sexo de um dos gêmeos. Os diagnósticos incorretos resultaram de fetos sexados como fêmeas, mas que nasceram machos. De todos fetos nascidos, a acurácia total foi de 88,9% (EI), 88,0% (EII) e 90,9% (EIII), não sendo observada diferença ($P > 0,05$) entre os experimentos. Os resultados permitem concluir que a via transvaginal pode auxiliar na identificação do sexo fetal e que o período ideal para realizar a sexagem na raça Santa Inês está compreendido entre o 50º e o 70º dia de gestação, pela via transretal.

SEXAGEM FETAL EM CABRAS ATRAVÉS DA ULTRA-SONOGRAFIA

Santos, M.H.B.¹; Moraes, E.P.B.X.¹; Moura, R.T.D.¹; Chiamenti, A.¹; Bezerra, F.Q.G.²; Aguiar Filho, C.R.²; Lima, P.F.³; Oliveira, M.A.L.³

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária/UFRPE ²Curso de Graduação em Medicina Veterinária/UFRPE ³Departamento de Medicina Veterinária/UFRPE (maloufrpe@uol.com.br)

O objetivo deste trabalho foi identificar o sexo e o dia da migração do tubérculo genital (TG) de fetos caprinos pela ultra-sonografia em tempo real. Em todos os experimentos (EI, EII, EIII, EIV), conduzidos em diferentes períodos e propriedades, o sexo foi identificado levando-se em consideração a localização do TG, pênis, prepúcio, bolsa escrotal, tetas e vulva. No EI, conduzido em matadouro, foram utilizados úteros (n = 54) de fêmeas sem raça definida, com cinco a dez semanas de gestação. Após serem imersos em recipiente contendo água, foram examinados com transdutor linear de 6,0 e 8,0 MHz. No EII, desenvolvido na propriedade A, as fêmeas da raça Anglo-Nubiana (n = 33), com gestação entre 111 e 122 dias, foram submetidas a exame único com transdutor micro-convexo (5,0 e 7,5 MHz), por via transabdominal. No EIII, realizado na propriedade B, as fêmeas da raça Alpina Americana (n = 12), com gestação de 45 a 70 dias, foram também examinadas apenas uma vez com transdutor linear (6,0 e 8,0 MHz), por via transretal. No EIV, conduzido na propriedade C, as fêmeas da raça Anglo-Nubiana (n = 8) foram diariamente monitoradas, do 35º ao 60º dia de gestação, com transdutor linear (6,0 e 8,0 MHz), por via transretal, e com o micro-convexo (5,0 e 7,5 MHz), por via transvaginal. Dos fetos quantificados nas gestações simples, 85,7% (EI), 64,3% (EII), 72,0% (EIII) e 100% (EIV) foram corretamente sexados. Dos fetos quantificados nas gestações duplas, 76,9% (EI), 55,3% (EII), 100% (EIII) e 75,0% (EIV) foram corretamente sexados, não sendo possível identificar o sexo de 23,7% (EII) e 20,0% (EIII) dos fetos e quantificar 25,0% deles (EIV). A migração do TG num feto macho da raça Anglo-Nubiana ocorreu no 48º dia de gestação, mas somente no 55º todos os fetos estavam devidamente sexados. Os falsos diagnósticos resultaram de fetos sexados como fêmeas e a porcentagem de diagnósticos corretos não diferiu entre o sexo dos fetos e entre as gestações simples e duplas. Os resultados permitem concluir que a via transvaginal deve ser apenas utilizada como método auxiliar da sexagem fetal e que a ultra-sonografia em tempo real é eficiente para sexar fetos caprinos entre o 55º e o 70º dia de gestação.

INDUÇÃO DE ESTRO EM CABRAS COM O USO DE DISPOSITIVOS INTRAVAGINAIS REUTILIZADOS*

Zambrini, F.N.¹; Fonseca, J.F.¹; Bruschi, J.H.²; Viana, J.H.M.²; Palhão, M.P.²; Santos, A.F.A.²

¹Embrapa Caprinos, Estrada Sobral/Groaíras, Km 4, CP D10, Cep 62.011-000, Sobral-CE, Brasil, jeferson@cnpq.embrapa.br. ²Embrapa Gado de Leite, Rodovia MG 133, Km 42, 36.155-000, Cel Pacheco-MG, Brasil.

O objetivo deste estudo foi testar a eficiência da indução de estro em cabras durante a estação de acasalamento. Foram utilizadas 21 cabras (08 Toggenburg, 10 Saanen e 03 Mestiças) aleatoriamente divididas, de acordo com a raça, entre três tratamentos. Em T1 (n = 08) as cabras receberam uma dose de 22,5 µg cloprostenol sub-vulvar; em T2 (n = 7) e T3 (n = 6), as cabras receberam dispositivo intravaginal contendo progesterona (CIDR[®]) por seis dias, previamente utilizado por seis e 12 dias, respectivamente, 22,5 µg de cloprostenol no momento da inserção do dispositivo e 200 UI hCG 24 h antes da retirada do dispositivo. Em T1, três cabras apresentaram estro entre 44 e 56 horas após a aplicação do cloprostenol e duas cabras 452 e 692 horas; em T2 e T3, todos os animais apresentaram estro entre 20 e 32 horas após a retirada do dispositivo. Uma cabra em T2 e outra em T3 perderam o dispositivo. O intervalo da retirada do dispositivo ao início do estro ($22,0 \pm 4,9$ h e $22,4 \pm 5,4$ h) e a duração do estro ($34,0 \pm 4,6$ h e $33,6 \pm 5,4$ h) não diferiram ($P > 0,05$) entre T2 e T3, respectivamente. O intervalo para estro e a duração do estro estiveram negativamente correlacionados ($r = -1$, $P < 0,001$). A taxa de gestação (%) foi de 37,5, 57,2 e 33,4, respectivamente. Dispositivos intravaginais contendo progesterona podem ser eficientemente utilizados por até três vezes em protocolos de seis dias para a indução de estro em cabras.

*Suporte financeiro: CNPq, FAPEMIG e Pfizer Saúde Animal.

PROTÓCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO E DA OVULAÇÃO EM RECEPTORAS CAPRINAS

Guido, S.I.¹; Guido, F.C.L.¹; Nascimento Filho, E.V.²; Oliveira, M.A.L.¹;
Lima, P.F.¹; Andrade, J.C.O.²; Rocha, J.D.¹

¹Prog. de Pós-Grad. em Ciência Veterinária/UFRPE; Recife-PE, 50630-650, Brasil. ²Médico Veterinário Autônomo. sebastiaoguido@uol.com.br

Avaliou-se a eficiência de protocolos de sincronização do estro e da ovulação em cabras, constituídos pelo CIDR novo e reutilizado, esponjas vaginais, eCG e Dinoprost. Foram utilizadas 60 cabras distribuídas em três grupos. No TI (n=20), foram tratadas com CIDR novo, durante 9 dias; sendo no 7º dia administradas, por via i.m., 300 U.I. de eCG e 5,0 mg de dinoprost. No TII (n=20) receberam uma esponja vaginal contendo 50 mg de MAP por 9 dias e no 7º dia 300 U.I. de eCG e 5,0 mg de dinoprost via i.m. As do TIII (n=20) foram tratadas, durante 9 dias, com um CIDR reutilizado. No 7º dia também receberam, por via i.m., 300 U.I. de eCG e 5,0 mg de dinoprost. Para determinação das concentrações plasmáticas de P₄, foram sorteadas cinco fêmeas de cada grupo. As colheitas de sangue foram efetuadas a cada 24 horas durante o tratamento, 24 horas após a retirada dos dispositivos e no 7º dia depois de iniciado o estro. Também no 7º dia depois de iniciado o estro, todas as fêmeas foram avaliadas por laparoscopia para determinação da taxa ovulatória (TO). Todas as cabras submetidas à colheita sanguínea que ovularam foram submetidas a ovariectomia para avaliação morfológica dos CL. A fertilidade foi verificada aos 35 dias por ultra-sonografia. Foram verificadas porcentagens de estro de 100% (TI), 80% (TII) e 100% (TIII). A TO média foi de 2,67 (TI), 2,17 (TII) e 2,33 (TIII). As concentrações plasmáticas médias de P₄ durante o tratamento variaram de 1,76 a 7,74 ng/mL no TI e de 1,5 a 5,78 ng/mL no TII. No 7º dia depois de iniciado o estro foram de 3,95 ng/mL (TI) e 3,58 ng/mL (TII). As TO pós-seção dos ovários foram de 3,75 ± 1,25 (TI) e 3,50 ± 1,50 (TIII), sendo superiores (p>0,05) à do TII (2,17 ± 1,10). Os resultados de prenhez foram de 53,3% (TI), 40,0% (TII) e 46,7% (TIII). Concluiu-se que os protocolos são satisfatórios na sincronização do estro e da ovulação, bem como, que as concentrações de P₄ durante a utilização do CIDR são rapidamente estabelecidas e contínuas, mesmo com o CIDR reutilizado.

SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO DE CABRAS COM PROTOCOLOS DE CURTA DURAÇÃO UTILIZANDO CIDR-G® E ESPONJA INTRAVAGINAL

Maffili, V.V.¹; Torres, C.A.A.²; Fonseca, J.F.³; Bruschi, J.H.⁴; Viana, J.H.M.⁴; Prospero, C.P.⁵; Moraes, E.A.²; Pontes, R.A.M.²

¹ Departamento de Zootecnia – UFV – vmaffili@cpqgm.fiocruz.br; ² Departamento de Zootecnia – UFV; ³ Centro Nacional Pesquisa em Caprinos – EMBRAPA; ⁴ Centro Nacional de Pesquisa Gado de Leite – EMBRAPA; ⁵ Departamento de Veterinária – UFLA

Objetivou-se, com este estudo, comparar dois protocolos de curta duração para sincronização de estro. Foram utilizadas 18 cabras [12 nulíparas (N) e seis múltíparas (M)] distribuídas em dois tratamentos. No T1 (n = 6N e 3M), os animais receberam esponjas vaginais impregnadas com 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP) e no T2 (n = 6N e 3M) receberam o dispositivo vaginal CIDR-G®, sendo aplicado, no momento da inserção, 50 µg do análogo sintético d-cloprostenol (PGF). As esponjas e os dispositivos vaginais permaneceram por cinco dias e após a remoção teve início à detecção de estro, a cada seis horas, com rufiões. Exames ultra-sonográficos foram realizados a cada 24 horas durante a permanência das esponjas e dos dispositivos vaginais e, a cada seis horas após a detecção do estro, prolongando-se até 12 horas após a ovulação. Houve regressão folicular com a emergência de uma nova onda no dia $2,8 \pm 0,83$ e $3,5 \pm 0,53$, respectivamente, nas cabras do T1 e T2. As porcentagens de animais que manifestaram estro e ficaram gestantes foram de 88,8% (8/9) e 75,0% (6/8) no T1 e 88,8% (8/9) e de 62,5% (5/8) no T2. Os intervalos entre as retiradas dos dispositivos e esponjas até o início e o final fim do estro, assim como entre a retirada dos dispositivos e esponjas e a duração do estro foram, respectivamente, de $53,3 \pm 14,8$ e $36,0 \pm 0,0$ horas ($P < 0,05$); $91,2 \pm 13,5$ e $71,2 \pm 11,8$ horas ($P < 0,05$) e $38,3 \pm 14,7$ e $35,2 \pm 11,7$ horas ($P > 0,05$) para as cabras de T1 e T2,. Os intervalos entre o início e final do estro até a ovulação, bem como entre a retirada dos dispositivos/esponjas até a ovulação foram, respectivamente, de $32,2 \pm 14,3$ e $33,4 \pm 7,3$ horas ($P > 0,05$); $- 4,80 \pm 10,32$ e $- 5,0 \pm 7,2$ horas ($P > 0,05$) e de $88,2 \pm 16,9$ e $69,4 \pm 7,3$ ($P < 0,05$) para cabras do T1 e T2. O número de ovulações, o diâmetro do folículo ovulatório e a taxa de crescimento do folículo ovulatório foram, respectivamente, de $2,00 \pm 0,63$ e $1,8 \pm 0,83$ ($P > 0,05$); $7,3 \pm 1,3$ e $7,4 \pm 1,1$ mm ($P > 0,05$) e de $3,4 \pm 1,9$ e $3,5 \pm 1,2$ mm ($P > 0,05$) para cabras do T1 e T2. A exposição de cabras a diferentes dispositivos liberadores de progéstágenos mostrou-se efetiva, contudo, deve-se considerar os diferentes momentos de ovulação apresentados neste estudo, quando se pretende utilizar os diversos protocolos em programas de inseminação artificial com tempo fixo.

EFICIÊNCIA DO CIDR® NOVO E REUTILIZADO EM PROTOCOLO DE SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO DE CURTA DURAÇÃO EM CABRAS DA RAÇA TOGGENBURG

Maffili, V.V.¹; Torres, C.A.A.²; Fonseca, J.F.³; Bruschi, J.H.⁴; Viana, J.H.M.⁴;
Prosperi, C.P.⁵; Moraes, E.A.²; Pontes, R.A.M.²

¹ Departamento de Zootecnia – UFV – vmaffili@cpqgm.fiocruz.br; ² Departamento de Zootecnia – UFV; ³ Centro Nacional Pesquisa em Caprinos – EMBRAPA; ⁴ Centro Nacional de Pesquisa Gado de Leite – EMBRAPA; ⁵ Departamento de Veterinária – UFLA

O objetivo deste experimento foi determinar a eficiência da reutilização de um dispositivo vaginal (CIDR-G®) por até três vezes. Dezoito fêmeas da raça Toggenburg foram distribuídas aleatoriamente em três tratamentos. As cabras do T1 (n = 6) foram tratadas com CIDR-G® novo, as do T2 (n = 6) com CIDR-G® utilizado uma vez e as do T3 (n = 6) com CIDR-G® utilizado por duas vezes. Os dispositivos vaginais foram inseridos no dia zero em associação com a aplicação, por via intramuscular, de 50 µg de d-cloprostenol (PGF) e retirados no quinto dia da inserção. Todas as fêmeas foram observadas quanto à manifestação de estro quatro vezes ao dia e uma vez detectado foram submetidas à monta natural. As porcentagens de estro e fertilidade foram, respectivamente, de 83,3/60% (T1), 83,3/60% (T2), e 100/83,3% (T3). O intervalo entre a retirada do dispositivo até o início do estro foi menor ($P < 0,05$) nas cabras do T3 ($20,0 \pm 3,10$ horas) quando comparado com às do T1 ($37,2 \pm 2,70$ horas) e do T2 ($33,6 \pm 5,40$ horas). As fêmeas do T3 tiveram maior ($P < 0,05$) duração do estro ($43,0 \pm 8,83$ horas) do que as do T1 ($30,0 \pm 4,24$ horas), mas não diferiram ($P > 0,05$) das do T2 ($37,2 \pm 6,57$ horas). Houve correlação negativa ($P < 0,05$) entre a duração do estro e o intervalo da retirada do CIDR-G® com o início do estro. O intervalo ($P > 0,05$) entre a retirada do CIDR-G® e o final do estro foi de $67,2 \pm 2,7$ (T1), $70,8 \pm 2,7$ (T2) e $63,0 \pm 8,3$ horas (T3). O número de ovulações, os intervalos desde o início do estro e da retirada do CIDR-G® até a ovulação não foram afetados pelos tratamentos ($P > 0,05$). O diâmetro médio dos folículos ovulatórios ($9,4 \pm 0,96$ mm) das fêmeas do T3 foi maior ($P < 0,05$) do que o das fêmeas do T1 ($7,6 \pm 1,4$ mm) e do que aquele das do T2 ($8,1 \pm 0,56$ mm). No entanto, a taxa de crescimento do folículo ovulatório foi semelhante nos três tratamentos ($P > 0,05$). Os resultados permitem concluir que a utilização do CIDR-G®, por até três vezes, foi efetiva e repercutiu em boas taxas de sincronização do estro e de gestação.

INDUÇÃO DO ESTRO EM OVELHAS DA RAÇA TEXELL DURANTE O ANESTRO ESTACIONAL

Castilho, C.¹; Mori, M.M.², Alessi, C.²

¹Docente Faculdade de Medicina Veterinária, UNOESTE, Campus II, P. Prudente – SP, 19067-175. calie@unoeste.br. ²Alunos Faculdade de Medicina Veterinária, UNOESTE, Campus II, P. Prudente – SP

A gestação na ovelha dura 144 e 151 dias, no entanto, devido ao anestro estacional causado pelo fotoperíodo, as ovelhas tendem a ter 1 parto ao ano, constituindo um dos principais entraves na criação comercial. Portanto, torna-se necessário o uso de protocolos hormonais que induzam a atividade ovariana durante os períodos de anestro, sobretudo em raças lanadas. Desta forma, foram desenvolvidos experimentos visando observar a taxa de manifestação de estro, fora da estação reprodutiva, em ovelhas da raça Texell, nulíparas e multíparas, utilizando-se 1/2 implante de progestágeno sem uso (novo) ou utilizado 1 vez. Durante 30 dias, em setembro e outubro, foi feita observação de cio das ovelhas utilizadas (controle), com introdução de macho (rufião) por 1 semana e após esse período foram divididas em 2 grupos. Grupo 1 (G-1) composto de 15 ovelhas nulíparas com 24 meses de idade que receberam 1/2 implante auricular novo (Dia 0) (Crestar® - Intervet, Holanda) e aplicação de 0,5 mL IM de PGF2 α (0,132 mg, cloprostenol sódico, Ciosin® - Schering-Plough Coopers). No dia 9 foi aplicado, por via IM, 2 mL de gonadotrofina coriônica equína (eCG, 400 UI, Folligon® - Intervet, Holanda) e após 24 horas os implantes foram retirados. O grupo 2 (G-2) composto 26 ovelhas multíparas (8 semanas pós-parto), com idade aproximada de 36 meses. Receberam o mesmo protocolo do G1, porém, em 14 ovelhas utilizou-se 1/2 implante utilizado na sincronização do estro de bovinos e em 12 1/2 implante já utilizado para sincronizar o estro de ovelhas. No dia da retirada do implante foram introduzidos rufiões para detectar a manifestação do estro através da marcação com tinta e foram observados duas vezes ao dia para detectar o início do estro. No G-1, 53,33% (8/15) das ovelhas demonstraram estro 48 horas após a retirada do implante. No G-2, 57,69% (15/26) exibiu estro entre 48 e 72 horas após a retirada do implante. Das 14 ovelhas que receberam o implante reutilizado em bovinos 8 (57,14%) apresentaram estro e nas 12 ovelhas que receberam implante reutilizado, 7 (58,33%) manifestaram cio. Durante os 30 dias de observação de cio (controle), feita antes do início dos experimentos, sem uso de hormônios, nenhuma ovelha exibiu manifestação de cio. Concluímos que é possível induzir manifestação de estro em mais de 50% das ovelhas em anestro estacional, tanto em fêmeas multíparas quanto nulíparas, usando 1/2 implante auricular sem uso (novo) ou utilizado 1 vez e novos experimentos devem ser realizados.

PROGRAMA DE SINCRONIZAÇÃO-INDUÇÃO DE ESTRO E OVULAÇÃO PARA NOVILHAS DE 12 A 14 MESES

Bragança, J.F.¹; Loguercio, R.S.¹; Escobar, F.R.¹; Loguercio, L.P.²;
Oliveira, J.F.C.¹; Gonçalves, P.B.D.¹

¹Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Clínica de Grandes Animais Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal - BioRep, Santa Maria, RS, Brasil. bayard@biorep.ufsm.br

²Granjas 4 Irmãos S&A – Rio Grande – RS – Brasil.

O objetivo deste estudo foi desenvolver um protocolo hormonal baseado em eCG para aumentar o índice de folículos responsivos ao GnRH e usar o corpo lúteo como fonte natural de gestágeno na sincronização-indução de estro para novilhas de corte com 12 a 14 meses de idade. Um total de 262 novilhas *Bos taurus* (predominante Red Angus), com no mínimo 280 Kg, com condição corporal 4 (escala de 1 a 5), com 12 a 14 meses de idade foram divididas aleatoriamente em três grupos: BioRep (n=92), eMGPG (n=85) e eGPG (n=85). As fêmeas do grupo BioRep receberam um pessário vaginal, contendo 250 mg de acetato de medroxi-progesterona (MAP) e uma injeção intramuscular (IM) de 5 mg de benzoato de estradiol (BE) no dia 0 (início do tratamento). O pessário vaginal permaneceu por sete dias. No dia 6, foram aplicadas 400 UI de eCG por via IM e 5 mg de Dinoprost na submucosa vulvar (SMV). Após a retirada dos pessários (dia 7), as fêmeas foram observadas duas vezes por dia para detecção de estro por 48h e inseminadas 12h após sua manifestação (IA). Os animais que não manifestaram estro nesse período receberam uma injeção IM de 100 µg de GnRH, sendo inseminadas em tempo fixo (IATF), nas 16 a 24h seguintes. As novilhas do grupo eMGPG receberam uma aplicação IM de 400 UI de eCG no dia 0 com a finalidade de provocar um aumento do crescimento folicular e melhorar a resposta ao GnRH. Após 72h, os animais receberam uma injeção IM de GnRH (100 µg) e um pessário vaginal contendo 250 mg de MAP por sete dias. Na retirada do MAP (dia 7), foi aplicada uma dose de 5 mg de Dinoprost, via SMV. Nas 48h seguintes à retirada dos pessários, foi realizado o controle da manifestação de estro e IA. As novilhas que não manifestaram estro nesse período, receberam uma dose de 100 µg de GnRH por via IM e IATF nas 16 a 24h seguintes. As fêmeas do grupo eGPG receberam o protocolo Ovsynch com uma aplicação IM de 400 UI de eCG 72 h antes da primeira injeção de GnRH. A detecção de estro foi realizada entre a injeção de Dinoprost e a segunda aplicação de GnRH. A percentagem de estro do grupo BioRep (52,1%) foi superior aos dos grupos eMGPG (23,5%) e eGPG (22,3%; P=0,0001). Os índices de concepção das novilhas inseminadas com manifestação de estro não diferiram entre os grupos (60,4%, 65,0% e 68,4%). A percentagem de prenhez do grupo BioRep (45,6%) foi superior ao grupo eGPG (28,2%; P=0,0175), mas não diferiu do grupo eMGPG (37,6%). Conclui-se que a aplicação prévia de eCG para aumentar o índice de folículos responsivos ao GnRH não substitui uma fonte de gestágeno na sincronização/indução de estro em novilhas de corte com 12 a 14 meses de idade.

Trabalho realizado com apoio do CNPq e FAPERGS.

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE DISPOSITIVOS VAGINAIS (PRID®) APÓS A UTILIZAÇÃO E DESINFECÇÃO

Oliveira Filho, B.D.¹; Gambarini, M.L.¹; Araújo, I.F.L.²; Garcia, A.M.²; Andrade, M.A.¹

¹ Departamento de Produção Animal - EV/UFG, Goiânia-GO. bene@vet.ufg.br

² Estudantes de Medicina Veterinária - EV/UFG, Goiânia-GO.

A sincronização de cios é uma ferramenta útil no manejo de rebanhos, especialmente em programas de transferência de embriões. Com a introdução de novas drogas, a técnica tornou-se mais eficiente permitindo o estabelecimento de protocolos que utilizam dispositivos impregnados com progestágenos, os quais possibilitam a sincronização da ovulação, eliminando a observação de cios, um dos gargalos da inseminação artificial. O custo elevado dos produtos tem motivado a reutilização dos dispositivos. O objetivo deste trabalho foi verificar a ocorrência de contaminação e os microrganismos presentes, quando desta reutilização. Cento e quarenta e uma vacas Nelore foram submetidas ao protocolo de IATF com PRID®, que permaneceu inserido por nove dias. Após a retirada do dispositivo foram colhidas amostras com o auxílio de cotonetes de algodão estéreis friccionados diretamente na superfície do PRID®. A seguir, os dispositivos foram imersos em solução de cloreto de metil amônio 10%, durante 20-30 minutos. Após a colheita, as amostras foram acondicionadas em meio de transporte e enviadas ao laboratório, onde foram repicadas em Caldo Tioglicolato, Caldo Selenito Cistina, Agar Sangue e Agar Sabouraud e incubadas a 37° C, por 18-24 horas. As amostras em Agar Sabouraud permaneceram à temperatura ambiente por 14 dias. As bactérias Gram negativas e positivas foram identificadas de acordo com Baron et al., (1994). Para a identificação de cocos Gram positivos adotou-se a caracterização do tipo de colônia, utilização do manitol, oxidação e fermentação da glicose. Em 92,87% (131) das amostras colhidas antes da desinfecção houve crescimento de diferentes tipos bacterianos, enquanto após a imersão em cloreto de metil amônio 10% houve crescimento em 07 (4,96%) amostras, mostrando diferença estatística ($p < 0,05$). As bactérias isoladas com maior frequência nas amostras pré-desinfecção foram *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Corynebacterium pyogenes*, enquanto das amostras pós-desinfecção do PRID® foram encontradas *E.coli* em três amostras e *P. aeruginosa*, *Staphylococcus spp*, *S. epidermidis* e Levedura em uma amostra cada. Estes resultados permitem concluir que a solução de cloreto de metil amônio 10% é eficiente em eliminar a contaminação proveniente da vagina e presente no dispositivo, favorecendo a reutilização do PRID® e minimizando a veiculação de microrganismos para outra vaca.

Baron, E.J.; Petersen, L.R.; Finegold, O.M. Diagnostic Microbiology. 9ed. Missouri: Mosby, 1994, 958p.

EFEITO DE DIFERENTES ESTÍMULOS OVULATÓRIOS NA TAXA DE SINCRONIZAÇÃO

Meneghetti, M.¹; Losi, T.C.¹; Martins Jr., A.P.²; Vilela, E.R.²; Vasconcelos, J.L.M.³

¹Aluno do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da FMVZ-UNESP-Botucatu-SP ²Lageado Consultoria Agropecuária ³DPEA-FMVZ-UNESP-Botucatu-SP, 18.618-000
vasconcelos@fca.unesp.br

Diferentes protocolos hormonais vem sendo desenvolvidos a fim de aprimorar e viabilizar a implementação da IA e da TE em tempo fixo através do aumento das taxas de sincronização. Com o objetivo de avaliar diferentes estímulos ovulatórios (ECP, BE e GnRH) na taxa de sincronização foram utilizadas 946 vacas paridas, Nelore e anelradas, entre 40 a 110 dias pós-parto e escore de condição corporal de $3,06 \pm 0,45$ mantidas a pasto com suplementação mineral. Os animais foram submetidos ao seguinte protocolo: inserção de CIDR (pré-utilizado por 9 ou 18 dias) + aplicação de BE 2,0 mg IM (Estrogin[®]) no dia 0; remoção do CIDR no dia 9. A remoção dos bezerros foi realizada do dia 9 até a IATF. No dia 9 os animais foram divididos em 4 grupos: os animais dos Grupos 1 e 2 receberam ECP (E.C.P.[®]) nas doses de 0,5 e 1 mg, respectivamente, no dia 9; o Grupo 3 recebeu 1 mg de BE (Estrogin[®]), no dia 10; o Grupo 4 recebeu 100 µg de GnRH (Fertagyl[®]) na IATF. A IATF foi realizada de 48 a 54 horas após a remoção do CIDR, em todos os grupos. A ciclicidade foi determinada por dois exames ultrassonográficos (US) realizados nos dias 0 e 7, foram considerados ciclando os animais que apresentavam CL em pelo menos um dos dois exames. Os animais com presença de CL no dia 7 receberam aplicação de dinoprost trometamina (Lutalyse[®], IM). A taxa de ovulação e a taxa de regressão estrutural do CL presente no dia 7 foram determinadas por ultrassonografia realizada no momento da IATF e 48 horas depois. A concepção foi avaliada por US 28 dias após a IATF. A taxa de concepção foi avaliada por regressão logística e as variáveis incluídas no modelo foram: ciclicidade, período de pré-utilização do CIDR e estímulo ovulatório. Não houve efeito dos tratamentos utilizados nas taxas de sincronização, prenhez ao protocolo e concepção das vacas efetivamente sincronizadas, sendo respectivamente de 90,0% (99/110), 58,2% (64/110) e 64,5% (64/99) no G1 (0,5mg de ECP); de 87,4% (180/206), 46,1% (95/206) e 51,7% (93/180) no G2 (1 mg de ECP); 89,9% (285/317), 52,1% (165/317) e 56,8% (162/285) no G3 (BE); 90,1% (282/313), 54,0% (169/313) e 59,2% (167/282) no G4 (GnRH). Estes dados mostram que houve alta taxa de sincronização de ovulação e que pode-se utilizar 0,5mg de ECP no final do protocolo devido ao menor custo em relação ao GnRH.

EFICIÊNCIA DE DIFERENTES DOSES DE ACETATO DE FERTIRELINA SOBRE A DINÂMICA FOLICULAR E CONCENTRAÇÕES DE PROGESTERONA EM VACAS LEITEIRAS SUBMETIDAS AO PROTOCOLO OVSYNCH

Gioso, M.M.¹, Fernandes, C.A.C.^{1,2}; Oba, E.¹; Carvalho, M.A.P.³; Oliveira, E.R.²

¹ Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ/UNESP, Botucatu-SP, 18618-000, Brasil. ² Biotran LTDA– Alfenas-MG, Brasil. ³ Médico Veterinário.

mngioso@yahoo.com.br

O objetivo deste trabalho foi comparar a eficiência de duas doses distintas de um análogo do GnRH, o Acetato de Fertirelina, sobre a sincronização da onda de crescimento folicular, indução de ovulação e concentrações de progesterona (P4) em vacas leiteiras submetidas ao protocolo Ovsynch. Utilizou-se 77 vacas de origem leiteira, entre 60-120 dias pós-parto e escore corporal entre 2,5-4,0 (escala 1-5). Os animais foram avaliados previamente por ultra-sonografia, e só foram introduzidos no experimento aqueles que apresentavam população folicular e corpo lúteo (CL) característico ou ainda ausência de CL, porém presença de pelo menos um folículo com diâmetro ≥ 10 mm. As fêmeas foram distribuídas aleatoriamente em quatro tratamentos: Grupo 1 (n=21)- 100 μ g (dose integral) de Fertirelina (Fertigen[®], Schering Plough - Coopers, Brasil) no dia 0, 500 μ g de PGF2 α (Ciosin[®], Schering Plough - Coopers, Brasil) dia 8 e 100 μ g de Fertirelina dia 10. Grupo 2 (n=21)- 100 μ g de Fertirelina no dia 0, 500 μ g de PGF2 α dia 8 e 50 μ g de Fertirelina dia 10. Grupo 3 (n=19)- 50 μ g de Fertirelina no dia 0, 500 μ g de PGF2 α dia 8 e 100 μ g de Fertirelina dia 10. Grupo 4 (n=16)- 50 μ g de Fertirelina no dia 0, 500 μ g de PGF2 α dia 8 e 50 μ g de Fertirelina dia 10. Avaliações ultra-sonográficas e as colheitas de sangue para análise da P4 foram realizadas nos dias -1; 0; 2; 8; 10 e 12. As dosagens hormonais da P4 foram executadas por radioimunoensaio e analisadas utilizando-se kits comerciais (DPC Medlab[®]). A taxa de indução de uma nova onda de desenvolvimento folicular após a primeira aplicação de Fertirelina, e a taxa de indução de ovulação após a segunda aplicação foram comparadas pelo teste χ^2 . Para comparar os efeitos dos tratamentos nos diferentes dias de análise, sobre as concentrações plasmáticas médias de progesterona utilizou-se análise de variância (ANOVA). A taxa de sincronização média da primeira onda folicular e taxa de ovulação ao final dos tratamentos foi de 70,0% e 66,2%, respectivamente não apresentando diferença entre os grupos (P>0,05). Os valores de progesterona nos dias 0 (1,27 \pm 1,63ng/ml), 2 (1,36 \pm 1,73ng/ml), 8 (1,24 \pm 1,31ng/ml), 10 (0,13 \pm 0,20 ng/ml) e 12 (0,15 \pm 0,28ng/ml) também foram similares entre os tratamentos (p>0,05). O aumento inicial no perfil de progesterona reflete o efeito da Fertirelina sobre os folículos existentes, provavelmente devido a ovulação ou luteinização indiretamente provocado pelo hormônio. A queda na concentração observada após o dia 8 ocorreu pela indução da luteólise (PGF2 α). Mesmo discreta por se tratar de um período curto após a ovulação, a elevação das concentrações de progesterona entre os dois últimos dias de análise mostra que ocorreu a ovulação e uma nova massa de tecido luteal foi formada. As concentrações médias de progesterona analisadas e as taxas de sincronização e ovulação demonstram que a Fertirelina foi eficiente em provocar a emergência de uma nova onda de desenvolvimento folicular, assim como a indução da ovulação ao final do protocolo, seja com a dose de 50 ou 100 μ g.

SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO EM VACAS NELORE, EM ANESTRO PÓS-PARTO, TRATADAS COM PROTOCOLO SEM PROGESTERONA OU PROGESTÁGENO

Souza, A.F.^{1a}; Pinheiro, V.G.^{1a}; Ereno, R.L.²; Barros, C.M.¹

¹Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências, ²Departamento de Reprodução Animal, FMVZ-UNESP, Botucatu-SP, Brasil. alfredoferrari@gmail.com

Vacas em anestro pós-parto usualmente são tratadas com protocolos hormonais contendo progesterona/progestágenos para induzir a ovulação e possibilitar a preñez. No presente trabalho foi avaliada a eficiência de um protocolo (GPE modificado) onde a remoção temporária do bezerro (RTB) e/ou a administração de eCG substituíram o uso de progesterona/progestágenos. Vacas Nelore em anestro pós-parto (40 a 60 dias, n=22) foram distribuídas ao acaso em dois grupos: GPE/eCG e RTB/GPE/eCG. Em dia fixo do ciclo estral (D0) os animais do grupo GPE/eCG foram tratados com GnRH (50 µg, licerelina, via IM, Gestran Plus[®]) e sete dias mais tarde (D7) receberam PGF2α (150 µg, d-cloprostenol, via IM, Prolise[®]) e eCG (300 UI, via IM, Novormon[®]). No D8, administraram-se benzoato de estradiol (1mg, Estrogin[®]) e 30 a 36h mais tarde todas as vacas foram inseminadas artificialmente em tempo fixo (IATF), sem observação do estro. No Grupo RTB/GPE/eCG, associou-se, ao protocolo anterior, a remoção temporária de bezerros (durante 48 h consecutivas) antes do início dos tratamentos. Os ovários foram observados por meio de ultra-sonografia (Aloka SSD 500, probe de 7,5 MHz) antes de começar (D-12, D-2), durante (D0, D7 e D8) e após (D9, D10, D11, D17 e D60) os tratamentos hormonais. O critério utilizado para classificar as vacas em anestro pós-parto foi a ausência de CL nos exames ultra-sonográficos realizados antes do início dos tratamentos hormonais ou RTB. A administração de GnRH (D0) induziu ovulação (determinada pela presença de CL no D7) em 6 das 11 vacas (54,5%) tanto do grupo GPE/eCG quanto RTB/GPE/eCG. Com relação à sincronização da ovulação após a aplicação de BE, no Grupo GPE/eCG, 2 (18,1%) vacas ovularam até 12 h após a IATF e 4 (36,3%) animais até 12 h mais tarde (24 h após IATF). No Grupo RTB/GPE/eCG, 1 (9,0%) vaca ovulou cerca de 6 h antes da IATF, 2 (18,1%) até 12 h após a IATF e 2 (18,1%) até 12 h mais tarde. O diâmetro médio dos folículos pré-ovulatórios foi de 11,0±1,3 e 11,5±2,6 para as vacas dos grupos GPE/eCG e RTB/GPE/eCG, respectivamente. As taxas de prenhez resultantes da IATF foram de 27,2% (3/11) e 45,4% (5/11), respectivamente. Os resultados indicam que a associação da RTB ao protocolo GPE/eCG não melhorou a taxa de sincronização da ovulação ou taxa de prenhez. Contudo, um aumento na taxa de prenhez foi observado em outro experimento com maior número de animais, onde as vacas do Grupo RTB/GPE/eCG apresentaram taxa de prenhez superior (51,5%, 34/66) a dos animais do Grupo GPE/eCG (28,3%, 21/74; p<0.05).

Apoio FAPESP.

^aBolsistas do CNPq.

SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO DE RECEPTORAS BOVINAS COM UTILIZAÇÃO DE GnRH E hCG

Machado, V.C.¹; Dias, A.J.B.¹

¹Laboratório de Melhoramento Genético Animal/LMGA/ CCTA/ UENF, Campos dos Goytacazes-RJ, 28013-600, Brasil. vtrmachado@bol.com.br

A sincronização de estro é prática de utilização comum nos programas de transferência de embriões. Atualmente os protocolos de sincronização de cio para inseminação artificial ou transferência de embriões em tempo fixo (TETF) vêm se baseando no uso de implantes de progesterona para se obter tal efeito, o que aumenta sensivelmente os custos dos protocolos. Diante do exposto, objetivou-se averiguar o uso de um protocolo para sincronização de estro de receptoras bovinas baseado na utilização de GnRH e hCG sobre o tamanho dos corpos lúteos formados. Foram utilizadas 15 novilhas $\frac{3}{4}$ Holandês, todas cíclicas, com escore corporal entre 3 e 4 (escala de 1 a 5) e os tratamentos foram realizados a cada 60 dias. Como controle (T1) foi utilizado um protocolo comercial (TETF). Em D0 foi colocado o implante de progesterona + 2mg de benzoato de estradiol, em D8 foi retirado o implante e aplicado 2 ml de prostaglandina, em D9 foi aplicada a segunda dose de benzoato de estradiol (1mg), em D17 os ovários foram avaliados para presença de corpos lúteos e quantificação do tamanho desses por ultra-sonografia. Animais do outro grupo experimental (T2) foram tratados com seguinte protocolo: D0- administração de análogo do GnRH (100µg gonadorelina, PROFERTIL[®]), D7-administração de análogo da PGF2α (0,150 mg D-Cloprostenol, Prostaglandina Tortuga[®]), D9- administração de hCG (1000UI, VETECOR[®]), em D16 os ovários foram avaliados para presença de corpos lúteos e quantificação do tamanho desses por ultra-sonografia. A presença do CL foi observada em 83% dos animais do grupo controle (T1), e em 95,6% dos animais de T2. O diâmetro médio dos CL encontrados foi de 19,7mm para T1 e 17,6mm para T2. Os resultados encontrados demonstram que o protocolo utilizado em T2, com a administração de uma pequena dose intramuscular de hCG (1000 UI) foi eficiente para a formação de corpos lúteos em novilhas cíclicas.

**VARIAÇÃO NA TAXA DE CONCEPÇÃO DE VACAS NELORE LACTANTES
SINCRONIZADAS COM DISPOSITIVO INTRAVAGINAL DE PROGESTERONA
ASSOCIADO AO BENZOATO OU AO CIPIONATO DE ESTRADIOL**

Penteado, L.¹; Sá Filho, M.F.²; Martins, C.M.²; Gimenes, L.U.²; Ayres, H.²; Baruselli, P.S.²

¹ ETAPA, Jandaia dos Sul-PR, ² Departamento de Reprodução Animal, FMVZ/USP, 05508-000, São Paulo-SP, Brasil. luciano@grupocarlosmassa.com.br ou barusell@usp.br

Objetivou-se avaliar a taxa de concepção de vacas Nelore (*Bos indicus*) lactantes tratadas com dispositivo intravaginal de progesterona (P4; CIDR, Pfzier, Brasil) associado a duas doses (0,5 ou 1,0mg) de cipionato de estradiol (CE) no momento da retirada do CIDR ou a 1mg de benzoato de estradiol (BE) 24h após a retirada. Um total de 299 fêmeas paridas (60-90 dias pós-parto) receberam no início do tratamento (Dia 0) um CIDR associado a 2mg de BE, i.m.(Estrogin, Farmavet, Brasil). No Dia 8, realizou-se a remoção do CIDR e a administração de uma dose de PGF2 α (Lutalyse, Pfizer, Brasil). As fêmeas foram distribuídas homoganeamente de acordo com o escore de condição corporal e o período pós-parto em três grupos: Grupo 1mgBE (n=99) 1 mg de BE, i.m., 24 horas após a remoção do dispositivo intravaginal, Grupo 0,5mgCE (n=100) ou Grupo 1mgCE (n=100) 0,5 ou 1mg de CE, (ECP[®], Pfizer, Brasil) i.m. no momento da retirada do CIDR, respectivamente. As fêmeas foram inseminadas em tempo fixo (IATF) 52 a 56 horas após a remoção do CIDR, dividindo homoganeamente as partidas nos grupos. O diagnóstico de gestação foi realizado por ultra-sonografia aos 30 dias após a IATF. Os resultados foram analisados pelo teste de Qui-quadrado. Foi observada maior taxa de concepção no Grupo 1mgCE (55,0%, 55/100)^a do que nos Grupos 0,5mgCE (41,0%, 41/100)^b e 1mgBE (38,4%, 38/99)^b. A administração de 1mg de CE no momento da retirada do dispositivo intravaginal de P4 proporcionou maiores taxas de concepção do que 0,5mg CE ou 1mg de BE no dia 9. O Cipionato de estradiol na dose de 1mg como indutor de ovulação em programas de IATF possibilita a redução do número de vezes no qual os animais necessitam ser manejados e também facilita a sua administração pelo maior volume de farmaco utilizado, sem comprometer a eficiência do tratamento.

Agradecimento: Pfizer

DINÂMICA FOLICULAR DE NOVILHAS NELORE (*Bos indicus*) PRÉ-PUBERES TRATADAS COM IMPLANTE AURICULAR DE NORGESTOMET E BENZOATO DE ESTRADIOL ASSOCIADO OU NÃO À PROGESTERONA INJETÁVEL

Sá Filho, M.F.¹; Gimenes, L.U.¹; Madureira, E.H.¹; Baruselli, P.S.¹

¹Departamento de Reprodução Animal, FMVZ/USP, São Paulo-SP,
Cep 05508-000, Brasil. barusell@usp.br

Avaliou-se a dinâmica folicular de novilhas Nelore pré-púberes tratadas com benzoato de estradiol (BE) associados ou não a progesterona injetável (P₄) no início do tratamento com implante auricular de Norgestomet. Foram utilizadas 18 novilhas Nelore pré-púberes (ausência de corpo lúteo diagnosticado por ultra-sonografia no Dia -28, Dia -14 e no início do tratamento) subdivididas aleatoriamente em dois grupos experimentais (BE ou BE+P₄). No início do tratamento (Dia 0), as fêmeas receberam um implante auricular de Norgestomet (Crestar[®], Intervet, Brasil). O Grupo BE recebeu 2mg de BE i.m. (Estrogin[®], Farmavet, Brasil), enquanto o Grupo BE+P₄ recebeu 2mg de BE + 50mg de P₄ i.m. (Index Farmacêutica, Brasil). No Dia 8, realizou-se a remoção dos implantes e a administração de PGF₂α (Preloban[®], Intervet, Brasil) e, 24 horas após, foi administrado 1mg de BE. Avaliou-se por ultra-sonografia o diâmetro do folículo dominante (FD) no Dia 0 (FD0), o momento da emergência da nova onda de crescimento folicular (EF), o diâmetro do FD no Dia 8 (FD8), o diâmetro máximo do FD (FDMAX) e a taxa (TOV) e o momento (MOV) das ovulações. Os dados foram analisados pelo teste Anova e Qui-quadrado no programa estatístico SAS. Foram observadas ovulações no início do tratamento após a administração de BE (22,2%; 2/9) e da associação de BE+P₄ (44,4%; 4/9). Os resultados para as novilhas tratadas com BE vs. BE+P₄ foram: FD0 (1,12±0,05 vs. 1,05±0,04 cm; p>0,05), EF (3,33±0,33 vs. 2,67±0,19 dias; p>0,05), FD8 (0,86±0,07 vs. 1,01±0,07cm; p>0,05); FDMAX (1,05±0,05^a vs 1,26±0,06^b cm; p<0,05); TOV [(100,0% (8/8) vs. 77,7% (7/9); p>0,05]; MOV (73,7±1,7 vs 72,0±0,0h; p>0,05). Os resultados são indicativos de que é possível obter satisfatória taxa de ovulação sincronizada que possibilita a IATF em novilhas Nelore tratadas com BE ou BE+P₄ no início do tratamento com implante auricular de Norgestomet. Outros estudos deverão ser realizados para avaliar a taxa de concepção a IATF em novilhas Nelore pré-púberes com a utilização destes protocolos.

Agradecimentos: Intervet

EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE PGF₂ α NO INÍCIO DO TRATAMENTO COM IMPLANTE AURICULAR DE NORGESTOMET NA DINÂMICA FOLICULAR DE NOVILHAS NELORE (*Bos indicus*)

Torres-Júnior, J.R.S.¹; Sá Filho, M.F.¹; Gimenes, L.U.¹; Madureira, E.H.¹; Baruselli, P.S.¹

¹ Departamento de Reprodução Animal, FMVZ-USP, São Paulo-SP,
Cep 05508-000, Brasil. barusell@usp.br

Avaliou-se o efeito da administração de PGF₂ α ao início do tratamento com implante auricular de Norgestomet na dinâmica folicular de novilhas Nelore (*Bos indicus*). Vinte e duas novilhas cíclicas (20 a 24 meses e >325kg) foram pré-sincronizadas com duas doses de PGF₂ α (Preloban[®], Akzo Nobel, Intervet, Brasil) i.m., com intervalo de 14 dias (D-28 e D-14). No Dia 0, todos os animais receberam um implante auricular de 3 mg de Norgestomet (Crestar[®], Akzo Nobel, Intervet) associado a 2 mg i.m. de benzoato de estradiol (BE; Estrogin[®], Farmavet, Brasil). Neste momento, o Grupo PGF₂ α (n=11) recebeu uma dose de PGF₂ α , enquanto o Grupo Controle (n=11) não recebeu tratamento adicional. No Dia 8, retirou-se o implante e administrou-se PGF₂ α e, 24 horas após (Dia 9), foi aplicado 1 mg de BE em todos os animais. Os diâmetros foliculares foram monitorados no D0 (\emptyset D0), D8 (\emptyset D8), \emptyset folicular máximo (\emptyset MAX) e \emptyset do folículo ovulatório (\emptyset OV), momento da ovulação (MOV) e taxa de ovulação (TOV) por ultra-sonografia transretal. Os dados foram analisados pelos testes de ANOVA no programa SAS[®]. Não foi observado efeito do tratamento com PGF₂ α sobre os parâmetros avaliados (P>0,05). Os resultados dos grupos PGF₂ α e Controle foram, respectivamente: \emptyset D0: 0,97 \pm 0,07 vs 1,05 \pm 0,05; \emptyset D8: 0,98 \pm 0,05 vs 1,02 \pm 0,05; \emptyset OV: 1,17 \pm 0,05 vs 1,26 \pm 0,03; \emptyset MAX: 1,21 \pm 0,06 vs 1,30 \pm 0,03; MOV: 69,60 \pm 2,40 vs 72,00 \pm 0,00 horas; TOV: 91,0% (10/11) vs 82,0% (9/11). Pode-se concluir que é possível obter satisfatórias taxas de ovulação em novilhas Nelore utilizando implante auricular de Norgestomet e benzoato de estradiol, sem a indução da luteólise no início do tratamento.

Agradecimentos: Intervet.

TRATAMENTO COM hCG E LH, COMO INDUTORES DA OVULAÇÃO EM DOADORAS SUPERESTIMULADAS DA RAÇA NELORE, NÃO ALTERA A PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA OU A TAXA DE PRENHEZ

Nogueira, M.F.G.^{1*}; Buratini Jr., J.²; Barros, C.M.¹

Departamentos de ¹Farmacologia e ²Fisiologia, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, São Paulo, 18618-000, Brasil. marcelo@femanet.com.br

Os eventos subsequentes ao pico pré-ovulatório de LH estão relacionados à presença do receptor do LH (LHR) e sua afinidade pelo LH. Estudos de expressão gênica do LHR em células da teca e granulosa de folículos bovinos têm demonstrado a presença de, pelo menos, 4 transcritos alternativos para esse gene. Duas dessas isoformas poderiam ser traduzidas em proteínas funcionais, com afinidades distintas em relação aos ligantes. Uma das isoformas (“full-length”) teria afinidade pelo LH e hCG, enquanto que a outra isoforma (com deleção do exon 10) somente pelo hCG. Com base nessas informações, o presente estudo testou a hipótese de que, em vacas superestimuladas com FSH, a administração simultânea de LH e hCG, como uma tentativa de estimular qualquer variedade de LHR, resultaria em melhora na qualidade dos oócitos e/ou aumento nas taxas de ovulação. Vacas Nelore foram superestimuladas com o protocolo P36 (Barros, Porto e Nogueira, *Theriogenology*, 59:524, 2003) e os embriões colhidos após 7 a 8 dias da administração do indutor da ovulação. A ovulação foi induzida apenas com LH (pLH, 12,5 mg, im, Lutropin, Vetrepharm, Grupo 1) ou com LH (12,5 mg) e hCG (1.500 UI, im, Chorulon 5000, Intervet, Grupo 2). Ambos os grupos foram contemporâneos quanto à superestimulação e inovulação dos embriões. As médias de estruturas totais, embriões viáveis e taxa de viabilidade foram respectivamente: 14,6; 10,2 e 69,5% (grupo 1, n=65 colheitas) e 12,5; 9,8 e 78,2% (grupo 2, n=26), não havendo diferença estatística significativa ($P>0,05$). A taxa de prenhez de embriões inovulados a fresco (qualidades excelente, boa, regular e pobre) foi de 42,0% (266/634; grupo 1) e 41,5% (88/201; grupo 2, $P>0,05$). Quando a taxa de prenhez de cada qualidade embrionária é analisada separadamente, embriões de qualidade excelente, boa, regular e pobre produziram, respectivamente, 50,0; 42,8; 35,0 e 18,2% (grupo 1) e 43,7; 45,7; 35,0 e 26,7% (grupo 2). Conclui-se que a administração simultânea de hCG e LH, como indutores da ovulação em animais superestimulados, não alterou a produção de embriões viáveis ou a taxa de prenhez após inovulação a fresco desses embriões.

*Bolsista da FAPESP.

EFEITO DO TEMPO DE PERMANENCIA DO DISPOSITIVO INTRAVAGINAL DE PROGESTERONA SOBRE A TAXA DE GESTAÇÃO DE NOVILHAS DE CORTE

Gattass, C.B.A.¹; Sá Filho, O.G.²; Vasconcelos, J.L.M.²

¹Agropecuária JB, Miranda-MS. ²Departamento de Produção e Exploração Animal – FMVZ/UNESP, Botucatu-SP, 18618-000, Brasil. vasconcelos@fca.unesp.br

Uma limitação ao emprego da IATF em lotes grandes de vacas é o fato de os animais permanecerem muito tempo na mangueira, sofrerem maior estresse e serem inseminados fora do momento ideal. As limitações físicas do técnico após manipular a cérvix de muitos animais é também um fator relevante. Por outro lado, manejar o maior número de animais no menor número de dias trabalhados é uma forma de diluir o custo por animal tratado, pois maximiza-se a mão-de-obra. O objetivo deste estudo foi verificar se a antecipação em um dia na retirada do dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR[®]) altera a eficácia do protocolo de sincronização da ovulação proposto por Sá Filho et al. (2003; Rev. Bras. Reprod. Anim., 27:430), permitindo utilizar estratégias de manejo em que se iniciam os tratamentos num grande número de animais e insemina-se metade desses em um dia e a outra metade no dia seguinte. Foram utilizadas 333 novilhas mestiças (Nelore x Angus), com escore de condição corporal (ECC) entre 5 e 7 (escala de 1 a 9) e idade entre 18 e 24 meses. Todos os animais receberam, no Dia 0, CIDR[®] + Benzoato de Estradiol (BE; Estrogin[®] 2mg i.m.) e no Dia 7 injeção de PGF2 α (Lutalyse[®] 12,5mg i.m.). A partir desse momento, os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos, sendo o CIDR[®] retirado no Dia 8 (Grupo 1, n=152) ou no Dia 9 (Grupo 2, n=181). Em ambos os grupos, aplicou-se BE (0,8mg) 24 horas após a remoção dos dispositivos (Dia 9 no Grupo 1 e Dia 10 no Grupo 2) e as novilhas foram inseminadas 30 a 36 horas após a injeção de BE (Dia 10 no Grupo 1 e Dia 11 no Grupo 2). Entre os dias 17 e 25 após a IATF iniciou-se observação de cio e os animais que retornaram foram inseminados 12 horas após o estro. O diagnóstico de gestação foi realizado por palpação retal 40 e 65 dias após IATF. Não houve diferença entre os tratamentos quanto à taxa de prenhez na IATF (38,46% vs. 41,18% para os Grupos 1 e 2, respectivamente; P=0,69) e prenhez à IATF + retorno (66,35% vs. 57,84% para os Grupos 1 e 2, respectivamente; P=0,21). Também não foi detectado efeito de ECC na taxa de prenhez à IATF (38,99; 40,13; e 39,69% para os escores 5, 6 e 7, respectivamente; P=0,18). Estes dados sugerem que ambos os tratamentos (CIDR por 8 e 9 dias) proporcionam altas taxas de sincronização, evidenciando a possibilidade de se trabalhar com grandes lotes de animais, de forma que todo o lote pode ter o tratamento iniciado no mesmo dia e a IA realizada em dois dias diferentes com resultados semelhantes.

EFEITO DA CICLICIDADE E DO TRATAMENTO COM eCG NA DINÂMICA FOLICULAR E NA TAXA DE CONCEPÇÃO DE NOVILHAS NELORE TRATADAS COM IMPLANTE AURICULAR DE NORGESTOMET E BENZOATO DE ESTRADIOL

Sá Filho, M.F.¹; Penteado, L.²; Reis, E.L.¹; Gimenes, L.U.¹; Baruselli, P.S.¹

¹ Departamento de Reprodução Animal, FMVZ/USP, São Paulo-SP, Brasil, ² ETAPA, Jandaia do Sul-PR. barusell@usp.br

Um total de 177 novilhas Nelore foram selecionadas de acordo com a presença (Cíclicas) ou ausência (ÑCíclicas) de corpo lúteo (CL) no início do tratamento (Dia 0). As novilhas foram homogeneamente subdivididas em quatro grupos de acordo com a ciclicidade e com o tratamento com eCG no momento da retirada do implante de Norgestomet (Fatorial 2 x 2). No Dia 0, todas as fêmeas receberam um implante auricular de Norgestomet (Crestar[®], Intervet, Brasil) e 2 mg de benzoato de estradiol, i.m. (BE, Estrogin[®], Farmavet, Brasil). No Dia 8, retiraram-se os implantes e administrou-se PGF2 α , i.m. (Preloban[®], Intervet, Brasil). Os Grupos eCG receberam 400 UI de eCG, i.m. (Folligon[®], Intervet, Brasil) no Dia 8. Todas as novilhas receberam 1mg de BE, i.m. no Dia 9 e foram inseminadas em tempo fixo (IATF) 30-34 horas após o BE. Avaliou-se por ultra-sonografia o diâmetro do folículo dominante no Dia 8 (FD8), a taxa de ovulação (TOV; presença de CL cinco dias após a IATF), o diâmetro do CL cinco dias após a IATF (DCL), a taxa de concepção 30 dias após IATF (PR) e a taxa de concepção nos animais que ovularam (PROVU). Os dados foram analisados pelos testes de Anova e Qui-quadrado. Não foram observadas interações entre os tratamentos sendo os efeitos principais dos Grupos ÑeCG vs. eCG e ÑCiclando vs. Ciclando, respectivamente: [FD8 (0,82 \pm 0,02 vs. 0,86 \pm 0,02) e (0,89 \pm 0,02^a vs. 0,82 \pm 0,02^b), TOV (67,8%; 59/87^a vs. 86,7%; 78/90^b) e (81,1%; 43/53 vs. 75,8%; 94/124), CL (1,38 \pm 0,03^a vs. 1,55 \pm 0,03^b) e (1,42 \pm 0,04^a vs. 1,51 \pm 0,02^b), PR (36,8%; 32/87^a vs. 50,0%; 45/90^b) e (30,2%; 16/53^a vs. 49,2%; 61/124^b) e PROVU (54,2%; 32/59 vs. 57,7%; 45/78) e (37,2%; 16/43^a vs. 64,9%; 61/94^b); a \neq b, p<0,05]. Os dados são sugestivos de que é possível obter resultados satisfatórios em animais Ciclando e que o tratamento com eCG aumenta a taxa de concepção em novilhas Nelore tratadas com implante auricular de Norgestomet e benzoato de estradiol.

Agradecimentos: Intervet

DINÂMICA FOLICULAR DE NOVILHAS *Bos indicus* TRATADAS COM IMPLANTE AURICULAR DE NORGESTOMET OU COM DISPOSITIVO INTRAVAGINAL DE PROGESTERONA

Sá Filho, M.F.¹; Gimenes, L.U.¹; Ayres, H.¹; Carvalho, J.B.P.²; Carvalho, N.A.T.¹; Baruselli, P.S.¹

¹Departamento de Reprodução Animal, FMVZ/USP, São Paulo-SP; ²Instituto de Zootecnia, Pindamonhangaba-SP. barusell@usp.br

Utilizaram-se 48 novilhas cíclicas pré-sincronizadas com duas doses de PGF2 α (Dia-24 e Dia-12) e subdivididas em quatro grupos de acordo com a fonte de progesterona (P4; CIDR) ou de progestágeno (Crestar) e com a administração ou não de PGF2 α no início do tratamento (Dia 0; Fatorial 2 x 2). No Dia 0, administraram-se 2 mg de benzoato de estradiol i.m. (BE; Estrogin[®], Farmavet, Brasil) em todos os animais. O Grupo CIDR recebeu dispositivo intravaginal de P4 (CIDR[®], Pfizer, Brasil), enquanto que o Grupo CRESTAR, implante auricular de Norgestomet (Crestar[®], Intervet, Brasil). Os Grupos CIDR+PGF e CRESTAR+PGF receberam uma dose adicional de PGF2 α i.m. (Preloban[®], Intervet, Brasil) no Dia 0. No Dia 8, removeram-se os implantes ou dispositivos e administraram-se PGF2 α e no Dia 9, 1mg de BE. Avaliou-se por ultra-sonografia a dinâmica folicular de 24/24 horas do Dia 0 ao Dia 8 e de 12/12 horas do Dia 9 ao Dia 12. Os dados foram analisados quanto à normalidade dos resíduos e à homogeneidade das variâncias sendo transformados caso necessário. As variáveis foram analisadas pelos testes de Anova e Qui-quadrado e, especificamente, para a variável dispersão das ovulações pelo teste de Bartlett. Não se observaram interações, sendo os efeitos principais para os tratamentos CIDR vs CRESTAR e SEM vs. COM PGF, respectivamente: Ø FD no Dia 0 (1,01 \pm 0,03 vs. 1,00 \pm 0,04; 0,99 \pm 0,03 vs. 1,02 \pm 0,04 cm), momento da emergência folicular (3,1 \pm 0,15 vs. 2,9 \pm 0,13; 3,1 \pm 0,12 vs. 2,91 \pm 0,15 dias), Ø FD no Dia 8 (0,83 \pm 0,03^a vs. 0,99 \pm 0,03^b; 0,88 \pm 0,04 vs. 0,94 \pm 0,03 cm) Ø máximo do FD (0,97 \pm 0,04^a vs 1,17 \pm 0,04^b; 1,03 \pm 0,05 vs. 1,13 \pm 0,04 cm), taxa de crescimento folicular (0,10 \pm 0,01^a vs. 0,13 \pm 0,01^b; 0,11 \pm 0,01 vs. 0,12 \pm 0,01 cm/dia), taxa de ovulação [57,1% (12/21)^a vs. 83,3% (20/24)^b; 63,6% (14/22) vs. 78,3% (18/23)] e momento da ovulação após a retirada do implante (79,6 \pm 2,92^{ax} vs. 73,2 \pm 0,83^{by}; 77,1 \pm 2,42^x vs. 74,1 \pm 1,14^y horas; a \neq b, P<0,05; x \neq y, P<0,05 no teste de Bartlett). Verificou-se efeito do uso de PGF2 α no início do tratamento apenas na sincronização da ovulação. No entanto, o tratamento com o implante auricular de Norgestomet promoveu incremento na taxa de crescimento folicular, no diâmetro do folículo dominante, na taxa de ovulação e na sincronia das ovulações quando comparado ao dispositivo intravaginal de P4 em novilhas *Bos indicus*.

Agradecimentos: Intervet

EFEITO DE DIFERENTES NÍVEIS DE SUPLEMENTAÇÃO CONCENTRADA NO PERÍODO PÓS-PARTO SOBRE A DINÂMICA OVARIANA EM VACAS LEITEIRAS.

Rigo, A.G.¹; Salmazo, R.²; Schroeder, R.V.¹; Mizubuti, I.Y.²; Costa, M.C.¹; Seneda, M.M.¹

¹Departamento de Clínicas Veterinárias e Reprodução Animal Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, 86051-990, Brasil. ²Departamento de Zootecnia- Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, 86051-990, Brasil. agrigo@pop.com.br

Dentre os aspectos críticos para a produção leiteira e a eficiência reprodutiva, o fator nutricional possui expressivo impacto, devido ao balanço energético negativo. O objetivo deste trabalho foi estudar diferentes níveis de suplementação concentrada durante o período pós-parto e seus efeitos sobre a resposta reprodutiva de vacas leiteiras. Os tratamentos (T), foram distribuídos conforme o nível de concentrado fornecido: T1 (n=9) 1 kg de concentrado para cada 2,5 Kg de leite produzido; T2 (n=9) 1 Kg de concentrado para cada 2,0 Kg de leite e T3 (n=9) 1 Kg de concentrado para cada 1,5 Kg de leite produzido, implementados a partir do parto. Utilizou-se concentrado comercial com 75% de nutrientes digeríveis totais (NDT) e 18% de proteína bruta (PB). Os animais eram submetidos semanalmente à avaliação ultra-sonográfica para avaliação de corpo lúteo e número e diâmetro dos folículos visualizados. Diariamente os animais eram inspecionados para observação de cio. Após 44 semanas e 242 avaliações ultra-sonográficas, observou-se menor diâmetro do maior folículo em T2 (13,77mm), em comparação a T1 (15mm) e T3 (16,62mm). No entanto, para o aparecimento do primeiro cio, os animais do T2 apresentaram menor média no intervalo parto-primeiro cio (36 dias) em relação a T1 (41 dias) e T3 (50 dias). Estes resultados preliminares sugerem melhor eficiência do T2 quanto ao aparecimento do cio, apesar do menor diâmetro do maior folículo nos animais deste grupo. Ressalta-se que conclusões mais precisas serão possíveis com o término do trabalho.

Apoio: PBIC/CNPQ

SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL COM TEMPO FIXO DURANTE A ESTAÇÃO REPRODUTIVA EM OVELHAS MISTIÇAS

Castilho, C.¹; Mori, M.M.¹; Tomé, R.S.¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária, Reprodução Animal - UNOESTE, Campus II, P. Prudente – SP, 19067-175. calie@unoeste.br

O objetivo do presente experimento foi avaliar a taxa de prenhez de ovelhas, após a sincronização da ovulação para inseminação artificial com tempo fixo (IATF) com progestágeno, PGF2 α e eCG (gonadotrofina coriônica equína), realizando-se a IA com sêmen fresco diluído depositado na entrada da cérvix. Utilizou-se 53 ovelhas mestiças durante a estação reprodutiva (Junho) que foram mantidas em pasto de *Brachiaria* e recolhidas em barracão durante a noite para ingestão de sal mineral. A sincronização da ovulação em estágio aleatório do ciclo estral foi feita com inserção com esponjas vaginais impregnadas com 50 mg de acetato de medroxiprogesterona (dia 0) concomitante à 0,0375 mg IM de PGF2 α (D-Cloprostenol, Preloban[®], Intervet, Holanda), seis dias e meio após a inserção foi aplicado por via IM 300UI de eCG (Folligon[®], Intervet, Holanda) e 36 horas após o progestágeno foi retirado. Foram realizadas 2 IATFs, aproximadamente 48 e 72 horas após a retirada do progestágeno. O sêmen foi colhido no local (propriedade) e após avaliar a viabilidade, foi diluído em meio glicina gema em volume de 30 mL. Em cada ovelha 0,5mL de sêmen fresco diluído (no mínimo 250 milhões espermatozóides por dose) foi depositado na entrada da cérvix e aproximadamente 60 dias após as IAs foi realizado diagnóstico de prenhez utilizando-se aparelho de ultra-som Pie Medical[®] com probe linear transretal de 5,0 MHz. Das 53 ovelhas inseminadas 18 emprenharam com a IATF, resultando em 34% de prenhez, no entanto outras 7 ovelhas exibiram cio, foram cobertas pelo reprodutor e emprenharam no cio subsequente à IATF, ou seja aproximadamente 20 dias após, resultando em 25 (49%) das 53 ovelhas prenhez num período de aproximadamente 30 dias. Concluímos que o protocolo foi efetivo em sincronizar a prenhez e otimizar o reprodutor, porém novos experimentos terão que ser realizados a fim de melhorar estes índices. Agradecimento: Intervet Brasil e Arenales Fauna e Flora.

INDUÇÃO DA OVULAÇÃO COM GnRH OU BENZOATO DE ESTRADIOL E INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM DOIS DIAS OU EM TEMPO FIXO EM PROTOCOLOS DE INDUÇÃO DE ESTRO PARA VACAS DE CORTE EM PÓS-PARTO

Siqueira, L.C.; Oliveira, J.F.C.; Loguercio, R.S.; Lof, H.K.; Gonçalves, P.B.D.

Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Clínica de Grandes Animais Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal - BioRep, Santa Maria, RS, Brasil. bayard@biorep.ufsm.br

O objetivo do presente experimento foi comparar dois protocolos de indução de estro para vacas no período pós-parto (PP), utilizando GnRH e inseminação artificial (IA) em dois dias ou benzoato de estradiol (BE) e inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Foram utilizadas 250 vacas amamentado (50-70 dias PP), *Bos taurus*, predominante Red Angus, em condição corporal 3 (sendo 1-extremamente magra e 5-extremamente gorda). Esses animais receberam um pessário vaginal, contendo 250 mg de acetato de medroxi-progesterona (MAP) e uma injeção intramuscular (IM) de 5 mg de BE no dia 0 (início do tratamento). O pessário vaginal permaneceu por sete dias. No dia 6, foram aplicadas 400 UI de eCG por via IM e 5 mg de Dinoprost na submucosa vulvar, realizando nesse momento o início do desmame por 96 horas. Após a retirada dos pessários (dia 7), as vacas foram divididas em dois grupos. No grupo BioRep (n=150), as fêmeas foram observadas duas vezes por dia para detecção de estro por 48h e inseminadas (IA) 12 h após sua manifestação. Os animais que não manifestaram estro nesse período receberam uma injeção IM de 100 µg de GnRH, sendo inseminadas em tempo fixo (IATF), nas 16 a 18h seguintes. No grupo BE (n=100), as vacas receberam uma injeção de 1 mg de BE IM no dia 8 (24 horas após a retirada do MAP) e foram inseminadas em tempo fixo no dia 9 (54 horas após a retirada do MAP). O diagnóstico de gestação foi realizado por exame ultra-sonográfico 40 dias após IA. A análise estatística foi realizada pelo teste qui-quadrado. A percentagem de prenhez no grupo BioRep (54,7 %) foi maior ($p<0,01$) do que no grupo BE (33,3 %). Em situações que requerem elevados índices de prenhez, os protocolos de indução de estro de eleição para o período pós-parto, nas condições do Rio Grande do Sul, deverão empregar observação de estro por dois dias e utilização de GnRH para indução da ovulação ao contrário de BE associado a IATF. Trabalho realizado com apoio do CNPq e FAPERGS.

**SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO EM NOVILHAS PRÉ-PUBERES DAS RAÇAS
NELORE E BONSMARA, TRATADAS COM DISPOSITIVO INTRAVAGINAL
CONTENDO PROGESTERONA (PROTOCOLO PEPE)**

Ereno, R.L.¹; Pegorer, M.F.²; Nogueira, M.F.G.¹; Barros, C.M.²

¹Depto. de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ/UNESP, ²Depto. de Farmacologia – IBB/UNESP, 18618-0000 Botucatu-SP, Brasil. erenoronaldo@ig.com.br

Tratamentos hormonais com progesterona/progestágenos têm sido utilizados para induzir prenhez em vacas em anestro pós-parto. No presente trabalho foi avaliada a eficiência de um protocolo hormonal com progesterona na sincronização da ovulação de novilhas zebuínas (Nelore, n= 14) e taurinas (Bonsmara, n=14), adaptadas às altas temperaturas de climas tropicais. Novilhas pré-puberres com 18 meses de idades, peso médio de 321,8 +- 5,8 kg e escore corporal acima de 3,5 (escala de 1 a 5), foram tratadas com o protocolo PEPE (Progesterona-Estrógeno-Prostaglandina-Estrógeno). Em dia aleatório do ciclo estral, todos os animais receberam um dispositivo intravaginal contendo progesterona (1,0 g, DIB[®], Syntex, Argentina) e 2,0 mg de benzoato de estradiol (BE, via IM, Estrogin[®], Farmavet, Brasil). Oito dias mais tarde (D8) administrou-se PGF2a (150 mcg de d-cloprostenol, via IM, Prolise[®], ARSA, Argentina), e o DIB foi removido. Vinte e quatro horas após a remoção do DIB, as novilhas foram tratadas com BE (0,75 mg, IM) e 30 a 36h mais tarde todos os animais foram inseminados artificialmente em tempo fixo (IATF, D10), sem detecção do cio. Os ovários foram observadas ultra-sonografia (Aloka SSD 500, probe de 7,5 MHZ) nos dias 0, 8, 9, no momento da IATF (D10) e 12 h mais tarde, para avaliar o diâmetro folicular e a taxa de ovulação. A ausência de corpos lúteos durante os exames ultra-sonográficos confirmou que as novilhas eram pré-puberres. O tamanho médio dos folículos dominantes das novilhas Nelore e Bonsmara foram, respectivamente: 7,35±1,48 e 9,07±3,26mm (D8), 9,10±1,57 e 11,14±3,10 mm (D9) e 9,65±1,43 e 11,54±2,79 mm (D10). Os folículos que ovularam tiveram diâmetros de 8,5±1,22 mm (Nelore) e 11,5±3,01 mm (Bonsmara), minutos antes da IATF (D10). Uma novilha Nelore (7,1%) ovulou antes da IATF e 4/14 (28,6%) ovularam até 12 h após a IATF (ovulação sincronizada). No momento da IATF, 2 novilhas Bonsmara (14,28%) já haviam ovulado e 7/14 (50%) ovularam até 12 h após a IATF (ovulação sincronizada). A taxa de prenhez resultante da IATF foi de 7,1% (1/14) para as novilhas Nelore e 35,7% (5/14) para as Bonsmara. O protocolo PEPE foi mais efetivo (sincronização da ovulação) nas novilhas pré-puberres Bonsmara do que nas Nelores.

Apoio FAPESP.

EFICIÊNCIA DO D-CLOPROSTENOL PARA SINCRONIZAÇÃO EM DIFERENTES DIAS DO CICLO ESTRAL

Cembranelli, M.A.R.¹; Fernandes, C.A.C.²⁻³; Gioso, M.M.²; Figueiredo, A.C.S.²⁻³; Oliveira, E.R.³; Viana, J.H.M.⁴

¹Mestrando Ciência Animal – Unifenas; ²Prof. Faculd. Med. Vet. Unifenas – ³Biotran LTDA.

⁴Embrapa-Gado de Leite. Rua Tatuin, 93, Resid. Teixeira. 37130-000 – Alfenas MG –
cacf@biotran.com.br

A sincronização do estro em bovinos através de agentes luteolíticos, como prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) ou seus análogos, tem sido amplamente utilizado em programas reprodutivos e de transferência de embriões (Baird, 1992). O objetivo deste trabalho foi o de verificar a eficiência do cloprostenol sódico, via intramuscular, em diferentes fases do ciclo estral (diestro), em vacas e novilhas mestiças. Foram realizadas 293 aplicações de D-Cloprostenol sódico, visando a sincronização de estro em novilhas e vacas mestiças, utilizadas como receptoras num programa de Transferência de Embriões. Os animais foram observados em estro natural e divididos em 4 grupos de acordo com o dia do ciclo estral no momento da aplicação. Grupo A: do dia 6 ao 8; grupo B: dia 9 ao 11; grupo C: do dia 12 ao 14 e grupo D: do dia 15 ao 17 do ciclo estral. Todos os grupos receberam 150µg (2ml) de D-Cloprostenol Sódico via intramuscular. Após tratamento os animais foram mantidos em piquetes e foram submetidas a 3 observações diárias de estro, na presença de rufiões. ConsideroU-se o reflexo de imobilidade como indicativo do estro. A eficiência da sincronização em cada grupo foi comparada pelo teste de χ^2 . A eficiência geral média da sincronização foi de 77,15%, semelhante à descrita por outros trabalhos com o mesmo protocolo (Fernandes et al, 1997). A eficiência para os grupos A, B, C e D foi de 66,67^a; 78,43^b; 75,58^b e 78,43%^b, (P<0,05), respectivamente. Animais em períodos iniciais do ciclo estral apresentam menor sensibilidade aos análogos sintéticos da PGF pela menor sensibilidade para estas substâncias. O dia do ciclo estral interfere na sensibilidade ao d-cloprostenol.

BAIRD, D.T. *Animal Reprod. Science*, 28,3, 95-102, 1992.

FERNANDES, et al. *Brazilian J. Vet. Sci.* 4, 3, 107-109, 1997.

ESTUDO DE ALGUNS FATORES QUE PODEM INFLUENCIAR A TAXA DE PRENHEZ EM FÊMEAS ZEBUÍNAS, EM PROGRAMAS DE SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO ESTRO PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO

Bittencourt, R.F.¹; Ribeiro Filho, A. de L.¹; Chalhoub, M.¹; Alves, S.G.G.¹; Biscarde, C.E.A.¹; Almeida, A.K.¹; Portela, A.P.M.¹; Freitas, D.S.¹; Silva, A.A.B.¹; Santana, R.C.M.¹

¹Escola de Medicina Veterinária – UFBA, Salvador-BA, 40170-110, Brasil. rfbvet@yahoo.com.br

Duzentas e cinquenta fêmeas zebuínas foram divididas em quatro grupos experimentais. Inicialmente todos os animais foram avaliados quanto ao índice de escore corporal (IEC). O objetivo desse estudo foi verificar alguns fatores que podem influenciar a taxa de prenhez de fêmeas zebuínas, submetidas a protocolos de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Nos animais do Grupo 1 (G1 - n=102), aplicou-se subcutaneamente, um implante de silicone contendo 3 mg de Norgestomet, em estágio aleatório do ciclo estral, no dia dito como dia 0 (D0). Imediatamente após procedeu-se a administração intramuscular de uma solução contendo 3mg de Norgestomet e 5 mg de Valerato de Estradiol. Nos animais do Grupo 2 (G2 - n=20) e do Grupo 3 (G3 - n=78), foi utilizado o mesmo protocolo, porém, logo após a aplicação auricular do implante de Norgestomet, no G2 procedeu-se a administração intramuscular de 4,5mg de Norgestomet e 7,5 mg de Valerato de Estradiol e, no G3, o implante auricular foi reutilizado (segunda vez), e as concentrações administradas via intra-muscular foram semelhantes às do G2. Os animais do Grupo 4 (G4 - n=50) receberam um implante subcutâneo auricular, contendo 3mg de Norgestomet, em estágio aleatório do ciclo estral, no dia dito como D0. Logo após procedeu-se a administração intramuscular de uma solução contendo 50mg de Progesterona (P4) e 2mg de Benzoato de Estradiol (BE). Uma nova dose de BE (1mg) foi administrado aos animais do G4 no D10. Todos os animais tiveram seus implantes retirados nove dias depois (D9) e foram inseminados em tempo fixo, aproximadamente 56 horas após (D11). Foram observados os intervalos de tempo entre início do tratamento hormonal (colocação do implante auricular) e inseminação artificial (IA), início e retirada do implante (RI), RI e observação do cio, RI e IA, presença de cio e momento da IA. Para a análise estatística das características avaliadas, foi empregado o pacote estatístico Statistical Analysis System (SAS), versão 6.1. Os diversos intervalos observados não exerceram influência sobre a taxa de prenhez ($P>0,05$), quando estudados com a população em geral. Quando o estudo foi realizado por protocolo, no G1 observou-se correlação positiva do intervalo de tempo transcorrido entre administração do implante e IATF com a taxa de prenhez ($r=0,24$; $P<0,02$), bem como entre a taxa de prenhez e o intervalo decorrido da RI até IATF ($r=0,23$; $P<0,02$). Nesse grupo foi observado, dentre todos, o menor intervalo entre RI e IATF (52,17 h). Com isso pode-se considerar que as taxas de prenhez poderiam ser implementadas atrasando o momento das IATFs. Também foi observada uma importante correlação entre o IEC e a taxa de prenhez das fêmeas estudadas ($r=0,52$; $P<0,0001$), onde quanto maior o IEC, maior foi a taxa de prenhez conseguida. As correlações entre IEC e taxa de prenhez foram para G1, G2, G3 e G4 respectivamente, de $r=0,59$ ($P<0,0001$); $r=0,74$ ($P<0,0001$); $r=0,48$ ($P<0,0001$) e $r=0,41$ ($P<0,01$). Conclui-se com isso, a importância do IEC sobre a taxa de prenhez de vacas zebuínas submetidas a diferentes protocolos de sincronização para IATF.

COMPORTAMENTO DE ESTRO E TAXAS DE OVULAÇÃO EM FÊMEAS NELORE SINCROIZADAS COM PROGESTÁGENO, ESTRADIOL E GONADOTROFINA CORIÔNICA EQUINA

Bergamaschi, M.A.C.M.¹; Vicente, W.R.R.¹; Barbosa, R.T.²; Machado, R.²; Ibiapina, B.T.³; Baruselli, P.S.³; Alencar, M.M.²; Binelli, M.³

¹Universidade Estadual Paulista –UNESP– Campus de Jaboticabal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, Jaboticabal, SP. ²Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP. ³Universidade São Paulo – USP - Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. brunaibiapina@uol.com.br

A detecção do estro em *Bos indicus* é laboriosa e dificultada pelas características próprias desta sub-espécie, podendo limitar o maior uso da inseminação artificial. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de um protocolo de sincronização da ovulação a base de progestágeno e valerato de estradiol (CRESTAR[®], Intervet), associado ou não à gonadotrofina coriônica equina (eCG) sobre o diâmetro do folículo pré-ovulatório, a taxa de ovulação e nas manifestações estrais provenientes do protocolo de sincronização e do estro natural subsequente. Sessenta fêmeas da raça nelore, com aproximadamente 158 dias pós-parto e com bezerro ao pé, receberam um implante auricular contendo norgestomet e uma injeção de valerato de estradiol (IM). Após 9 dias o implante foi removido e os animais divididos aleatoriamente para receberem 0 ou 400 UI de eCG (IM). O estudo diário da dinâmica de crescimento folicular foi realizado por ultra-sonografia, a partir de 48 horas da retirada do implante até a ovulação natural subsequente. A observação do estro foi realizada diariamente e auxiliada por rufiões. Não houve efeito do tratamento com eCG na taxa de ovulação (70,00% para ambos os grupos), no momento da ovulação (80,00 ± 2,53 h após a remoção do implante para ambos os grupos) e nos diâmetros dos folículos pré-ovulatórios sincronizados (13,38 ± 0,39 e 12,72 ± 0,39 mm para os grupos recebendo 0 ou 400 UI de eCG, respectivamente; P>0,1). O intervalo inter-ovulatório do grupo Controle (21,38 ± 0,57 dias) não diferiu do tratado com eCG (21,75 ± 0,57 dias). Os 60% das vacas que não ovularam no ciclo estral subsequente ao sincronizado manifestaram comportamento estral. Também ocorreram ovulações sem a demonstração dos sinais estrais, tanto no ciclo estral sincronizado (42,86% em ambos os grupos) quanto no natural subsequente (33,33%, sendo 44,44% no grupo Controle e 22,22% no grupo eCG). Neste contexto, os procedimentos de inseminação artificial em tempo fixo proporcionam a possibilidade do acasalamento sem a observação do estro e podem potencialmente garantir a fecundação de até 70,00% das vacas submetidas a estes protocolos. Além do mais, a eCG proporciona uma maior manifestação dos sinais estrais no ciclo estral subsequente à ovulação sincronizada, o que pode facilitar o acasalamento de animais que não conceberam durante o procedimento de sincronização.

Apoio: FAPESP (01/09277-8; 02/08363-0), EMBRAPA e INTERVET INTERNATIONAL B. V.

REUTILIZAÇÃO DE IMPLANTES DE NORGESTOMET EM VACAS DA RAÇA NELORE.

Almeida, A.B.¹; Madureira, E.H.¹; Binelli, M.¹; Rossa, L.A.¹; Pimentel, J.R.V.¹;
Bertan, C.¹; Marques, V.M.¹

¹Departamento de Reprodução Animal - alexbar@usp.br - Av. Duque de Caxias Norte, 225 - FMVZ
- VRA - Pirassununga, SP, Brasil - CEP 13635-900.

Compararam-se as taxas de prenhez (TP) em vacas Nelore (*Bos taurus indicus*) utilizando implantes de norgestomet novos ou reutilizados associados ao valerato de estradiol (VE) e benzoato de estradiol (BE). Duzentos e quarenta e uma vacas Nelore amamentando foram separadas em dois grupos, e receberam implante auricular contendo 3 mg de norgestomet (n=122) ou implante de norgestomet (n=119) que já havia sido previamente utilizado por 10 dias. Os animais que receberam implante novo ou reutilizado, foram sub-divididos, e um lote recebeu uma injeção (IM) de 3 mg de norgestomet associados a 5 mg de VE e o outro, uma injeção (IM) de 50 mg de progesterona associados a 2 mg de BE. Na retirada do implante todos os animais receberam 1 aplicação de PGF2 α (IM) e 24 h após uma injeção de 1,0 mg de BE (IM). A IATF ocorreu 54-56 h após a retirada do implante. Os resultados foram analisados pelo programa computacional Statistical Analysis System (SAS, Institute Inc., 1985). As variáveis-resposta TP IATF e TP Final, foram submetidas à análise de variância pelo PROC GLM (SAS) que separou como causas de variação efeito do tipo de Implante (novo ou reutilizado), tipo de Ésteres de estradiol (valerato ou benzoato), Etapa, Estado de parição (primíparas ou múltiparas), Condição corporal (CC) e Condição ovariana (CO), além das interações duplas e triplas. Não houve interação entre tipo de implante e tipo de éster de estradiol para TP IATF nem TP Final ($p < 0,05$). As TP IATF não diferiram entre animais que receberam implante novo ou reutilizado (48,3 vs 48,7%) nem entre os que receberam VE ou BE (49,5 vs 47,5%). O mesmo ocorreu para TP Final segundo tipo de implante, novo ou reutilizado (85,2 vs 86,5%) e segundo tipo de éster de estradiol, (86,5 vs 85,2%). Conclui-se que vacas Nelore amamentando podem apresentar adequadas TP IATF e TP Final quando tratadas por implantes de norgestomet novos ou reutilizados associados indistintamente ao VE ou BE.

**EFEITO DA REUTILIZAÇÃO DE DISPOSITIVOS INTRAVAGINAIS CRONIPRES®
SUPLEMENTADOS COM ANÉIS DE PROGESTERONA EM VACAS NELORE
INSEMINADAS EM TEMPO FIXO**

Duarte, R.A.¹; Kozicki, L.E.¹; Bó, G.A.²; Gonçalves, R.³; Rosa, S.D.⁴

¹UFPR, Curitiba/PR, Brasil., ²Inst. de Reprod. Animal Córdoba, Córdoba, Argentina., ³Biogenesis Brasil, Curitiba/PR, Brasil., ⁴Agropecuária Cruzeiro, Francisco Beltrão/PR, Brasil.
radaduarte@ig.com.br

Este experimento teve como objetivo avaliar a reutilização dos dispositivos intravaginais de progesterona (DP4) Cronipres® (Biogenesis) suplementados com anéis contendo 100mg de progesterona (P4), sobre as taxas de prenhez em vacas *Bos indicus* (Nelore) lactantes submetidas à inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Foram utilizadas 158 vacas Nelore lactantes (55-70 dias pós-parto), mantidas a pasto em Francisco Beltrão-PR. Os animais foram divididos em 5 grupos (fatorial 2x2) de acordo com a condição corporal. No Dia 0, todos receberam 2mg de benzoato de estradiol (BE) IM (Estrogin®, Farmavet) e um DP4 (Cronipres®, Biogenesis) reutilizado de acordo com o grupo a que pertenciam. No Dia 8, o DP4 foi removido e administrado-se 0,15mg de d-cloprostenol (Croniben®, Biogenesis). No Dia 9, aplicou-se 1mg de BE IM (24 horas após a retirada do DP4). A IATF foi realizada 54 horas após a remoção do DP4. Foram utilizados sêmen de três touros distribuídos proporcionalmente em cada um dos 5 grupos. O grupo G-1 (n=31) recebeu um DP4 de segundo uso. O grupo G-2 (n=32) recebeu um DP4 de terceiro uso. O grupo G-3 (n=33) recebeu um DP4 de terceiro uso com dois anéis de P4 novos. O grupo G-4 (n=28) recebeu um DP4 de quarto uso com dois anéis usados e um anel novo. O grupo G-5 (n=34) recebeu um DP4 de quarto uso com 3 anéis novos. O diagnóstico de gestação foi realizado por ultra-sonografia 30 dias após a IATF. Analisaram-se as taxas de prenhez (TXP) por qui-quadrado. Não foi verificada interação entre os tratamentos. As médias para os grupos G1, G2, G3, G4 e G5 foram respectivamente: TXP: 41,9% (13/31) vs. 43,7% (14/32) vs. 36,3% (12/33) vs. 39,2% (11/28) vs. 47,0% (16/34; P>0,05). Segundo os resultados obtidos no presente experimento, não existe diferenças significativas entre as taxas de prenhez nos grupos analisados. Desta forma constatamos que até o quarto uso do DP4 (Cronipres®, Biogenesis) pode ser feito, mantendo as taxas de prenhez desde que suplementado com anéis de P4.

EFEITO DO TRATAMENTO COM 0,5 mg DE BENZOATO DE ESTRADIOL NO MOMENTO DA REINserÇÃO DO CIDR-B EM UM PROGRAMA DE RESINCRONIZAÇÃO DE CIO EM NOVILHAS

Balla, E.^{1,2}; Maraña Peña, D.^{1,2}; Chesta, P.²; Pincinato, D.^{1,2}; Peres, L.C.^{1,2}; Tríbulo, R.^{1,2}; Bó, G.A.^{1,2}

¹Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. ²Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC), Jerónimo Luis de Cabrera 106, X5000GVD, Córdoba, Argentina. gabrielbo@iracbiogen.com.ar

Foram realizados dois experimentos para avaliar o efeito da aplicação de 0,5 mg de benzoato de estradiol (EB) no dia da reinserção de um dispositivo intravaginal CIDR-B [1,9g progesterona, Pfizer Sanidade Animal, Argentina] sobre a taxa de retorno ao cio e as porcentagens de prenhez em novilhas resincronizadas. No Exp. 1 se utilizaram 121 novilhas Brangus e Braford de 18 a 24 meses de idade, com condição corporal (CC) de 2,5 a 3,5 (escala 1 a 5). As novilhas foram inseminadas em tempo fixo no Dia 0 e 13 dias depois receberam um CIDR-B de segundo uso e foram divididas aleatoriamente para receber ou não 0,5 mg de EB. Observou-se a presença de cios do Dia 20 (remoção do CIDR-B) até o Dia 25 e as novilhas foram IA 8 a 12 h mais tarde. No Exp. 2 se utilizaram 187 novilhas, similares ao Exp. 1 que foram resincronizadas da mesma maneira que no Exp. 1, com exceção que o CIDR-B foi reinsertado no Dia 14 e retirado no Dia 21. O diagnóstico de prenhez foi realizado por ultrassonografia aos 28 dias de finalizado o período de IA. Os dados foram analisados por regressão logística. Não se encontraram diferenças significativas na distribuição dos retornos ao cio ($P>0,5$) [CIDR-B: Exp. 1: $54,4\pm 5,0h$; Exp 2: $72,0\pm 5,1h$; e CIDR-B+0,5EB: Exp 1: $54,0\pm 4,0h$; Exp. 2: $75,5\pm 4,8h$]. Não se encontraram diferenças nas taxas de concepção a 1ª IA [CIDR-B: Exp 1: 39/61 (63,9%); Exp 2: 46/94 (48,9%) e CIDR-B+0,5EB: Exp 1: 35/60 (58,3%); Exp 2: 49/93 (52,7%); $P>0,1$], retorno ao cio [CIDR-B: Exp 1: 15/22 (68,2%); Exp 2: 20/49 (40,8%) e CIDR-B+0,5EB: Exp 1: 18/25 (72,0%); Exp 2: 17/44 (38,6%); $P>0,1$], taxa de concepção a 2ª IA [CIDR-B: Exp 1: 10/15 (66,7%); Exp 2: 7/20 (35,0%) e CIDR-B+0,5EB: Exp 1: 11/18 (61,1%); Exp 2: 10/17 (58,8%); $P>0,1$] e entre as taxas de prenhez [CIDR-B: Exp 1: 49/61 (80,3%); Exp 2: 53/94 (56,4%) e CIDR-B+EB: Exp 1: 46/60 (76,7%); Exp 2: 59/93 (63,4%); $P>0,1$]. Os resultados demonstram que a utilização de 0,5 mg de EB no momento da reinserção do CIDR-B em um protocolo de resincronização, não afeta a apresentação de cios, nem as taxas de concepção das IATF em novilhas.

EFEITO DA DOSE DE BENZOATO DE ESTRADIOL SOBRE OS ÍNDICES DE PREHEZ EM NOVILHAS TRATADAS COM DISPOSITIVOS CIDR-B

Balla, E.^{1,2}; Maraña Peña, D.^{1,2}; Chesta, P.²; Pincinato, D.^{1,2}; Peres, L.C.^{1,2}; Tríbulo, R.^{1,2}; Bó, G.A.^{1,2}

¹Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. ²Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC), Jerónimo Luis de Cabrera 106, X5000GVD, Córdoba, Argentina. gabrielbo@iracbiogen.com.ar

Foram feitos dois experimentos para avaliar o efeito da utilização de 1 ou 2 mg de benzoato de estradiol (EB) no momento da inserção de um CIDR-B (1,9 g progesterona, Pfizer Sanidade Animal, Argentina) sobre as porcentagens de prenhez em novilhas inseminadas em tempo fixo (IATF). Se utilizaram novilhas Brangus e Braford de 20 a 26 meses de idade, com uma condição corporal de 2,5 a 3,5 (escala 1 a 5). No experimento 1, todas novilhas (n=125) receberam um CIDR-B novo e foram divididas aleatoriamente em dois grupos, para receber 1 ou 2 mg de EB (Estradiol 10, Lab. Río de Janeiro, Argentina) no Dia 0. Todas novilhas receberam 500 µg de cloprostenol (PGF) no momento em que foi retirado os CIDR-B (Dia 8), 1 mg de EB 24 h mais tarde (Dia 9) e foram IATF 28 a 32 h depois (Dia 10). No experimento 2, as novilhas (n=187) receberam (Dia 0) 1 ou 2 mg de EB e foram subdivididas para receber um CIDR-B novo ou um CIDR-B de terceiro uso previamente esterilizado na autoclave. Os dispositivos de terceiro uso foram desinfetados com uma solução com amônia quaternária a 0,5% (Bagodryl, San Jorge Bagó, Argentina) durante 10 minutos e logo foram autoclavados (1,5 Atm., 122 °C, durante 20 minutos). Os CIDR-B foram retirados e a PGF administrada no Dia 7, 1 mg de EB no Dia 8 e se realizou a IATF no Dia 9 (28 a 32 h posterior ao EB). Em ambos experimentos, os diagnósticos de prenhez foram realizados por ultrassonografia (100 Falco Vet., Pie Medical, com transductor de 8 MHz) aos 70 dias da IATF. As taxas de prenhez no Experimento 1 foram comparadas mediante a prova de χ^2 e no Experimento 2 pela prova de Mantel Haenszel. Não houve diferença significativa ($P>0,24$) entre as taxas de prenhez dos grupos tratados com 1 ou 2 mg de EB em ambos Experimentos [1 mg EB, Exp 1: 34/62 (54,8%) e Exp 2: 50/97 (51,5%); 2 mg EB, Exp 1: 41/63 (65,1%) e Exp 2: 45/90 (50%)]. Ademais, no Experimento 2, não se encontrou um efeito significativo ($P>0,71$) nas taxas de prenhez das novilhas tratadas com CIDR-B novos (46/93, 49,5%) ou de terceiro uso (49/94, 52,1%). Os resultados de ambos experimentos demonstram que a aplicação de 1 ou 2 mg de EB com um CIDR-B novo ou de terceiro uso, ao começo de um protocolo para IATF, não afeta as taxas de prenhez em novilhas Braford e Brangus

TAXAS DE PRENHEZ DE VACAS NELORE APÓS A INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO E SUPLEMENTAÇÃO COM AGENTES LUTEOTRÓFICOS OU ANTÍ-LUTEOLÍTICOS

Machado, R.¹; Bergamaschi, M.A.C.M.¹; Barbosa, R.T.¹; Alencar, M.M.¹; Madureira, E.H.²;
Barbosa, P.F.¹; Bisinotto, R.S.²; Binelli, M.²

¹EMBRAPA Pecuária Sudeste, São Carlos-SP, C.P. 339, CEP 13560-970, Brasil. ²Departamento de Reprodução Animal - FMVZ/USP, Pirassununga-SP, 13635-900, Brasil. rsbinotto@yahoo.com.br

As perdas embrionárias em vacas de corte podem atingir 40% e são, em grande parte, devidas a falhas no reconhecimento materno da prenhez e conseqüente bloqueio à luteólise. Neste estudo testaram-se abordagens para reduzir essa mortalidade após uma inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Especificamente, procurou-se estimular a função luteínica com a administração de gonadotrofina coriônica humana (hCG) no 5º dia após a IATF e/ou inibir a função folicular com o uso do 17β-estradiol (E₂) no 12º dia após a IATF. Duzentos e vinte vacas adultas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), com pelo menos 240 dias pós-parto tiveram as ovulações induzidas pelo método “OvSynch” e receberam IATF 16 horas após a 2ª injeção de GnRH. Os animais foram a seguir divididos em quatro grupos de 55 vacas cada: Controle (Tc) não recebeu tratamento adicional, hCG (T_{hCG}) recebeu uma injeção i.m. de 3000 UI de hCG no D₅, E₂ (T_{E2}) recebeu uma injeção i.m. de 5 mg de E₂ no D₁₂ e grupo hCG/E₂ (T_{hCG/E2}) recebeu 3000 UI de hCG no D₅ (i.m.) e 5mg de E₂ (i.m.) no D₁₂. A IATF foi considerada o dia D₀ do experimento. Do D₅ ao D₆₄ foi observado o estro, 2 vezes/dia com auxílio de dois rufiões por grupo. O diagnóstico de gestação foi feito no D₃₁ e no D₉₉. As taxas de prenhez à IATF (TP_{IATF}) e acumulada (TP_{Acum} = TP_{IATF} + TP das IAs dos ciclos naturais subseqüentes até D₆₄) foram analisadas pelo Qui-quadrado (χ²), aplicando-se o Proc FREQ do programa SAS. Houve diferenças nas TP_{IATF} entre grupos (P<0,05). A TP_{IATF} do Tc e do T_{hCG} tenderam (0,10>P>0,05) a ser maiores (34,5% e 36,5%, respectivamente) que a do T_{hCG/E2} (18,2%), enquanto a TP_{IATF} para o T_{E2} (5,4%) foi a mais baixa (P<0,05). Ao final do experimento, a TP_{acum} para as vacas que receberam o E₂ no D₁₂ (T_{E2} + T_{hCG/E2}) foi menor (66,4%; P<0,05) que das vacas que não receberam (T_C + T_{hCG}) esse estrógeno (80,9%). Não houve efeito da hCG sobre as TP_{IATF} ou TP_{acum} (P>0,05). Em conclusão, a suplementação luteotrófica pela hCG para vacas Nelore sem bezerro ao pé, em bom estado corporal e com alta taxa de ciclicidade é dispensável pois não aumentou as taxas de prenhez, e a reprogramação ovariana com o E₂ após uma IATF causou redução na taxa de prenhez e esse dano não foi revertido ao longo do experimento.

Apoio financeiro: FAPESP (processo número: 02/08363-0), EMBRAPA.

TAXA DE OVULAÇÃO EM BÚFALAS SUBMETIDAS A PROTOCOLO DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO

Stella, E.D.¹; Oba, E.¹; Mota, A.V.¹; Lima Neto, J.F.¹; Gioso, M.M.¹

¹Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ – Unesp. Distrito de Rubião Júnior S/N, CEP:18618-000 – Botucatu – SP – Brasil – edaostella@fmvz.unesp.br

O objetivo do presente estudo foi o de avaliar a taxa de ovulação em fêmeas bubalinas submetidas a três diferentes protocolos hormonais com CRESTAR[®] na estação reprodutiva favorável (Fevereiro – Março). A avaliação da dinâmica folicular pós retirada do implante e ovulação foi realizada através da ultra-sonografia transretal com transdutor de 5MHz (Aloka 500) a cada 12 horas. Vinte e quatro vacas com mais de 45 dias de período pós parto foram aleatoriamente divididas em três grupos: (Grupo 1=G1, n=8; Grupo 2=G2, n=8 and Grupo 3=G3, n=8). Todos os animais (G1, G2 and G3) receberam um implante intra-auricular de liberação de progesterona (3mg of norgestomet, CRESTAR[®], Intervet) mais 2,0mg de Benzoato de Estradiol[®] (IM; Benzoato de Estradiol[®], Index) em momento aleatório do ciclo estral (Dia 0, PM). Os implantes permaneceram por 9 dias (Dia 9, PM) e no momento da remoção houve administração de uma dose luteolítica de um análogo da PGF2 α (0,15mg d-cloprostenol, Croniben[®], Biogenesis) em todos os animais, sendo que os grupos G1 e G3 receberam também 500 UI de eCG IM (Novormon[®], Syntex). Dois dias após (D11), as búfalas dos grupos 1 e 2 (G 1 e G2) receberam 1000UI of hCG (IM, Vetecor, Calier) 42 horas após a remoção do implante. Todos os animais foram inseminados 54 horas após a PGF2 α . A análise estatística foi realizada pelo teste de Qui-Quadrado e as taxas de ovulação nos três grupos (G1, G2 e G3) foi de 62,5, 50,0 e 75,0% respectivamente. Não havendo diferenças estatísticas na taxa de ovulação entre os três grupos até o dia 13 (P>0,05).

A REMOÇÃO TEMPORÁRIA DE BEZERROS (RTB) E/OU A APLICAÇÃO DE eCG, MELHORAM A TAXA DE PREENHEZ DE VACAS NELORE LACTANTES TRATADAS COM DISPOSITIVO INTRAVAGINAL LIBERADOR DE PROGESTERONA?

Pinheiro, V.G.^{1a}; Souza, A.F.^{1a}; Pegorer, M.F.¹; Ereno, R.L.²; Barros, C.M.¹

¹Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências, ²Departamento de Reprodução Animal, FMVZ-UNESP, Botucatu-SP, Brasil. viniciusgpinheiro@yahoo.com.br

Existem relatos na literatura que tanto a RTB como a adição de eCG podem aumentar a eficiência (taxa de prenhez) de tratamentos hormonais com progesterona/progestágenos, em vacas em anestro pós-parto. No presente trabalho a associação de RTB e/ou a aplicação de eCG foram testadas simultaneamente em protocolo hormonal com progesterona, comumente utilizado para inseminação artificial em tempo fixo (IATF) de vacas no período pós-parto. Os protocolos hormonais foram testados em 2 propriedades, nas quais vacas Nelore lactantes (40 a 70d pós-parto, n=281), com escore corporal acima de 2,5 (escala de 1 a 5), foram divididas ao acaso em 4 Grupos: PEPE, PEPE/RTB, PEPE/eCG e PEPE/RTB/eCG. Em estágio aleatório do ciclo estral (D0), os animais do grupo PEPE (Progesterona-Estrógeno-Prostaglandina-Estrógeno) receberam dispositivo intravaginal contendo progesterona (1,0 g, DIB[®]) e 2,5 mg de benzoato de estradiol (BE, via IM, Estrogin[®]). Oito dias mais tarde (D8) administrou-se PGF2 α (150 mcg de d-cloprostenol, via IM, Prolise[®]), e o DIB foi removido. Vinte e quatro horas após a remoção do DIB, as vacas foram tratadas com BE (1,0 mg, IM) e 30 a 36h mais tarde todos os animais foram IATF, sem observação do cio. No grupo PEPE/RTB, além do tratamento descrito acima (PEPE) os bezerros foram retirados das vacas por 54 h consecutivas (a partir da retirada do DIB até a IATF). No Grupo PEPE/eCG, os animais receberam o mesmo tratamento do grupo PEPE associado a uma aplicação de eCG (300 UI, via IM, Novormon[®]) no momento da administração da PGF2 α (D8). No Grupo PEPE/RTB/eCG, os animais foram tratados de acordo com o protocolo PEPE/RTB associado a aplicação de eCG (300 UI) no D8. Em todos os grupos experimentais foi realizado exame ultrassonográfico (Aloka SSD 500, probe de 7,5 MHZ) dos ovários, dez dias antes e no dia do início dos tratamentos hormonais, com a finalidade de verificar se os animais estavam em anestro (ausência de CL nos dois exames). Diagnóstico de prenhez foi realizado 30 dias após a IATF, por meio de ultra-sonografia. Os dados foram analisados por meio de regressão logística. Foram consideradas no modelo e não interferiram na taxa de prenhez as variáveis: fazendas, inseminadores e sêmen (touro). Oitenta por cento (80%) dos animais estavam em anestro (ausência de CL) e as taxas de prenhez foram semelhantes ($p>0,05$) entre os 4 grupos: PEPE (27/62 = 43,6%), PEPE/RTB (29/73 = 39,7%), PEPE/eCG (31/71 = 43,7%) e PEPE/RTB/eCG (31/75 = 41,3%). Os resultados indicam que em vacas Nelore em anestro pós-parto, porém em boas condições corporais, a RTB e/ou aplicação de eCG não melhoram a eficiência (taxa de prenhez) do protocolo PEPE. Novos experimentos estão em andamento para confirmar estes achados num maior número de animais.

Apoio FAPESP. Bolsas de mestrado do ^aCNPq.

**EFEITO DO PERÍODO PÓS-PARTO SOBRE A TAXA DE CONCEPÇÃO DE VACAS
NELORE SUBMETIDAS À INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO
FIXO COM USO DE CIDR**

Barrreiros, T.R.R.¹; Balarin, O.F.²; Baruselli, P.S.³; Seneda, M.M.⁴

¹Faculdade Integrado de Campo Mourão/PR, ²Apec Consultoria Agropecuária - Cornélio Procópio/PR, ³Departamento de Reprodução Animal FMVZ – USP, ⁴Departamento de Clínicas Veterinárias, CCA, UEL, PR, 86051- 990 thalesrigo@grupointegrado.br

O objetivo deste experimento foi analisar o efeito do período pós-parto sobre as taxas de concepção obtidas na inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Foram utilizadas 255 vacas Nelore lactantes, com 41 a 65 dias pós-parto, com condição corporal variando entre 2,5 a 4 (escala 1 a 5) e mantidas a pasto na região de Santa Rita do Pardo, Estado do Mato Grosso do Sul. Estes animais foram divididos em três grupos, constituindo o G1 (n=79), G2 (n=73) e G3 (n=103), respectivamente com 40 a 49, 50 a 57 e 58 a 65 dias pós-parto. Todas as vacas de cada grupo foram submetidas ao mesmo protocolo de sincronização da ovulação para IATF. Os animais receberam um dispositivo intravaginal contendo 1,9 g de progesterona (CIDR[®], Pfizer, Brasil) pela manhã e uma aplicação de 2 mg de benzoato de estradiol (BE); (Estrogin[®], Farmavet, Brasil) por via intramuscular (IM). No oitavo dia os dispositivos foram retirados pela manhã e os animais receberam uma dose de 25 mg de dinaprost, por via IM (Lutalyse[®], Pfizer, Brasil). Após vinte e quatro horas todos os animais receberam uma aplicação de 1 mg de BE, por via IM. Todos os animais foram inseminados 52 a 56 horas após a retirada dos dispositivos. O diagnóstico de gestação foi feito 45 dias pós a inseminação artificial por ultra-sonografia transretal (Aloka SSD 500, 5 MHz). Os resultados foram analisados pelo teste do Qui-quadrado corrigido de Yates. As taxas de concepção para os grupos G1, G2 e G3 não diferiram estatisticamente (P>0,05) e foram respectivamente 49,3% (39/79), 53,4% (39/73) e 56,3% (58/103). Não houve interação entre a condição corporal e as taxas de concepção obtidas. Conclui-se que a utilização de protocolos de IATF a base de progesterona em rebanhos comerciais, a partir de 40 dias pós-parto se constitui em uma alternativa viável para reduzir o período entre parto e concepção, contribuindo desta forma para a redução do intervalo entre partos e aumento da eficiência reprodutiva.

Apoio: Pfizer

INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO EM VACAS HOLANDEASAS DE ALTA PRODUÇÃO COM O USO DE BENZOATO DE ESTRADIOL E CLOPROSTENOL

Silveira, E.C.¹; Barreiros, T.R.R.²; Delboni, M.I.³; Oliveira, A.C.³; Padilha, L.C.³; Seneda, M.M.⁴

¹Produtiva Assessoria Pecuária, Londrina/PR, ²Faculdade Integrado de Campo Mourão/PR,

³Graduandas do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual de Londrina,

⁴Departamento de Clínicas Veterinárias, CCA, UEL, PR, 86051- 990 thalesrigo@grupointegrado.br

O objetivo do presente experimento foi avaliar a utilização do tratamento com benzoato de estradiol e cloprostenol para inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em vacas leiteiras de alta produção. Foram utilizadas 414 vacas cíclicas da raça Holandesa, com 50 a 180 dias de lactação, 24 a 96 meses de idade e condição corporal de 2,5 a 3 (escala de 1 a 5). O experimento foi conduzido durante os meses de maio a dezembro de 2004, em duas propriedades nos municípios de Londrina e Rolândia, Estado do Paraná. Os animais foram divididos em 2 grupos equiparados quanto à condição corporal e período pós-parto. No grupo controle (G-CON, n=214), as vacas foram mantidas em observação de cio no período da manhã e tarde e inseminadas 12 horas após a detecção. No grupo EPE (G-EPE, n=200), os animais receberam, em momento aleatório do ciclo estral, 2 mg de benzoato de estradiol (BE - Estrogin, Farmavet, Brasil) por via intramuscular (IM). No oitavo dia procedeu-se à administração de 150 µg de cloprostenol por via IM (Veteglan, Calier, Brasil). Vinte e quatro horas depois, todos os animais receberam 1 mg de BE por via IM e foram inseminados em tempo fixo após 30 horas da última aplicação de BE. O diagnóstico de gestação foi realizado 60 dias após a inseminação artificial por palpação retal. Os resultados foram analisados pelo teste do Qui-quadrado corrigido de Yates. As taxas de concepção das duas propriedades foram agrupadas e não apresentaram diferença significativa ($P>0,05$), resultando em 37,3% (80/214) e 40,5% (81/200), respectivamente para o G-CON e para o G-EPE. Considerando-se os aspectos críticos da detecção do cio e da obtenção de prenhez em vacas leiteiras de alta produção, os resultados obtidos com o G-EPE mostram-se muito promissores. Além de viabilizar taxas de prenhez bastante satisfatórias, ressalta-se o baixo custo deste protocolo e a facilidade de manejo obtida.

EFICIÊNCIA DE DOSES REDUZIDAS DE ACETATO DE FERTIRELINA EM PROGRAMAS DE IATF (OVSYNCH) EM VACAS LEITEIRAS

Gioso, M.M.¹; Fernandes, C.A.C.^{1,2}; Oba, E.¹; Carvalho, M.A.P.³; Vasconcelos, T.D.²

¹ Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ/UNESP, Botucatu-SP, 18618-000, Brasil. ² Biotran LTDA– Alfenas, MG, Brasil. ³ Médico Veterinário.
mmgioso@yahoo.com.br

Inúmeros produtos à base de GnRH são efetivos em protocolos de IATF. Entretanto, o Acetato de Fertirelina é um análogo deste fármaco cujas informações sobre sua ação na dinâmica folicular dos bovinos são muito inconsistentes. Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi comparar a eficiência de duas doses distintas da Fertirelina, para sincronização de onda de crescimento folicular e indução da ovulação, em rebanhos leiteiros submetidos ao programa Ovsynch. Utilizou-se 77 vacas de origem leiteira, entre 60-120 dias pós-parto e escore corporal entre 2,5-4,0 (escala 1-5). Os animais foram avaliados previamente por ultra-sonografia (ESAOTE, modelo Falco-100; transdutor linear 6/8MHz), e foram introduzidos no experimento aqueles que apresentavam população folicular e corpo lúteo (CL) característico ou ainda ausência de CL, porém presença de pelo menos um folículo com diâmetro \geq 10mm. As fêmeas foram distribuídas aleatoriamente em quatro tratamentos: Grupo 1 (n=21)- 100 μ g (dose integral) de Fertirelina (Fertigen[®], Schering Plough - Coopers, Brasil) no dia 0; 500 μ g de PGF2 α (Ciosin[®], Schering Plough - Coopers, Brasil) dia 8 e 100 μ g de Fertirelina dia 10. Grupo 2 (n=21)- 100 μ g de Fertirelina no dia 0; 500 μ g de PGF2 α dia 8 e 50 μ g de Fertirelina dia 10. Grupo 3 (n=19)- 50 μ g de Fertirelina no dia 0; 500 μ g de PGF2 α dia 8 e 100 μ g de Fertirelina dia 10. Grupo 4 (n=16)- 50 μ g de Fertirelina no dia 0; 500 μ g de PGF2 α dia 8 e 50 μ g de Fertirelina dia 10. Todas as aplicações foram realizadas com agulhas 25X07, via intramuscular (semitendinoso-semimembranoso). Avaliações ultra-sonográficas foram realizadas durante os tratamentos e as imagens foram gravadas em fitas VHS para mensuração dos folículos e CLs. Os valores do diâmetro do folículo pré-ovulatório no momento da aplicação de PGF2 α e no dia da aplicação do Fertigen[®], de acordo com os tratamentos, foram comparados por ANOVA. A taxa de indução de uma nova onda de desenvolvimento folicular após a primeira aplicação de Fertirelina, e a taxa de indução de ovulação após a segunda aplicação foram comparadas pelo teste χ^2 . Os diâmetros dos folículos pré-ovulatórios, de acordo com os tratamentos, no dia 8 (grupo 1: 1,51cm; grupo 2: 1,51cm; grupo 3: 1,56cm e grupo 4: 1,54cm) e no dia 10 (grupo 1: 1,55cm; grupo 2: 1,62cm; grupo 3: 1,59cm e grupo 4: 1,82cm) foram semelhantes ($p > 0,05$). As taxas de sincronização da primeira onda folicular nos quatro tratamentos foram: 50,0%; 78,5%; 76,9% e 75,0%, respectivamente ($P > 0,05$) com média de 70,0%. As taxas de ovulação ao final dos tratamentos também foram similares nos quatro grupos: 66,6%; 52,3%; 63,2% e 87,5%, respectivamente ($P > 0,05$) com média de 66,2%. Os efeitos alcançados pelas doses 50 μ g e 100 μ g de Fertirelina nos protocolos de IATF são similares aos encontrados por outros produtos citados na literatura (Bartolome et al., J. Dairy Sci, v.85, p.99, 2002). Em conclusão, a Fertirelina foi eficiente tanto para sincronização da onda de desenvolvimento folicular no início do protocolo Ovsynch, como na indução de ovulação ao final do mesmo, e sugere-se que doses de 50 μ g de Fertirelina podem ser indicadas sem comprometimento nos resultados finais do programa.

COMPARAÇÃO ENTRE PROTOCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL COM TEMPO PRÉ FIXADO EM FÊMEAS BOVINAS

Abreu, C.O.¹; Martinez, A.C.¹; Pires, R.M.L.²; Centenaro, E.A.³;
Bertonsello, L.G.³; Zampiva, W.K.³

¹Doutorando do curso de pós graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em reprodução animal, FCAV – UNESP, Jaboticabal. cassianabreu@ig.com.br ²Pesquisadora Científica V, APTA - Instituto de Zootecnia de Nova Odessa ³Acadêmico do curso de Medicina Veterinária da UFPR, campus Palotina.

A necessidade de observar estro dos animais é o principal entrave à inseminação artificial (IA). A IA com tempo pré-definido surge como alternativa, pois o uso de hormônios permite induzir a ovulação nestas fêmeas. O presente trabalho objetivou verificar a eficácia do protocolo Presynch para sincronização da ovulação e IA com tempo pré-fixado em fêmeas bovinas, comparando-o com o protocolo Ovsynch. Utilizou-se 17 vacas Nelore em cada grupo. No protocolo Ovsynch, foram aplicados 200 µg de Gonadorelina (Profertil® - Tortuga Companhia Zootécnica, São Paulo, Brasil) no início do tratamento (D0); no D7 foram aplicados 150µg de D+ Cloprostenol (Prostaglandina Tortuga® - Tortuga Companhia Zootécnica, São Paulo, Brasil). No D9 foram administrados 200-µg de Gonadorelina (Profertil®), 20 a 24 horas após esta aplicação foram inseminados todos os animais deste grupo. No grupo Presynch foi aplicado no início do tratamento (D0) 150µg de D+ Cloprostenol (Prostaglandina Tortuga®); no D14 foi realizada uma segunda dose do mesmo medicamento. No D16 administraram-se 200 µg de Gonadorelina (Profertil®). Entre 20 a 24 horas após esta última aplicação foi realizada a IA. Após a inseminação, foi realizada a observação de estro dos animais, duas vezes ao dia, com intervalo de 12 horas e duração de 45 minutos cada período de visualização. A eficácia dos tratamentos foi observada pela taxa de não retorno ao estro em um período de 35 dias após a inseminação artificial. Os resultados foram analisados pelo teste do Qui-quadrado. Os tratamentos Ovsynch e Presynch apresentaram taxa de não retorno de 47,06% e 58,82% respectivamente, não havendo diferença entre eles (p>0,05). Portanto o protocolo Presynch demonstrou eficiência técnica e econômica, custando aproximadamente US\$ 5,00 a menos que o Ovsynch, por animal.

DINÂMICA FOLICULAR DE VACAS NELORE TRATADAS COM CIPIONATO OU BENZOATO DE ESTRADIOL EM PROTOCOLOS DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO

Martins C.M.¹; Castricini, E.S.C.¹; Sá Filho, M.F.¹; Gimenes, L.U.¹; Baruselli, P.S.¹

¹Departamento de Reprodução Animal, FMVZ – USP, São Paulo – SP, CEP 05508-000, Brasil.
barusell@usp.br

Avaliou-se o efeito do indutor de ovulação [Cipionato de estradiol (CE) ou Benzoato de estradiol (BE)] ou do momento da sua administração (dia da retirada do dispositivo intravaginal de progesterona ou 24 horas após) na dinâmica folicular de vacas Nelore (*Bos indicus*). Foram utilizadas 33 vacas Nelore lactantes, divididas homogeneamente de acordo com a condição corporal e o período pós-parto em quatro grupos (fatorial 2x2). Em dia aleatório do ciclo estral (Dia 0), os animais receberam 2mg de BE, i.m. (Estrogin[®], Farmavet, Brasil) e um dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR[®], Pfizer, Nova Zelândia). No Dia 8, removeram-se os dispositivos e administrou-se PGF2 α i.m. (Lutalyse[®], Pfizer). Os grupos CE0 (n=9) e CE24 (n=8) receberam 0,5mg de CE (ECP[®], Pfizer) na retirada do dispositivo ou 24 h após, respectivamente. Nos grupos BE0 (n=8) e BE24 (n=8) foi administrado 1mg de BE no mesmo momento dos grupos anteriores. Determinaram-se a taxa (TOV) e o momento de ovulação (MOV), bem como o diâmetro máximo do folículo dominante (DFMAX) por exames ultrasonográficos de 12/12h. Os dados foram analisados pelos testes Anova, Qui-quadrado e Bartlett. Não houve interação entre o tratamento e momento da administração, sendo os efeitos principais para CE vs. BE, respectivamente: TOV [88,0% (15/17) vs. 81,0% (13/16); P>0,05]; MOV (76,8 \pm 2,82^{a,x} vs. 67,4 \pm 1,69^{b,y} horas; P < 0,05), DFMAX (1,28 \pm 0,04 vs. 1,35 \pm 0,03 cm; P > 0,05). Os efeitos do momento da administração do indutor (0 vs 24 h) foram: TOV [94,0% (16/17) vs. 75,0% (12/16); p > 0,05], MOV (68,3 \pm 1,81^a vs. 78,0 \pm 3,01^b horas; p < 0,05), DFMAX (1,30 \pm 0,02 vs. 1,34 \pm 0,05 cm; P > 0,05). Os resultados sugerem que a administração de CE promove atraso e menor sincronização das ovulações. Também, a aplicação de ambos indutores (CE ou BE) no momento da retirada do dispositivo intravaginal de progesterona promove menor intervalo entre a remoção e a ovulação em vacas Nelore.

PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA DE VACAS HOLANDESAS A DIFERENTES PROTOCOLOS DE SUPEROVULAÇÃO COM INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO

Martins, C.M.¹; Castricini, E.S.C.¹; Reis, E.L.¹; Torres-Júnior, J.R.S.¹; Gimenes, L.U.¹; Sá Filho, M.F.¹; Baruselli, P.S.¹

¹Departamento de Reprodução Animal, FMVZ/USP, São Paulo/ SP, CEP 05508-000, Brasil.
barusell@usp.br

Um total de 16 vacas holandesas (>30L/dia e ≥60 dias de lactação) mantidas em sistema de confinamento foram divididas em quatro grupos: P24LH48; P24LH60; P36LH48 e P36LH60 (fatorial 2x2; cross-over). Os animais receberam dispositivo intravaginal de progesterona (P₄; DIB[®], Syntex, Argentina) no Dia-1 e 2 mg de benzoato de estradiol (BE; Estrogin[®], Farmavet, Brasil) no Dia 0. A superestimulação foi realizada com 200mg de FSHp (Folltropin-V[®], Bioniche, Canadá) em 8 doses decrescentes de 12/12 horas, a partir do Dia 4. No Dia 6, administrou-se uma dose de PGF2α (Prolise[®], Tecnopec, Brasil). Em relação à PGF2α, os dispositivos de P₄ foram retirados 24 (P24) ou 36 (P36) horas após e o LH (25mg de LH, Lutropin-V[®], Bioniche, Canadá) 48 (LH48) ou 60 (LH60) horas após. As inseminações foram realizadas 12 e 24 horas após o LH utilizando mesma partida de um único touro. A colheita dos embriões foi realizada no Dia 15. Para a análise utilizaram-se os testes de Anova e Qui-quadrado. Não houve interação entre as variáveis, sendo os efeitos principais para os tratamentos P24 vs P36 e LH48 vs LH60, respectivamente: taxa de ovulação (49,9±5,7 vs 60,9±4,8% e 53,1±5,3 vs 57,5±5,4%; p>0,05), taxa de recuperação (67,4±5,8 vs 69,9±6,4% e 64,4±6,5 vs 73,1±5,5%; p>0,05), estruturas totais (4,4±0,9 vs 5,0±0,9 e 3,8±0,7 vs 5,7±1,0; p>0,05), embriões Grau 1 (2,4±0,6 vs 3,2±0,7 e 1,6±0,4^a vs 4,0±0,8^b; p<0,05), embriões degenerados (0,9±0,2 vs 0,6±0,3 e 1,0±0,3 vs 0,5±0,1; p>0,05), embriões transferíveis (3,0±0,7 vs 4,1±0,9 e 2,3±0,5^a vs 4,9±0,9^b; p<0,05) e embriões congeláveis (2,9±0,7 vs 3,8±0,8 e 2,1±0,5^a vs 4,7±0,9^b; p<0,05). Houve efeito do momento da administração de LH (LH60) no número embriões Grau 1, transferíveis e congeláveis. Os resultados são sugestivos de que a administração de LH 60 horas após a PGF2α aumenta a produção de embriões em vacas Holandesas de alta produção superovuladas e inseminadas artificialmente em tempo fixo.

Agradecimentos: Tecnopec

EFEITO DO TRATAMENTO COM PGF2 α NA INSERÇÃO E/OU TRATAMENTO COM eCG NA REMOÇÃO DO DISPOSITIVO INTRAVAGINAL DE PROGESTERONA NA TAXA DE CONCEPÇÃO À INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO EM NOVILHAS NELORE

Marques, M.O.¹; Sá Filho, M.F.¹; Gimenes, L.U.¹; Figueiredo, T.B.¹; Sória, G.F.²; Baruselli, P.S.¹

¹Departamento de Reprodução Animal, FMVZ/USP, São Paulo-SP ²Departamento de Reprodução, UNESP, Jaboticabal-SP. barusell@usp.br

Objetivou-se avaliar o efeito da administração de prostaglandina (PGF2 α) na inserção e/ou de gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) na retirada do dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR-B) em novilhas Nelore (*Bos indicus*) submetidas à inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Um total de 392 novilhas (>300kg, criadas a pasto) foram avaliadas por ultra-sonografia (US) e classificadas em 3 categorias de acordo com o status ovariano [A- com corpo lúteo (CL); B- sem CL mas com folículo dominante (FL) \geq 8mm ou C- sem CL e com FL <8mm]. No início do tratamento (Dia 0) todas novilhas receberam um CIDR (Pfizer, Nova Zelândia) e 2mg de benzoato de estradiol, i.m. (BE; Estrogin[®], Farmavet, Brasil). No Dia 8 removeram-se os dispositivos e administrou-se uma dose de PGF2 α , i.m. (Lutalyse[®], Pfzier, Brasil). No Dia 9, foi administrado 1mg de BE, i.m., e a IATF foi realizada 30 a 34 horas após, utilizando sêmen com fertilidade comprovada, distribuindo homogeneamente as partidas nos grupos. O Grupo Controle não recebeu nenhum tratamento adicional, enquanto o Grupo PGF recebeu uma dose de PGF2 α no Dia 0, o Grupo eCG recebeu 400 UI de eCG (Novormon[®], Syntex, Argentina) no Dia 8 e o Grupo PGF/eCG recebeu ambos os tratamentos. O diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias após a IATF por US e os dados foram analisados pelo teste de Qui-quadrado. Não foram observadas interações entre os tratamentos, sendo os efeitos da administração da PGF2 α , do eCG e do status ovariano sobre a taxa de prenhez de: Sem PGF2 α (24,7%; 49/198) vs Com PGF2 α (25,8%; 50/194), Sem eCG (15,7%^a; 31/197) vs Com eCG (34,9%^b; 68/195) e status ovariano A. (27,6%; 63/264), B (20,6%; 20/97) e C (19,4%; 6/31). Conclui-se que houve aumento na taxa de prenhez com o uso de eCG. A administração de PGF2 α no início do tratamento não aumentou a taxa de concepção em novilhas Nelore.

Agradecimentos: Pfzier

SUPEROVULAÇÃO COM INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO EM DOADORAS *Bos indicus* TRATADAS COM IMPLANTE AURICULAR DE NORGESTOMET OU DISPOSITIVO INTRAVAGINAL DE PROGESTERONA

Chiari, J.R.¹; Demétrio, D.¹; Sá Filho, M.F.²; Ayres, H.²; Baruselli, P.S.²

¹SAMVET, Morrinhos-GO, Brasil. ²Departamento de Reprodução Animal, FMVZ/ USP, São Paulo/ SP, Brasil. . barusell@usp.br

Avaliou-se a utilização de implante auricular de Norgestomet (Crestar) ou do dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR) em protocolos de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo (SOTF) em doadoras Guzerá (*Bos indicus*). Um total de 30 fêmeas foi homoganeamente subdivididas em dois grupos experimentais (Crestar ou CIDR). No início do tratamento (Dia 0), as fêmeas do Grupo Crestar (n=15) receberam um implante auricular contendo Norgestomet (Crestar, Intervet, Brasil), enquanto as do Grupo CIDR (n=15) receberam um dispositivo intravaginal de progesterona (P4; CIDR, Pfzier, Brasil). Em ambos os grupos associaram-se 2,0 mg de benzoato de estradiol + 50mg de P4 i.m.(Index Farmaceutica, Brasil). O tratamento superovulatório foi realizado pela administração de 133mg de FSHp (Folltropin, Bioniche, Canadá) em 8 doses decrescentes com intervalo de 12 horas a partir do Dia 4. No Dia 6, foi administrado duas doses (manhã e tarde) de PGF2 α (Preloban, Intervet, Brasil). A remoção do implante foi realizada 36 horas (P36) e administrou-se 250mg de GnRH (Fertagil, Intervet, Brasil) 48 horas após a primeira PGF2 α . Avaliou-se a resposta aos tratamentos por ultrasonografia ovariana. Os dados foram analisados pelos testes de Anova e Qui-quadrado. Os resultados para os Grupos Crestar vs. CIDR foram, respectivamente: folículos >8mm no dia da colheita (1,2 \pm 0,4 vs 1,3 \pm 0,3; p>0,05), corpos lúteos no dia da colheita (7,0 \pm 1,0 vs. 6,5 \pm 1,0; p>0,05), taxa de recuperação (89,3 \pm 5,1 vs. 83,6 \pm 6,0%; p>0,05), total de estruturas (6,0 \pm 0,9 vs 5,3 \pm 1,0; p>0,05), embriões transferíveis (3,1 \pm 1,0 vs. 3,3 \pm 0,9; p>0,05), estruturas não fertilizadas (1,7 \pm 0,6 vs 0,50 \pm 0,3; p>0,05) e estruturas degeneradas (1,1 \pm 0,2 vs. 1,3 \pm 0,4; p>0,05). Não foram observadas diferenças entre os Grupos Crestar e CIDR nas variáveis analisadas. Os resultados são sugestivos de que implantes auriculares de Norgestomet e dispositivos intravaginais de P4 apresentam resposta semelhante em protocolos de SOTF.

Agradecimento: Intervet

A INFLUÊNCIA DAS CONCENTRAÇÕES HORMONAIAS SOBRE A TAXA DE CONCEPÇÃO DE VACAS ZEBUÍNAS SUBMETIDAS A PROTOCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO.

Ribeiro Filho, A. de L.¹; Bittencourt, R.F.¹; Chalhoub, M.¹; Alves, S.G.G.¹; Biscarde, C.E.A.¹; Almeida, A.K.¹; Portela, A.P.M.¹; Freitas, D.S.¹; Silva, A.A.B.¹; Santana, R.C.M.¹

¹Escola de Medicina Veterinária – UFBA, Salvador-BA, 40170-110, Brasil. alisboa@ufba.br

Duzentas vacas zebuínas foram divididas aleatoriamente em três grupos experimentais. Antes do início do experimento foram avaliadas as seguintes características: idade, índice de escore corporal, status reprodutivo de cada. O objetivo desse estudo foi avaliar a influência das concentrações hormonais sobre a taxa de concepção de vacas zebuínas submetidas a protocolos de sincronização da ovulação para inseminação em tempo fixo (IATF). Para tanto, os animais do Grupo 1 (G1 - n=102), receberam 3mg de Norgestomet em um implante auricular, em estágio aleatório do ciclo estral, no dia dito como D0. Imediatamente após procedeu-se a administração intramuscular de uma solução contendo 3mg de Norgestomet e 5 mg de Valerato de Estradiol (VE). Nos animais do Grupo 2 (G2 - n=20) e do Grupo 3 (G3 - n=78), foi utilizado o mesmo protocolo, porém, logo após a aplicação auricular do implante de Norgestomet, no G2, procedeu-se a administração intramuscular de 4,5mg de Norgestomet e 7,5 mg de VE e, no G3, o implante auricular foi reutilizado (segunda vez), e as concentrações administradas via intra-muscular foram semelhantes às do G2. Nove dias depois (D9) os implantes foram retirados e os animais inseminados em tempo fixo, aproximadamente 56 horas após (D11). As inseminações foram realizadas pelo mesmo inseminador e foi utilizado sêmen de apenas um touro. As partidas de sêmen foram avaliadas, sendo utilizadas somente aquelas que alcançaram os requisitos básicos nas características físicas e morfológicas. O diagnóstico de gestação foi realizado 60 dias após a inseminação artificial, através da palpação retal. Para comparar a taxa de prenhez entre os grupos estudados, utilizou-se um estudo de dispersão de frequências, empregando-se para isso o teste de Qui-quadrado (χ^2). As taxas de prenhez dos animais do G1, G2 e G3 foram respectivamente, 33%; 19% e 41%. Não foi observada diferença estatística ($P>0,05$) para as taxas de prenhez, bem como para o índice de escore corporal entre os grupos estudados. Conclui-se com isso, a possibilidade de reutilização do implante auricular com Norgestomet (duas vezes), sem comprometer os índices de gestação de fêmeas zebuínas submetidas à protocolos de sincronização para IATF.

INFLUÊNCIA DO ESCORE CORPORAL SOBRE A TAXA DE CONCEPÇÃO EM NOVILHAS ZEBUÍNAS, SUBMETIDAS A SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO E INSEMINADAS EM TEMPO FIXO.

Bittencourt, R.F.¹; Ribeiro Filho, A. de L.¹; Chalhoub, M.¹; Alves, S.G.G.¹; Biscarde, C.E.A.¹; Silva, A.A.B.¹; Santana, R.C.M.¹; Vasconcelos, M. F.¹; Leandro, E.E.S.²

¹Escola de Medicina Veterinária – UFBA, Salvador-BA, 40170-110, Brasil. ²Veterinário Autônomo. Salvador-BA, Brasil. rfbvet@yahoo.com.br

Cinquenta fêmeas zebuínas nulíparas foram divididas em dois grupos experimentais, com o objetivo de estudar a influência do índice de escore corporal (IEC), sobre a taxa de prenhez de novilhas submetidas a um protocolo de sincronização do estro e ovulação para inseminação em tempo fixo (IATF). Antes do início do experimento todas os animais foram avaliadas quanto IEC, onde a escala de pontuação variou de 1 a 5: As fêmeas de 1 a 2, foram classificadas como muito magras; 2,5 como magras; 3 moderada; 3,5 boa; 4 gorda e 4,5 a 5 as muito gordas. Com base nessa classificação foram formados os dois grupos experimentais. Fizeram parte do primeiro grupo (G1 - n=30), os animais com IEC abaixo de 3, e o segundo grupo (G2 - n=20), as novilhas com IEC igual ou superior a 3. Todos os animais receberam um implante subcutâneo auricular, contendo 3mg de Norgestomet, em estágio aleatório do ciclo estral, no dia dito como D0. Imediatamente após procedeu-se a administração intramuscular de uma solução contendo 50mg de Progesterona (P4) e 2mg de Benzoato de Estradiol (BE). Nove dias depois (D9) os implantes foram retirados. No Dia 10 os animais receberam 1mg de BE e foram inseminados em tempo fixo, aproximadamente 56 horas após a retirada dos implantes (D11). As inseminações foram realizadas pelo mesmo inseminador e foi utilizado sêmen de apenas um touro. As partidas de sêmen foram avaliadas, sendo utilizadas somente aquelas que alcançaram os requisitos básicos nas características físicas e morfológicas. O diagnóstico de gestação foi realizado 60 dias após a inseminação artificial, através da palpação retal. Para comparar a taxa de prenhez entre os grupos estudados, utilizou-se um estudo de dispersão de frequências, empregando-se para isso o teste de Qui-quadrado (χ^2). Vinte e dois por cento das novilhas ficaram prenhes (11/50). As taxas de prenhez dos animais do G1 e G2 foram respectivamente, 10% (3/30) e 40% (8/20). Foi observada diferença estatística ($P < 0,02$) para as taxas de prenhez entre os grupos estudados. A interferência do índice de escore corporal das novilhas zebuínas, no início do protocolo de sincronização do ciclo estral para a IATF, demonstrada nesse estudo, ressalta a sua importância, para a implementação das taxas finais de concepção.

USO DA ULTRASONOGRAFIA PARA SELEÇÃO DE VACAS EM PROGRAMA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO (IATF).

Nogueira, E.¹; Silva, A.S.²; Araújo, J.M.²; Tolentino, R.L.L.³

¹Doutorando FCAV-UNESP eriklis@yahoo.com ²Gênese Reprodução Animal ³Méd Veterinário

Neste experimento foi avaliada a utilização de ultrasonografia transretal com para verificação do status ovariano de vacas com bezerro ao pé, e a influencia desta sobre a taxa de gestação em um programa de sincronização de cio e inseminação artificial em tempo fixo. Para o estudo foram utilizadas 252 vacas Nelore, paridas, com media de 71,3 dias pós-parto, condição corporal média de 5,2 em uma escala de 1 a 9, e peso médio de 416,7 kg, em uma propriedade no Mato Grosso do Sul. O protocolo para sincronização do Estro e ovulação foi: Dispositivo de progesterona intravaginal mantida por oito dias (CIDR), sendo aplicada uma dose de 2 mg intramuscular de BE no momento do implante. No momento da retirada do implante de progesterona, foi aplicada 2 ml de prostaglandina intramuscular, seguida de uma aplicação de 1 mg de BE I.M. 24 horas após. A IATF foi realizada 32 horas após a segunda aplicação de BE, totalizando 56 horas pós-retirada. A avaliação do status ginecológico dos animais foi realizada no dia da colocação do implante utilizando um aparelho Falco 100 Vet (Pie Medical, Holanda) com sonda linear de 8 MHZ, e os animais foram classificados em três grupos: CL- Presença de um corpo lúteo em um dos ovários; F1: Presença de ao menos um folículo maior que 8 mm em um dos ovários; F2: Presença de folículos menores a 8 mm nos ovários. A análise dos dados, realizada pelo teste de Qui-quadrado, demonstrou que a distribuição dos animais dentro dos grupos foi de 24,6; 49,2 e 26,2% para os grupos CL, F1 e F2, respectivamente e as taxas de gestação a 1ª IA foram de 56, 59 e 45% para os mesmos grupos, sendo maiores ($p < 0,05$) para os grupos CL e F1 em relação a F2. Para taxa de gestação a 2ª IA, não houve diferença entre os grupos, com médias de 53, 52 e 50% para os grupos CL, F1 e F2 respectivamente. Os dados sugerem que a avaliação prévia quanto ao status ovariano de vacas no pós-parto pode ser útil e elevar a taxa de gestação de programas de IATF, na medida que utilizamos animais que apresentem ciclicidade no pós-parto, ou mesmo lançando mão de fármacos, como PMSG, em animais que não apresentem condições adequadas de ciclicidade no momento de inicio de programas de IATF.

SISTEMA DE VISÃO ARTIFICIAL A LASER: UMA FERRAMENTA PARA A AVALIAÇÃO DE SÊMEN UTILIZADO EM BIOTÉCNICAS DA REPRODUÇÃO*

Carvalho, P.H.A.¹; Barreto Filho, J.B.¹; Rabelo, G.F.²; Braga Jr., R.A.²;
Albuquerque, F.T.¹; Rossi, R.O.S.D.¹

¹Departamento de Medicina Veterinária, ²Departamento de Engenharia - UFLA, Lavras – MG, 37200000, Brasil. barreto@ufla.br *Patente INPI – PI 0301926 - 8

A avaliação de viabilidade dos espermatozoides após o descongelamento é essencial para o controle de qualidade do sêmen, especialmente com a expansão de biotecnologias tais como a produção de embriões *in vitro*. A avaliação pela microscopia de luz e contraste de fase constitui um método simples e rápido para a verificação das características físicas do sêmen. Porém, variações de 30 a 60% foram relatadas quando uma mesma amostra foi submetida à avaliação por diferentes observadores (Iguer-Ouada & Verstagem, Theriogenology, v. 55, n. 3, p. 733-749, 2001). A utilização de um Sistema de Visão Artificial a Laser (SVAL), que utiliza o fenômeno do *biospeckle*, gera um valor denominado Momento de Inércia (MI), capaz de quantificar a atividade biológica de um material iluminado (Arizaga, Optics & laser technology, v. 4-5, p. 1-7, 1999), podendo constituir um método objetivo e que mantém a viabilidade do sêmen, permitindo sua utilização em processos de reprodução artificial. Este trabalho objetivou avaliar a qualidade de sêmen congelado da espécie bovina pelo SVAL, comparando o MI gerado pelo *biospeckle* com os parâmetros de vigor e motilidade, obtidos na microscopia, concentração espermática total e concentração de células móveis, estabelecendo correlações entre os dois métodos. Trinta palhetas de 0,5 ml foram descongeladas a 37° C por 30 segundos e alíquotas de 10 µl foram classificadas pela microscopia quanto ao vigor e a motilidade. Imediatamente, cada amostra foi iluminada pelo laser, gerando imagens sucessivas do *biospeckle* que foram captadas por uma câmera e transformadas em uma matriz espaço por tempo, denominada *Spatial Temporal Speckle*, a partir da qual extraiu-se o MI. De cada palheta, retirou-se uma alíquota, conservando-a em formol-salina para o cálculo da concentração espermática total e concentração de células móveis. Realizou-se correlação de Spearman entre os parâmetros avaliados pela microscopia e o MI gerado pelo laser para cada amostra iluminada, utilizando-se o programa estatístico SAS (SAS INSTITUTE SAS/STAT, SAS/IML software, version 6, 1990, 501p). Os valores de MI apresentaram correlação positiva significativa ($p < 0,0001$) com os parâmetros de vigor ($r = 0,90$), motilidade ($r = 0,98$) e concentração de células móveis ($r = 0,82$), mostrando coerência entre atividade biológica do sêmen e o índice gerado pelo SVAL. Entre concentração espermática total e MI não houve correlação significativa ($p > 0,05$), demonstrando não haver influência significativa da concentração espermática sobre os valores de MI, para as concentrações espermáticas encontradas, que variaram de 10 a 500 X 10⁶ espermatozoides por mililitro de sêmen. Os resultados indicam que o SVAL apresenta sensibilidade e coerência na avaliação da qualidade de sêmen bovino pós-descongelamento, apontando para sua possível utilização na análise de amostras de sêmen em centrais de biotecnologias da reprodução animal.

PADRONIZAÇÃO DE UM NOVO TESTE HIPOSMÓTICO (HOS) PARA A AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA NA ESPÉCIE CANINA.

Silva, K.V.G.C.^{1,2}; Cunha, I.C.N.²; Rocha A.A.²; Lopes, B.V.²; Silva, J.F.S.²

¹Experimento conduzido durante a iniciação científica da autora – bolsa PIBC/CNPq e auxílio financeiro FAPERJ; ²Laboratório de Melhoramento Genético Animal/CCTA/UENF- Av. Alberto Lamego, 2000. Campos dos Goytacazes - RJ. cunhaicn@uenf.br

Os espermatozoides (sptzs) com membrana plasmática íntegra quando expostos a uma condição hiposmótica buscam equilibrar sua pressão osmótica absorvendo água do compartimento extracelular, em consequência haverá aumento de volume intracelular que provocará um evidente enrolamento da cauda espermática. Com objetivo de utilizar este princípio fisiológico simples de manutenção do equilíbrio osmótico foi desenvolvido o teste hiposmótico (HOS), que avalia a integridade das membranas espermáticas (KUMI- DIAKA, *Theriogenology*, v.39, p.1279-89, 1993). Segundo BRITO *et al.* (*Theriogenology*, n.60, p.1539-51, 2003) o HOS é um método de avaliação espermática que contribui significativamente em prever a taxa de fertilização *in vitro* de uma amostra seminal. Para a realização do HOS os sptz são expostos a condição de hiposmolaridade em soluções que podem variar de 50 a 150 mOSM/L tendo sido também descrita a utilização de água destilada como solução hiposmótica (LIN *et al.*, *Fertility and Sterility*, v.70, n.6, p. 1148-55, 1998). O objetivo do experimento foi verificar a possibilidade da utilização de água para a realização do HOS na espécie canina. Foram utilizados 10 ejaculados de 4 cães adultos, com motilidade $\geq 60\%$, que foram elevados ao volume de 5ml em meio Kenney e divididos. Uma das alíquotas foi mergulhada em N_2 por 3 vezes consecutivas para obtenção de uma amostra com membrana espermática sabidamente lesada (SL), enquanto a outra alíquota, considerada como contendo sptzs sabidamente íntegros (SI), permaneceu em Banho-maria a 37°C. Foram feitas diluições entre a amostra com sptzs sabidamente lesados (SL) e a com sptzs sabidamente íntegros (SI) nas seguintes proporções: G1 – 100% da amostra SL ; G2 – 75% da amostra SL e 25% da amostra SI; G3 – 50% da amostra SL e 50% da amostra SI; G4 – 25% da amostra SL e 75% da amostra SI e G5 – 100% da amostra SI. Após as diluições, a motilidade espermática (%) de todas as amostras foi subjetivamente avaliada e os resultados médios obtidos para cada grupo foram: G1- 0 ± 0 ; G2 – $24,5 \pm 13,01$; G3 – $52 \pm 10,33$; G4 - $67 \pm 9,2$ e G5 – $82 \pm 11,1$. Uma amostra de cada grupo foi misturada na proporção de 1:4 v/v em água obtida diretamente da torneira do laboratório e incubada em Banho-maria a 37°C por 5 minutos. O resultado do HOS foi verificado sob microscopia de campo claro avaliando-se, para cada grupo, 200 sptzs. Foram considerados íntegros os sptzs reativos (RE) ao HOS, ou seja, os que apresentavam cauda enrolada. A porcentagem média de sptzs RE obtida em cada grupo foi: G1- $0,75 \pm 1,3$; G2- $12,95 \pm 6,3$; G3- $27 \pm 7,2$; G4- $37,15 \pm 12,7$ e G5- $50,85 \pm 17,6$. Após análise estatística foi observada alta correlação entre sptzs RE e a porcentagem de sptz sabidamente íntegros em cada grupo ($R^2 = 0,9982$) e entre sptz RE e a motilidade espermática ($R^2 = 0,9843$). Os resultados do presente estudo indicam que o teste hiposmótico utilizando a água como solução hiposmótica pode ser utilizado para avaliar a integridade de membranas espermáticas no cão.

ANÁLISE E CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL PROTÉICO DO PLASMA SEMINAL E ESPERMATOZÓIDES DE EQUINOS

Araújo, E.B.¹; Souza, G.V.¹; Silva, J.F.S.¹; Fagundes, B.¹

¹Laboratório de Melhoramento Genético Animal – Biotecnologia do Sêmen – CCTA/UENF Campos dos Goytacazes – RJ 28013-602 Brasil.

araujoeb@yahoo.com.br

O objetivo deste trabalho foi caracterizar o perfil protéico do plasma seminal (PS), das células espermáticas (CE) e ambos (PS + CE) antes e após o processo de concentração das proteínas destes tratamentos, visando avaliar se o processo de concentração das proteínas é eficiente e identificar qual tratamento contém uma maior concentração final de proteínas. Além disto, a partir da caracterização do perfil protéico dos tratamentos, objetivamos também avaliar se existe uma variação ou uma repetição no perfil protéico entre garanhões, ejaculados e os diferentes tratamentos utilizados. Foram utilizados neste experimento três garanhões e de cada um foi coletado três ejaculados que foram processados e posteriormente suas proteínas foram quantificadas e qualificadas pelos métodos de Bradford (Bradford, 1976) e por eletroforese (Laemmli, 1970), respectivamente. O processo de concentração das amostras mostrou ser eficiente, pois a concentração protéica inicial era muito menor quando observada a concentração após a redução 10 vezes do seu volume inicial. As amostras PS + CE que antes do tratamento apresentavam uma concentração protéica média de 6,45mg/mL, passaram a uma concentração média de 46,20mg/mL. As amostras de proteínas das CE saíram de 0,58mg/mL para 4,06mg/mL e por fim as proteínas do PS foram de 10,41mg/mL para 34,67mg/mL. A partir da análise do perfil de proteínas encontradas nos tratamentos dos três ejaculados coletados dos três garanhões podemos verificar que existe uma variação de 9 a 26 bandas protéicas nas amostras de PS, de 6 a 25 bandas no PS + CE e de 6 a 26 bandas nas amostras de proteínas das CE. No entanto, de todas as proteínas avaliadas, aquelas que apresentam massa molecular em torno de 20 a 23 kDa foram as únicas que se repetiram em todos os tratamentos. Isto se deve, muito provavelmente, ao fato destas proteínas estarem relacionadas ao processo de reversão do choque térmico (Barrios, 2000) e ter sido utilizado o choque térmico para extrair as proteínas com a finalidade de formar os tratamentos deste experimento. Concluindo que as concentrações médias das proteínas demonstram que o processo de concentração das mesmas em filtro AMICON® foi eficiente; o processamento do plasma seminal juntamente com células espermáticas apresentou após a sua concentração uma maior concentração final de proteínas; existe uma grande variação no perfil protéico entre ejaculados, garanhões e os diferentes tratamentos e a banda protéica em torno de 20 a 23kDa apresentou-se com uma área bem representativa em todas as amostras.

BRADFORD, M. M. (1976) A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

LAEMMLI, U.K (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

BARRIOS, B.(2000) Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biol. Reprod.*, 63:1531-1537.

EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A MOTILIDADE DURANTE A COLHEITA E NO PERÍODO DE REFRIGERAÇÃO DE SÊMEN EQUÍNO.

Andrade, M.P.¹; Silva, J.F.S.^{1,3}; Souza, G.V.¹; Fagundes B.¹; Costa D.S.¹; Detmann E.²

¹Laboratório de Melhoramento Genético Animal, UENF, Campos dos Goytacazes-RJ, 28013-602, Brasil. ² Departamento de Análise Estatística, UFV, Viçosa-MG, Brazil

O resfriamento do sêmen de garanhões para seu transporte e subsequente inseminação artificial tem se difundido na indústria equina. O objetivo deste trabalho de pesquisa é o de otimizar a conservação de sêmen equino a fresco (6 ± 1 °C), aumentando sua sobrevivência através de um resfriamento imediato a uma temperatura de 22 ± 1 °C no momento da coleta e ao longo de seu processamento. Este trabalho de pesquisa ocorreu em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil, situado nas coordenadas: Latitude 2145 Sul / Longitude 4117 Oeste e Altitude 11 m. Quarenta e dois ejaculados de 3 garanhões foram usados neste estudo. O experimento foi conduzido segundo delineamento inteiramente casualizado, seguindo um esquema de parcelas sub-subdivididas (Campos, 1984; Steel et al., 1997), sendo os garanhões considerados as parcelas principais e os ejaculados as subparcelas. Contudo, nenhuma fonte de variação de interesse foi aplicada sobre as parcelas principais ou sobre as subparcelas, sendo o fator “temperatura de coleta” alocado às sub-subparcelas. Os resultados foram submetidos à análise de variância empregando-se somas de quadrado do tipo III. Os ejaculados foram coletados em vagina artificial (V.A.) modelo Hannover modificada por meio de um dispositivo em forma de “Y” invertido, cujas extremidades desembocam em 2 copos coletores. Um deles é mantido à temperatura ambiente e o outro é resfriado a 22 ± 1 °C. A superioridade da motilidade da porção do ejaculado coletada no copo refrigerado em relação à coletada no copo à temperatura ambiente, foi mantida após o processamento do sêmen resfriado (6 ± 1 °C) em todos os momentos subsequentes de análise (24, 48 e 72 horas). Tendo em vista os resultados obtidos, recomenda-se a coleta de sêmen equino em uma vagina artificial equipada com um copo coletor resfriado à temperatura de 22 ± 1 °C.

Palavras chave: Equino, Sêmen, Coleta refrigerada, Motilidade espermática

CARACTERÍSTICAS SEMINAIS E RESISTÊNCIA AO RESFRIAMENTO DE ESPERMATOZOÍDES EM GARANHÕES DA RAÇA CRIOULA -PRELIMINARES

Boff, A.L.N.¹; Curcio, B.R.²; Frey, F.J.¹; Nogueira, C.E.W.¹; Torres, A.¹;
Moraes, C.M.²; Bongalhardo, D.³

¹Departamento de Clínicas Veterinárias – FV - UFPel; ²Centro de Biotecnologia-UFPel;

³Departamento de Fisiologia e Farmacologia – IB – UFPel; Campus Universitário s/n 96010-900, Pelotas-RS. alnboff@yahoo.com.br

Existem poucos registros das características seminais em animais da raça Crioula, não existindo trabalhos que relacionem essas características com a idade dos garanhões. Este trabalho tem como objetivo: 1) descrever características seminais quantitativas e qualitativas de garanhões jovens e adultos da raça Crioula; 2) comparar a utilização do diluidor de *Kenney*, com adição de amicacina (KA) ou gentamicina (KG) no resfriamento de sêmen de garanhões crioulos; 3) comparar efeitos do resfriamento de espermatozoides livres de plasma seminal com os diferentes meios. De agosto a outubro de 2004 foram realizadas cinco coletas, com vagina artificial, de seis garanhões da raça Crioula; sendo três jovens (3 anos) e três adultos (> 8 anos). Após a coleta o sêmen foi submetido à avaliação das características qualitativas (motilidade, vigor e morfologia espermática) e quantitativas (volume e concentração espermática). Cada ejaculado foi dividido em 4 alíquotas: 1 e 2 foram imediatamente diluídas (1:1) em KA e KG; 3 e 4 foram centrifugadas (600G) e tiveram ressuspendido nos respectivos meios (KA e KG). As amostras foram resfriadas a 5°C e avaliadas quanto à motilidade e vigor após 24, 48 e 72 horas. Os dados foram submetidos à estatística descritiva, Anova e teste de Tukey. As características seminais qualitativas e quantitativas não demonstraram diferença entre garanhões jovens e adultos ($p > 0,05$). Os valores médios obtidos foram: volume livre de gel 30 ml, concentração $101,74 \times 10^6$ /ml, porcentagem de espermatozoides morfolologicamente normais 72,6%, número total de espermatozoides ejaculados (TEE) $2,85 \times 10^9$, número total de espermatozoides viáveis (TEV) $2,16 \times 10^9$. Ocorreu redução significativa da motilidade a partir de 24h de resfriamento ($p < 0,001$), independente do diluidor (KA=17%; KG=11%). Após 48h a motilidade dos espermatozoides submetidos KA foi superior a KG ($p < 0,05$). No resfriamento em ausência de plasma seminal o KA demonstrou índices de motilidade superiores aos demais tratamentos ($p < 0,05$) nas 24, 48 e 72h (43%, 37% e 23%). A utilização de KG demonstrou os menores índices de motilidade ($p < 0,05$), a partir de 24h, na ausência ou não de plasma seminal (7% e 11% respectivamente). No presente trabalho não foram encontradas diferenças nas características seminais qualitativas e quantitativas em garanhões jovens e adultos. O resfriamento em Kenney amicacina na ausência de plasma seminal demonstrou melhores índices de motilidade, quando comparado com os outros tratamentos. Estudos posteriores são necessários para avaliar a viabilidade e integridade acrossomal dos espermatozoides resfriados em KA na ausência de plasma seminal.

EFEITO DE DOIS ANTIBIÓTICOS NA VIABILIDADE E FERTILIDADE DO SÊMEN EQUINO REFRIGERADO A 5°C

Macedo, L.P.¹; Papa, F.O.¹; Gomes, G.M.¹; Melo, C.M.¹; Oliveira, J.V.²; Dell'Aqua Jr., J.A.¹

¹Department of Animal Reproduction- Veterinary School- UNESP- Botucatu- SP- Brazil

²APTA- Colina- SP- Brazil

A refrigeração de sêmen equino oferece muitas vantagens, entre elas destaca-se a possibilidade de coletar e processar o ejaculado numa propriedade e transportá-lo a diferentes localidades para I.A. de éguas. Com isso, se elimina o custo e o estresse do transporte de éguas até o garanhão. A tecnologia de sêmen refrigerado baseia-se no fato de conseguir manter o potencial fertilizante do sêmen equino durante vários dias. O uso de antibióticos, associados ou não, tem sido estudado com o objetivo de verificar a ação inibitória de agentes bacterianos em amostras de sêmen refrigerado e congelado. Santos et al, (*Rev. Bras. Reprod. An.*, v.27, n.3, p334-336, 2003) compararam o uso de diferentes antibióticos na criopreservação de sêmen equino e verificaram que o sulfato de amicacina na dosagem de 0,2g/100mL não só inibiu o crescimento bacteriano in vitro, bem como apresentou melhores resultados de motilidade ao CASA e integridade da membrana plasmática. O presente trabalho comparou o efeito de dois antibióticos na preservação e fertilidade de sêmen refrigerado a 5°C. Três ejaculados de cinco garanhões de diferentes raças, foram colhidos e diluídos na concentração de 50×10^6 de espermatozoides por ml de extensor. O extensor utilizado foi à base de glicose e leite desnatado (*Kenney et al., Annual Conv. Am. Assoc. Equine Pract. Proceeding*, p.327-336, 1975) com dois diferentes antibióticos, sulfato de gentamicina e sulfato de amicacina, ambos na concentração de 0,2 mg/ml. As amostras foram analisadas inicialmente e a cada 24 h até o período de 96 h pelo CASA nos parâmetros: motilidade total e motilidade progressiva e número de espermatozoides rápidos). A integridade de membrana plasmática foi analisada por fluorescência utilizando-se a técnica de (*Harrison R.A., J. Reprod Fert*, v.88, p. 343-352, 1990). O teste de fertilidade foi realizado utilizando-se dois ciclos de 12 éguas, as quais foram induzidas com hCG e inseminadas 36 horas da indução, com 1×10^9 de espermatozoides refrigerados por 72 horas a 5°C. O diagnóstico de gestação foi realizado 15 dias após a ovulação por ultra-sonografia. A análise estatística foi utilizada de variância (ANOVA) no delineamento inteiramente ao acaso em esquema fatorial, seguida do método de Tukey quando necessário, o nível de significância utilizado foi de 5% e teste do Qui-Quadrado. As amostras refrigeradas por um período de 24 horas não apresentaram diferença significativa nos parâmetros analisados, entretanto quando esse tempo foi igual ou superior a 48 horas, o extensor com amicacina obteve valores de motilidade total, motilidade progressiva e número de espermatozoides rápidos significativamente maior quando comparado a aquele que utiliza gentamicina como antibiótico. Em relação a fertilidade das éguas inseminadas com sêmen refrigerado por 72 horas, o número de prenhes foi de (33,3%) com sulfato de gentamicina e (66,7%) com sulfato de amicacina ($p > 0,05$). Apesar da fertilidade superior numericamente com a amicacina, não houve diferença estatística.

AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DAS MEMBRANAS PLASMÁTICA, ACROSSOMAL E POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES E VOLUMES DE ESPERMATOZÓIDES CRIOPRESERVADOS EQUÍNO

Nascimento, J.^{1,2}; Celeghini, E.C.C.²; Raphael, C.F.²; Andrade, A.F.C.²; Arruda, R.P.²

¹Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – USP; ²Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal – VRA/FMVZ/USP; Pirassununga, SP, 13630-000, Brasil. arrudarp@usp.br

É sabido das vantagens da utilização do sêmen criopreservado na reprodução equina, mas também é de conhecimento que o entendimento desta biotecnologia ainda é carente. Dentre as necessidades, tem-se o conhecimento do comportamento das membranas espermáticas em diferentes concentrações e volumes de armazenamento deste sêmen. Assim, este experimento teve o intuito de avaliar, concomitantemente, a integridade das membranas plasmática e acrossomal e o potencial de membrana mitocondrial de espermatozóides equinos criopreservados nas concentrações de 100, 200, e 400x10⁶sptz/mL e nos volumes 0,50 e 0,25mL. Foram utilizados quatro garanhões de idades entre 8 e 17 anos, sendo oito colheitas de cada animal, através de vagina artificial. Após a colheita, o sêmen foi diluído em extensor à base de leite desnatado (1:1), centrifugado 500xg por 10 minutos, o sobrenadante retirado, e o *pellet* ressuscitado em diluidor Botu-Crio[®] (Biotech-Botucatu-Ltda/ME, Brasil) nas concentrações de 100 (C100), 200 (C200) e 400x10⁶sptz./mL (C400). Em seguida, envasado em palhetas de 0,50 e 0,25mL. Para criopreservação do sêmen utilizou-se aparelho automatizado (TK3000[®], TK Tecnologia em Congelação Ltda, Uberaba, Brasil), com curvas de resfriamento -0,25°C/min. e de congelamento -15°C/min. até -80°C e -10°C/min., até atingir -120°C, quando as palhetas foram mergulhadas em N₂ líquido (-196 °C), raqueadas e armazenadas em botijões criogênicos. Foram descongeladas duas palhetas de cada tratamento em banho-maria (37°C por 30s); em seguida, diluídas em TALP *sperm* à concentração de 25x10⁶sptz/mL. Logo após, uma amostra de 150µL desta solução foi adicionada de 3µL de PI, 6µL de JC-1 e 80µL de FITC-PSA e incubada por 8 minutos (25°C). A leitura de cada amostra foi realizada em câmara úmida sob microscopia de epifluorescência, sendo contadas 200 células e determinados os percentuais de espermatozóides com membranas plasmáticas intactas (MPI), acrossomais intactas (MAI) e mitocondriais de alto potencial (PMA) e membranas plasmática e acrossomal intactas e com alto potencial de membrana mitocondrial (PIAIA). O delineamento utilizado foi blocos generalizados (fatorial 2X3) e a unidade experimental 1/6 do ejaculado. Foi utilizada análise de variância (ANOVA) (p<0,05) e teste de médias SNK (p<0,05), acompanhadas de desvio padrão, pelo método SAS[®] (SAS Institute, Cary, USA). Não houve efeito da interação entre volume da palheta e concentração espermática para as características estudadas. A percentagem de células PIAIA não variou estatisticamente entre C100 (38,4±14,98%), C200 (38,4±9,58%) e C400 (35,2±10,96%), e entre os volumes 0,50 e 0,25mL (37,8±12,15% e 36,9±12,06%, respectivamente). Houve diferença estatística na percentagem total de MPI entre C100 (43,5±13,08%), C200 (40,1±9,44%) e C400 (34,9±12,43%) e entre C400 e demais concentrações em PMA (46,6±11,0%, 41,3±16,4% e 36,5±12,98%, respectivamente). Já as concentrações não diferiram estatisticamente para MAI (81,03±7,09%; 83,1±17,0% e 78,0±12,97%), e também entre palhetas de 0,50 e 0,25mL para MPI (40,65±11,1% e 38,55±13,08%), MAI (82,4±7,55% e 79,3±16,3%) e PMA (41,2±13,09% e 38,06±14,15%). Conclui-se que C100, C200 e C400 mantém igualmente a integridade das células PIAIA e de MAI; que C100 e C200 preservam maior percentagem de PMA e que C100, C200 e C400 conservam, ordenadamente, maior percentagem de MPI. **Agradecimentos:** à FAPESP, processo n. 01/13940-4 e à empresa Biotech-Botucatu-Ltda/ME que gentilmente nos cedeu o diluidor Botu-Crio[®].

EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA E VOLUME DA PALHETA NOS CARACTERES DE MOVIMENTO DE ESPERMATOZÓIDES CRIOPRESEVADOS EQUÍNO AVALIADOS PELO SISTEMA COMPUTADORIZADO - CASA

Nascimento, J.^{1,2}; Celeghini, E.C.C.²; Andrade, A.F.C.²; Raphael, C.F.²; Arruda, R.P.²

¹Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – USP; ²Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal – VRA/FMVZ/USP; Pirassununga, SP, 13630-000, Brasil. arrudarp@usp.br

O uso do sêmen criopreservado na espécie equina vem aumentando em importância e em número de ocorrência. Todavia ainda não se tem concordância quanto à dose e concentração espermáticas ideais para obter-se bons resultados de fertilidade. Vários protocolos de criopreservação são desenvolvidos na tentativa de alcançar melhores resultados, como a combinação de diferentes volumes de armazenamento e concentração espermática. Este experimento objetivou comparar dois volumes de palhetas (0,50 e 0,25mL) e três concentrações espermáticas (100, 200 e 400 x 10⁶sptz/mL), com o uso do sistema computadorizado da motilidade espermática (CASA). Foram realizadas oito colheitas de sêmen de quatro garanhões de idades entre 8 e 17 anos, através de vagina artificial. Após a colheita, o sêmen foi diluído em extensor à base de leite desnatado (1:1), centrifugado a 500xg por 10 minutos, o sobrenadante retirado, e o *pellet* ressuspendido em diluidor Botu-Crio[®] (Biotech-Botucatu-Ltda/ME, Brasil) nas concentrações de 100 (C100), 200 (C200) e 400x10⁶sptz/mL (C400). Em seguida, envasado em palhetas de 0,50 e 0,25mL. Para criopreservação do sêmen utilizou-se aparelho automatizado (TK3000[®], TK Tecnologia em Congelação Ltda, Uberaba, Brasil), com curvas de resfriamento -0,25°C/min. e de congelação -15°C/min. até -80°C e -10°C/min., até atingir -120°C, quando as palhetas foram mergulhadas em nitrogênio líquido (-196°C), raqueadas e armazenadas em botijões criogênicos. Foram descongeladas duas palhetas de cada tratamento em banho-maria (37°C/30s), em seguida, diluídas em TALP *sperm* à concentração de 25x10⁶sptz/mL para a avaliação no CASA. As características analisadas foram: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MPRO, %), velocidade progressiva (VSL, µm/s), velocidade curvilínea (VCL, µm/s), deslocamento lateral de cabeça (ALH, µm) e frequência de batimento flagelar (BCF, Hz). O delineamento utilizado foi blocos generalizados (fatorial 2x3) e a unidade experimental 1/6 do ejaculado. Para a estatística, utilizou-se análise de variância (ANOVA) (P<0,05) e teste de médias SNK (P<0,05), acompanhadas de desvio padrão, pelo método SAS[®] (SAS Institute, Cary, USA). Não houve interação entre volume da palheta e concentração espermática para todas as características estudadas. As MT e MPRO apresentaram diferença estatística entre C100, C200 e C400 (47,85±10,76% e 16,63±6,45%; 38,44±12,2% e 10,92±6,14%; 31,40±12,7% e 7,45±5,65%, respectivamente). As palhetas de 0,50 e 0,25mL resultaram em semelhantes MT e MPRO (39,92±14,1% e 11,3±7,55% e 38,41±13,2% e 11,97±6,71%, respectivamente). ALH e BCF também apresentaram diferenças estatísticas entre C100, C200 e C400 (5,13±0,4µm e 38,55±1,52µm; 4,56±0,54µm e 35,4±1,98µm e 4,06±0,56µm e 33,24±2,02µm, respectivamente); no entanto, não houve diferença estatística entre as palhetas de 0,50 e 0,25mL (4,5±0,64µm e 35,8±2,8µm e 4,6±0,69µm e 35,5±2,9µm, respectivamente). VSL e VCL seguiram a diferença estatística entre C100, C200 e C400 (77,77±6,1µm/s e 154,77±12,2µm/s; 65,5±8,4µm/s e 129,1±16,4µm/s; 56,68±8,9µm/s e 110,37±17,60 µm/s, respectivamente) e igualdade nos volumes 0,50 e 0,25mL para VSL (65,9 ±11,98µm/s e 67,1±11,34µm/s, respectivamente) e diferença estatística para VCL (128,5±24,8µm/s e 133,77±22,9µm/s, respectivamente). Assim, o melhor método de congelação, neste experimento, foi em C100, seguido por C200 e último, C400, para todas as variáveis estudadas, tanto em palhetas de 0,50 quanto em 0,25mL, com exceção para VCL, que apresentou melhor resultado em armazenamento de 0,25mL. **Agradecimentos:** à FAPESP, processo n. 01/13940-4 e à empresa Biotech-Botucatu-Ltda/ME que gentilmente nos cedeu o diluidor Botu-Crio[®].

FERTILIDADE DE SÊMEN CONGELADO EQUINO APÓS 24H DE REFRIGERAÇÃO

Melo, C.M.¹; Zahn, F.S.¹; Martin, I.¹; Trinquê, C.L.A.²; Alberti, K.¹; Orlandi, C.¹; Siqueira-Filho, E.R.¹; Dell'Aqua Jr., J.A.¹; Alvarenga, M.A.¹; Papa, F.O.¹

¹Depto de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária- FMVZ- Unesp, Botucatu; ²Haras e Centro Hípico Agromen; papa@fmvz.unesp.br

Vários fatores limitantes à técnica de congelamento de sêmen na espécie equina podem ser relacionados ao custo dos equipamentos, preparação de diluentes para congelamento, bem como deslocamentos de todo esse material até as propriedades rurais, que nem sempre preenchem os requisitos básicos necessários para proceder a criopreservação. Para minimizar essas dificuldades a colheita do sêmen seria realizada nos estabelecimentos rurais, diluição, pré-resfriamento em *containers* adequados e o seu envio para laboratórios especializados para criopreservação do sêmen. O trabalho objetivou a colheita do sêmen de garanhões nos haras, diluição e transporte destas amostras em Equitainer[®] para os centros especializados onde foram manipulados e submetidos ao processo de congelamento. Foi utilizado 01 ejaculado de 13 garanhões, com idades entre 4 e 18 anos, de diferentes raças pertencentes à Área de Reprodução Animal FMVZ-UNESP/Botucatu e Centro Hípico Agromen, Orlândia SP. Após a colheita os ejaculados foram avaliados pelo CASA e divididos em duas alíquotas: uma submetida ao processo de congelamento (Papa *et al*, Rev Bras Reprod Anim, v.26, n.3, p.184-187, 2002), utilizando o meio diluidor Botu-Crio[®] e outra diluída na concentração de 50×10^6 espermatozoides/mL (Botu-Semen[®]) e armazenadas no Equitainer[®] durante 24h. As amostras refrigeradas foram centrifugadas a $600 \times g/10'$ e ressuspensas com Botu-Crio[®] à 20°C e submetidas ao processo de congelamento. As amostras descongeladas foram analisadas pelo CASA e a integridade de membrana plasmática (Harrison R.A., J. Reprod Fert, v.88, p. 343-352, 1990). O teste de fertilidade comparou amostras criopreservadas pelo método convencional (controle) e amostras refrigeradas por 24h e então congeladas (tratamento). Para o teste de fertilidade foram utilizados dois garanhões. Foram realizadas 43 inseminações em 22 éguas, monitoradas diariamente para controle folicular por meio da ultra-sonografia. Após constatar a presença de um folículo de aproximadamente 35mm foi administrado 10mg EPE (extrato de pituitária equina) intravenoso. Foram realizadas inseminações com 350×10^6 sptz viáveis pré e pós-ovulação, com o auxílio de uma pipeta flexível 75cm (MiniTüb[®]) no ápice do corno uterino. O diagnóstico de gestação foi avaliado pela ultra-sonografia com 15 dias pós-ovulação. Para análise dos resultados utilizou-se ANOVA (GLM procedure of SAS, SAS, Institute, Inc., Cary, NC, USA). Os resultados do presente experimento demonstram que não houve diferenças entre as metodologias empregadas nos parâmetros espermáticos, bem como nos índices de fertilidade com os dois cavalos utilizados. Foram observadas diferenças nas taxas fertilidade entre os diferentes garanhões, ou seja, foi garanhão A 72,7% e 82,3% e garanhão B 40,0% e 50,0% para os grupos controle & tratamento, respectivamente. Com base nos resultados, conclui-se que técnica de refrigeração durante 24h previamente à criopreservação, manteve as características espermáticas, bem como os índices de fertilidade, criando-se uma nova metodologia de congelamento de sêmen equino.

Agradecimentos:

Suporte Financeiro: FAPESP

Apoio Purina[®]

EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CRIOPROTETORES NA CONGELAÇÃO DE SÊMEN EQUINO

Melo, N.S.S.¹; Pimentel, C.M.¹; Silveira, L.L.^{1,2}; Mariante, A.S.²

¹ Universidade de Brasília-UnB/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária-FAV, 70910-900 Brasília-DF, Brasil; ² Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica, 70770-900 Brasília-DF, Brasil. soternatalie@yahoo.com.br

A criopreservação de espermatozoides vem sendo utilizada desde a década de 50, no entanto poucos experimentos têm sido realizados com a espécie equina. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito dos crioprotetores glicerol (G) e dimetilformamida (DF), utilizados em diferentes concentrações, na congelação do sêmen equino, através de testes de integridade da membrana e de motilidade. Foram utilizados cinco garanhões da raça Mangalarga Marchador, com pesos entre 400 e 550kg, e idades de 4 a 23 anos. Os crioprotetores foram utilizados nas seguintes concentrações: G 4% (T1), G 3% + DF 1% (T2), G 2% + DF 2% (T3), G 1% + DF 3% (T4) e DF 4% (T5). No processo de resfriamento e congelação, foi utilizada a máquina de congelação TK 3000[®]. As amostras foram descongeladas em banho-maria a 40°C/30 seg., sendo analisadas quanto à motilidade óptica, vigor, teste hiposmótico e teste com sondas fluorescentes. Os resultados demonstram que houve uma diferença estatística ($p < 0,001$) entre os garanhões e tratamento em relação ao teste hiposmótico (16,77%), fluorescência (49,60%) e motilidade (34,06%). Houve também efeito altamente significativo na interação garanhão*tratamento, na integridade da membrana, medida tanto pelo teste hiposmótico (12,56%) quanto pelas sondas fluorescentes (2,85%). A dimetilformamida mostrou-se como uma boa opção de crioprotetor para o congelamento de sêmen equino, uma vez que houve uma melhora na qualidade do sêmen, à medida em que se aumentou sua percentagem no meio de congelação e, conseqüentemente, se reduziu o percentual do Glicerol. Este pode ser, em parte, devido à conhecida toxicidade deste último.

INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CRIOPROTETORES E ASSOCIAÇÕES NA CONGELABILIDADE DE SÊMEN EQUINO

Dores, C.B.¹; Papa, F.O.¹; Blanes, M.S.¹; Melo, C.M.¹; Dell'Aqua Jr., J.A.¹;
Alberti, K.¹; Crocci, A.J.²

¹ Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology FMVZ- Unesp, Botucatu

²Department of Statistic - IB UNESP, Botucatu papa@fmvz.unesp.br

Apesar de constantes modificações nas metodologias de congelação de sêmen eqüino, os resultados de fertilidade permanecem em torno de 50% há vários anos. O glicerol tem sido utilizado desde 1949 como substância crioprotetora, mas devido a sua toxicidade estudos recentes passaram a usar crioprotetores alternativos derivados de amidas que têm mostrado serem menos tóxicos e mais eficientes na congelação de sêmen eqüino, principalmente em animais considerados "poor freezers". O objetivo do presente trabalho foi comparar diferentes diluentes de congelação de sêmen eqüino: Botu-Crio®(Biotech-Botucatu-Ltda/ME, Brasil) e FR4® (Palmer E., CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, AI, 10, Champaign, IL. *Proceedings* Champaign. p. 769, 1984), acrescidos de diversos crioprotetores a base de amidas e associações com o glicerol. Foram colhidos 3 ejaculados de 5 garanhões de diferentes raças pertencentes à Área de Reprodução Animal, do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, da FMVZ – UNESP- Botucatu- SP. A análise computadorizada da motilidade (CASA) e integridade de membrana (Harrison R.A., *J. Reprod Fert*, v.88, p. 343-352, 1990), foram avaliados tanto previamente quanto posteriormente ao processo de criopreservação. O sêmen foi diluído em meio Botu-Semen® (Biotech-Botucatu-Ltda/ME, Brasil) e posteriormente centrifugado a 600xg/10 minutos, os "pellets" foram ressuspensos com o diluente Botu-Crio® (Biotech-Botucatu-Ltda/ME, Brasil) contendo diferentes crioprotetores e suas associações: metilformamida 4% (M1); metilformamida 3% + glicerol 1% (M2); glicerol 3% + metilformamida 1% (M3); dimetilformamida 2%+ metilformamida 2% (M4); e FR4 (INRA 82, Palmer, 1984) 2,5% metilformamida + 2,5% dimetilformamida (M5) e envasadas em palhetas de 0,5 ml contendo 200x10⁶ spz/mL. As palhetas foram mantidas em refrigeração a 5°C por 20 minutos (MiniTüb®), posteriormente 20 minutos no vapor N₂ a uma altura de 6 centímetros e imersas. As amostras foram descongeladas em banho-maria a 46°C/20". Para análise estatística foi utilizada a metodologia de Análise de Variância e o teste Tukey. Com relação aos diferentes diluentes e crioprotetores foram observados os seguintes resultados de Motilidade total, Motilidade progressiva e Integridade de membrana plasmática, M1 (47,2^{ab} / 21,1^a / 48,1^{ab}); M2 (48,7^a / 21,4^a / 53,2^a); M3 (40,9^{ab} / 18,9^a / 48,5^{ab}); M4 (38,8^b / 18,1^a / 45,8^b); M5 (43,2^{ab} / 18,4^a / 42,8^b), respectivamente. Os resultados obtidos neste experimento demonstram que os diluidores M1, M2 e M3 apresentaram resultados de congelabilidade significativamente superiores (p<0,05) aos tratamentos M4 e M5. A associação MF 3% + Glicerol 1% apresentou-se como a mais eficiente na manutenção dos parâmetros espermáticos. Com base nos resultados obtidos, fica evidente que as associações entre os crioprotetores promovem uma proteção adequada aos espermatozoides, possibilitando várias combinações de diluentes e crioprotetores com o objetivo de aumentar o índice de congelabilidade entre diferentes garanhões.

Agradecimentos: Suporte financeiro: FAPESP

Purina

INFLUÊNCIA DO NÚMERO DE ESPERMATOZÓIDES E TEMPO DE ESTABILIZAÇÃO NA CONGELAÇÃO DE SÊMEN EQUINO UTILIZANDO-SE DILUENTE BOTUCRIO®

Blanes, M.S.¹; Papa, F.O.¹; Dores, C.B.¹; Melo, C.M.¹; Crocci, A.J.²

¹ Depto de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária- FMVZ- Unesp, Botucatu ²Departamento de Bioestatística IB UNESP papa@fmvz.unesp.br

Em eqüinos, apesar de diversas pesquisas realizadas, os resultados com sêmen congelado não são satisfatórios. Um dos fatores que interferem no processo de criopreservação, entre outros, é a quantidade de espermatozoides nas palhetas. O presente estudo tem por objetivo avaliar a influência da concentração espermática no processo de criopreservação, bem como verificar o melhor tempo de estabilização em geladeira (20 ou 60 minutos) a 5°C antes da imersão em vapor de nitrogênio, utilizando Botucrio® como meio de congelamento. Foram colhidos 3 ejaculados de cada um dos 5 garanhões, de diferentes raças, pertencentes à Área de Reprodução Animal do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, da FMVZ – UNESP- Botucatu – SP. Os ejaculados foram avaliados quanto o padrão de motilidade espermática através de análise computadorizada (CASA) e a integridade de membrana espermática por microscopia de fluorescência (Harrison R.A., *J. Reprod Fert*, v.88, p. 343-352, 1990). Após a mensuração da concentração de cada ejaculado, estes eram diluídos com meio Botu-Semen® e imediatamente centrifugados. Os *pellets* foram ressuspensos com diluidor Botucrio® em palhetas de 0,5mL nas concentrações de 200x10⁶ (C1), 150x10⁶ (C2), 100x10⁶ (C3) e 50x10⁶ (C4) espermatozoides viáveis antes da criopreservação. Parte das palhetas de cada concentração foi levada à refrigeração 5°C por um período de 20 minutos e outra à refrigeração de 60 minutos, antes da estabilização e imersão em N₂. As amostras foram descongeladas em banho-maria à 46°/20” e submetidas a avaliação de motilidade por CASA e integridade de membrana espermática por microscopia de epi-fluorescência. Para análise estatística foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA) de um ensaio em Blocos (sendo o bloco o animal) com os tratamentos no esquema fatorial, sendo: Fator I – Concentração (4 concentrações) e Fator II – Tempo (2 tempos). Entre as concentrações avaliadas não houve diferença estatística significativa (p>0,05) nos parâmetros espermáticos durante os momentos avaliados. Os parâmetros espermáticos obtidos nas concentrações: C1, C2, C3 e C4 foram respectivamente para motilidade total 57,07; 61,20; 59,20 e 57,33 %, motilidade progressiva 22,0; 23,3; 22,3 e 22,8% e integridade de membrana: 54,1; 56,1; 57,5 e 57,6%. Foi observada, somente no parâmetro motilidade total, diferença significativa entre os tempos de estabilização à 5°C (p<0,05) sendo estes para os tempos 20 e 60 minutos, respectivamente: motilidade total (52,80^a e 43,55^b), motilidade progressiva (22,50^a e 17,10^a) e integridade de membrana (50,60^a e 51,5^a). O presente estudo constatou que utilização de diferentes concentrações espermáticas em palhetas de 0,5mL não influenciaram os parâmetros espermáticos *in vitro*. Entretanto, o período de 20 minutos de estabilização em geladeira demonstrou-se favorável em relação ao tempo de 60 minutos quando da utilização do diluente Botucrio®.

Palavras-chave: garanhão, sêmen congelado, crioprotetor.

Agradecimentos: Purina

Apoio: FAPESP

EFICIÊNCIA DA UTILIZAÇÃO DE SÊMEN CONGELADO EQÜINO EM PROGRAMA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL E TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES

Granito, A.L.^{1,2}; Nascimento, J.²; Arruda, R.P.²

¹Haras Vila dos Pinheiros Ltda, Indaiatuba, SP, Brasil; ²Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal – VRA/FMVZ/USP; Pirassununga, SP, 13630-000, Brasil. vetgranito@hotmail.com.

A utilização do sêmen eqüino criopreservado em programas de inseminação artificial e transferência de embriões traz inúmeras vantagens à reprodução da espécie, dentre elas o melhor aproveitamento dos reprodutores, tornando possível acelerar o aprimoramento das raças. Este trabalho teve como objetivos: 1) comparar os resultados entre taxa de recuperação embrionária e taxa de prenhez em éguas inseminadas artificialmente com sêmen congelado e 2) comparar os resultados da taxa prenhez e perda embrionária entre éguas que receberam embrião ou que foram inseminadas artificialmente com sêmen congelado. O experimento foi realizado durante a estação de monta de 2004/05 no Haras Vila dos Pinheiros Ltda, localizado no Município de Indaiatuba, S.P., utilizando sêmen congelado de um garanhão da raça Puro Sangue Árabe (PSA). Vinte e duas fêmeas PSA foram utilizadas, sendo oito destinadas à coleta e transferência de embriões (G1) e as quatorze éguas restantes foram inseminadas artificialmente, visando à manutenção da gestação (G2). As éguas de ambos os grupos foram submetidas a rufiação a cada 48 horas; aquelas que apresentaram cio foram avaliadas por ultra-sonografia quanto ao edema uterino e desenvolvimento folicular. As éguas que apresentavam edema uterino e folículos ovarianos com diâmetro =35mm foram tratadas com 2500UI de hCG (Vetecor®, Calier S.A., Barcelona, Espanha), por via i.v.. À partir de então, as avaliações foram realizadas a cada 12 horas nas primeiras 24 horas e, em seguida, a cada 6 horas nas próximas 24 horas. Imediatamente após a detecção da ovulação, foi realizada I.A. na junção útero-tubárica ipsilateral à ovulação com sêmen congelado, armazenado em macrotubo de 2 mL, o qual foi descongelado em banho-maria a 40°C, por um minuto (número de espermatozoides móveis pós-descongelamento de aproximadamente 300x10⁶). Em G1, as coletas de embriões foram realizadas 08 dias após a ovulação, sendo os embriões transferidos para receptoras que ovularam 2 dias após a doadora. O diagnóstico de gestação das éguas que receberam embriões oriundos do G1 e das que foram inseminadas artificialmente (G2) foi realizado aos 14 e 60 dias após ovulação, por ultra-sonografia. Foram analisados os dados resultantes do primeiro ciclo estral, pelo teste de Qui Quadrado (χ^2), contido no programa SAS® (SAS Institute, Cary, USA). Não houve diferença estatística (P>0,05) entre a taxa de recuperação embrionária (G1) e taxa de prenhez aos 14 dias (G2), cujos resultados foram 62,5% (5/8) e 71,4% (10/14), respectivamente. Os resultados da taxa de prenhez aos 14 e 60 dias de éguas que receberam embrião e das éguas que foram inseminadas e mantiveram a gestação (G2) foram 80,0% (4/5) e 40,0% (2/5); 71,4% (10/14) e 50,0% (7/14), resultando na perda embrionária de 50,0% e 30,0% respectivamente, não havendo diferenças estatísticas entre os tratamentos (P>0,05). Os resultados indicam que o sêmen congelado pode ser utilizado em programas de transferência de embriões eqüino, no entanto, maior atenção deve ser dada aos fatores que podem levar a perda embrionária.

EFEITO DO PESO CORPORAL SOBRE PARÂMETROS DE DESENVOLVIMENTO SEXUAL EM CORDEIROS SANTA INÊS

Siqueira Filho, E.R.¹; Alberti, K.¹; Bicudo, S.D.¹

¹Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária- FMVZ/UNESP- Botucatu-SP, 18618-000, Brasil, ersiqueirafilho@hotmail.com

O aumento expressivo da criação de ovinos no estado de São Paulo, sua tecnificação e busca pela maior produtividade, exige um aumento na fertilidade e na prolificidade dos rebanhos. Um dos fatores determinantes para esse acréscimo nas criações é a seleção de animais mais precoces e prolíficos, encurtando o intervalo entre gerações favorecendo o melhoramento genético do rebanho. O tamanho testicular estimado pela circunferência escrotal (CE), é um excelente indicativo de potencialidade reprodutiva de carneiros (Moraes e Oliveira, Rev. Bras. Reprod. Anim. v.16, p.55-62, 1992) e é claramente associado ao peso corporal (Salgueiro e Nunes, Rev. Bras. Reprod. Anim. v.23, p.231-232, 1999). A excessiva deposição de gordura escrotal (GE) interfere negativamente nos mecanismos termorregulatórios, essenciais para a espermatogênese, relacionado-se à dieta altamente energética (Fourie et al., Small Ruminant Research v.54, p.53-59, 2004) e conseqüente aumento de PC. As medidas testiculares peso (PT) e volume (VT) estão associadas com a produção espermática em carneiros (Souza e Costa, *Anais Simpósio em Ciências Agrárias*, Teresina-PI, p.80-86. 1992). Este estudo objetivou correlacionar o peso corporal a aos indicadores de desenvolvimento sexual, CE, VT e PT, e deposição de gordura escrotal, auxiliando aos ovinocultores selecionar precocemente os animais que serão destinados à reprodução. O experimento avaliou 13 cordeiros machos da raça Santa Inês nascidos em junho de 2004, confinados, durante 40 dias a partir de 18 de agosto de 2004. Os pesos vivos dos animais foram aferidos por balança eletrônica, em quilogramas, a mensuração da CE foi realizada por fita métrica metálica, em centímetros com o animal em estação. Os escrotos e testículos foram coletados após o abate dos animais, em frigorífico. Os testículos foram pesados em balança analítica, após remoção dos epidídimos, e posteriormente calculou-se o volume pelo deslocamento equivalente de líquido. Os escrotos foram armazenados em congelador e descongelados para a remoção da gordura, que foi pesada em gramas por balança analítica. As estimativas de correlação foram determinadas pelo método de correlação de Pearson ($P < 0,01$). As médias de PC, CE, VT, PT e GE obtidas foram: 36,1 kg, 25,2 cm, 154,2 mL, 140,6g e 27,1g, respectivamente. As correlações encontradas de PC com CE ($r=0,82$), VT ($r=0,68$) e PT ($r=0,66$), assim como as de CE com VT ($r=0,72$), e com PT ($r=0,73$) e a de VT com PT ($r=0,99$) apresentaram-se altas. Mostrando que desde jovem a análise desses parâmetros podem ser utilizados como indicadores de desenvolvimento sexual. As correlações da variável GE com PV ($r=0,23$) e CE ($r=0,09$) apresentaram se baixas, indicando que na faixa etária avaliada a deposição de gordura escrotal é insignificante no desenvolvimento dos órgãos sexuais dos cordeiros.

**PROTEÍNAS E COLESTEROL DO PLASMA SEMINAL RELACIONADOS COM
DIFERENTES GRAUS DE CONGELABILIDADE DO SÊMEN DE
CARNEIROS SANTA INÊS**

Câmara, D.R.^{1,2}; Simplício, K.M.M.G.¹; Porto, A.L.F.^{1,3}; Padilha, R.T.²; Cavalcanti, M.T.H.³; Moreira, K.A.³; Guerra, M.M.P.¹

¹PPGCV/UFRPE. Rua D. Manoel de Medeiros s/n. Dois Irmãos. Recife-PE. Brasil. ²FMV/
CESMAC. ³LIKA/UFPE. diogocamara1979@hotmail.com

A descoberta de proteínas do plasma seminal capazes de modular a quantidade de colesterol da membrana espermática pode ter relação com a congelabilidade do sêmen. Objetivando identificar o perfil de proteínas e colesterol do plasma seminal de ovinos da raça Santa Inês com diferentes níveis de congelabilidade, usou-se amostras de sêmen de nove carneiros, provenientes de rebanho localizado no nordeste do Brasil (9°19'06" Sul; 35°33'06" Leste) e mantidos em condições similares de manejo, colhidas com auxílio de vagina artificial e diluídas em Fiser. Após avaliação pós-descongelação, os animais foram divididos em três grupos, denominados de alta (A, 80% dos ejaculados aprovados), média (M, 60% dos ejaculados aprovados) e baixa (B, 60% dos ejaculados aprovados) congelabilidade. Foram consideradas aprovadas as amostras com motilidade progressiva mínima de 30% pós-descongelação, uma semana após criopreservação. Em seguida, doze amostras de sêmen de cada carneiro foram colhidas usando vagina artificial e centrifugadas a 950 x g/30 min, a temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e enviado sob refrigeração ao laboratório, ficando armazenado a -20°C, até a realização das análises de proteína total (PT), colesterol total (CT) e colesterol de alta densidade (HDL), utilizando kits comerciais (Labtest). Para SDS-PAGE, utilizando gel de acrilamida a 10%, o plasma seminal foi recentrifugado (6000 x g/60 min a 4°C) e recongelado a -20 °C até análise. Imediatamente antes da eletroforese, as amostras foram diluídas em solução tampão e desnaturadas. Uso-se albumina sérica bovina, ovoalbumina, anidrase carbônica, tripsinogênio, inibidor de tripsina e α -lactoalbumina como padrão de peso molecular. Após eletroforese, os géis foram corados *overnight* em 0,25% Comassie Azul Brilhante, 45% metanol e 10% de ácido acético em água destilada. Os géis foram descorados em 45% metanol, 10% de ácido acético em água destilada. O peso molecular das bandas protéicas foi determinado em curva logarítmica, baseado na migração do padrão de peso molecular. Analisou-se os dados bioquímicos do plasma seminal e perfil do sêmen descongelado usando ANOVA e avaliou-se a relação entre congelabilidade do sêmen e eletroforese por análise descritiva. Não existiu diferença para PT, entretanto os carneiros dos grupos A e M apresentaram menor concentração de CT e HDL no plasma seminal do que carneiros do grupo B ($P < 0,05$). O perfil eletroforético identificou 18 bandas em 2D-SDS, com peso molecular de 16,4 a 78,8 kDa. Todavia, uma das bandas (24,3 kDa) estava ausente em 83,33% das amostras com baixa congelabilidade, entretanto foi detectada em 66,67% das amostras com alta e média congelabilidade. Conclui-se que a proteína de 24,3 kDa detectada no plasma seminal de carneiros Santa Inês pode exercer efeito protetor na membrana diminuindo o efluxo de colesterol das células espermáticas durante o processo de criopreservação.

INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL INTRA-UTERINA EM OVINOS POR VIA TRANS-CERVICAL

Silva, J.C.B.¹; Oliveira, R.¹; Schneider, C.¹; Traldi, A.S.²

¹Embryolife, Ouro Fino- MG, 37570 000, Brasil. ² Departamento de Reprodução Animal – FMVZ/ USP, Pirassununga, SP, 13630 000, Brasil. juliovet@overnet.com.br

A sinuosidade da cervix dificulta a inseminação via cervical nos ovinos, fato que, somado aos baixos resultados de fertilidade após descongelação do sêmen dessa espécie, contra-indica seu uso na inseminação transcervical. O desenvolvimento de uma técnica de inseminação intra-uterina através de tração e exteriorização do colo, com transposição dos anéis, poderia viabilizar o uso de sêmen congelado. Para validação da técnica, 81 ovelhas da raça Santa Inês foram inseminadas com diferentes reprodutores da raça Dorper. Os animais tiveram o estro sincronizado através de pessário vaginal com 60 mG de Medroxiprogesterona, retirado após 9 dias, e 400 UI de eCG, administrada no 7º dia após o início do tratamento. As inseminações foram realizadas 55 horas após a retirada do pessário com sêmen fresco diluído em leite desnatado UHT e envasado em palhetas de 0,25 mL, sendo as ovelhas mantidas em estação. Com o auxílio de um espécúlo humano médio e uma fonte de luz, a cérvix foi localizada e tracionada através de uma pinça de Posy, que permite sua exteriorização e manipulação durante a introdução do aplicador metálico. Este apresenta ponta romba de 2mm de diâmetro e 7 mm de comprimento, que favorece a transposição dos anéis cervicais, sendo a inseminação efetuada no corpo ou colo do útero, evitando lacerações. O diagnóstico de gestação efetuado através de ultra-sonografia transretal, evidenciou um total de 48 fêmeas gestantes (59,25% - 48/81), das quais 79,2% (38/48) oriundas de inseminações intra-uterinas (IU), 12,5% (6/48) cervical profunda (ICP) e 8,3% (4/48) cervical média (ICM). A eficácia do método foi de 70,4% de inseminações IU, 14,8% ICP, 13,6% ICM e apenas 1,2% cervical superficial. Os resultados demonstraram que a tração cervical, somada às peculiaridades do aplicador utilizado, facilitam a deposição intra-uterina do sêmen, o que poderá ser um bom indicativo para o uso de sêmen ovino congelado na raça Santa Inês.

USO DO PLASMA SEMINAL NO DESCONGELAMENTO DO SÊMEN OVINO PARA INSEMINAÇÃO TRANSCERVICAL EM OVELHAS COM ESTRO SINCRONIZADO

Silva, T.A.S.N.¹; Neves, J.P.¹; Bragança, J.M.²; Gonçalves, P.B.D.²; Rumpf, R.³.

(1) Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UNB – Brasília – DF (thiagoasns@unb.br)

(2) Biotecnologia e Reprodução Animal – BioRep – UFSM (3) Embrapa Recursos Genéticos Biotecnologia – Brasília – DF

Este trabalho teve por objetivo avaliar a ação da adição do plasma seminal no descongelamento do sêmen ovino criopreservado em pellets e aplicado pela via transcervical em ovelhas com estro sincronizado. Utilizou-se 161 ovelhas da raça Ideal ginecologicamente sadias e com condição corporal acima de 3 (1-5) provenientes do município de São Gabriel – RS, no mês de fevereiro de 2005. Para sincronização do estro utilizou-se pessários vaginais impregnados com 50mg MAP por 12 dias. Na retirada dos mesmos foram aplicados 250UI de eCG (Novormon) IM. O sêmen foi obtido de cinco carneiros da raça Ideal, criopreservado em pellets de 130 µl com meio Tris/ácido cítrico/glicose/gema de ovo/glicerol na proporção (1:2) com concentração mínima por dose de 200×10^6 . Uma amostra de cada partida foi submetida ao TTR (37°C/6 horas) com e sem plasma seminal ovino e avaliação da integridade do acrossoma pela coloração Tryplan blue/Giemsa. Somente foram aprovadas partidas que apresentaram ao final do TTR 25% de motilidade e 20% de células integras vivas após as 6 horas de incubação com e sem plasma seminal. O plasma seminal foi obtido de dois carneiros vasectomizados, após a coleta foi centrifugado e preservado a -20°C. O plasma seminal era descongelado junto ao pellet em banho Maria a 37 °C, na proporção de (1:1). As IA foram realizadas em tempo fixo a partir das 50 horas após a retirada dos pessários vaginais, utilizando-se vaginoscópio com fonte de luz e aplicador de sêmen para palhetas de 0,25 ml. Conforme o grau de penetração do aplicador de sêmen no canal cervical das ovelhas considerou-se três graus de penetração: grau 1: superficial; grau 2: intermediário; grau 3: profundo. Como grupo controle 61 ovelhas foram inseminadas com sêmen fresco/diluído com tris/ácido cítrico/glicose. Das 100 restantes, metade foi inseminada com sêmen congelado/descongelado sem plasma seminal e a outra metade com sêmen congelado/descongelado com plasma seminal. Após 45 dias da IA, foi realizado o diagnóstico de prenhez por ultra-sonografia trans-abdominal. As ovelhas inseminadas apresentaram os percentuais de prenhez de 60,0% (50/30), 74,0% (50/37) e 67,2% (61/41), respectivamente para sêmen congelado/descongelado, sem plasma seminal, com plasma seminal e fresco/diluído. Quanto a penetração cervical obteve-se os percentuais de 52,3%, 66,6% e 83,3% , respectivamente, para os graus 1, 2 e 3. Os índices de prenhez não diferiram entre os tratamentos nos graus 1 e 2. No entanto, as percentagens de prenhez diagnosticadas nas ovelhas inseminadas com sêmen fresco (95,6%) e com sêmen congelado com plasma (94,1%) foram superiores a obtida com sêmen congelado sem plasma (60,0%; $P < 0,05$) no grau 3. Em conclusão, o sêmen congelado pode ser utilizado via cervical com os mesmos índices do sêmen fresco em grau 1 e 2. No entanto, somente o sêmen descongelado com plasma seminal atinge níveis de prenhez similar ao sêmen fresco em grau 3.

INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL DE CAPRINOS COM SÊMEN DILUÍDO E CRIOPRESERVADO COM TES

Silva, A.O.A.¹; Sousa, J.S.¹; Reis, A.N.¹; Oliveira, C.M.C.¹; Silva, L.K.X.¹;
Vale, W.G.²; Ribeiro, H.F.L.²

¹Central de Biotecnologia de Reprodução Animal – UFPa, Castanhal-Pa; ²Universidade Federal Rural Amazônia - UFRA, Belém-Pa. otavio@ufpa.br

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência do TES como diluente para o sêmen de caprino. Este experimento foi realizado em Castanhal, Estado do Pará. Foram utilizados de 2 machos da raça Pardo Alpina, 7 fêmeas mestiças e 4 puras da raça Pardo Alpina, com idade variando entre 2 e 3 anos. Os animais foram submetidos a um manejo semi-intensivo. A sincronização do cio foi realizada através da aplicação no dia 0 de esponjas vaginais impregnadas com 60 mg de Acetato de Melengestrol, que permaneceu no animal por 13 dias. No 13º dia foi aplicado 300 UI de eCG. A observação do cio foi feita no 14º e 15º dia da implantação das esponjas. Dois ejaculados foram obtidos através de vagina artificial, sendo os mesmos avaliados quanto a motilidade e vigor, e então retiradas uma amostra de 10 µl e outra de 20 µl de sêmen para determinação da patologia e concentração espermática, respectivamente. O sêmen foi então diluído em TES (hydroxymethy ethyl amino ethanesulfonic acid), contendo como crioprotetor o Glicerol (7%), a uma concentração de 50 x 10⁶ espermatozóides viáveis/dose. O sêmen diluído foi envasado em palheta de 0,5 ml, e congelado em nitrogênio líquido, segundo metodologia preconizada. Foram observadas a motilidade e o vigor do sêmen antes da congelação, pós-diluição e pós-descongelação (90%/4, 90%/4 e 60%/4, respectivamente). As cabras foram inseminadas, por via intracervical, 12 e 24 horas após a detecção do cio. O diagnóstico de gestação foi realizado 45 dias após a inseminação, através de ultrasonografia. A fertilidade do sêmen criopreservado foi comprovada através da taxa de prenhez que foi de 90,9% (10/11). A taxa de parição foi de 72,7% (8/11). Concluí-se que o diluente TES pode ser utilizado com eficiência para a criopreservação do sêmen de caprinos.

CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN OVINO EM SOLUÇÃO DE TREALOSE

Valleriote, P.S.¹; Dias, A.J.B.¹; Paes de Carvalho, F.¹; Paes Sobrinho, C.¹

¹Laboratório de Melhoramento Genético Animal/LMGA/ CCTA/ UENF, Campos dos Goytacazes-RJ, 28013-600, Brasil. valleriote@yahoo.com.br

A membrana plasmática dos espermatozoides ovinos tem uma composição particular o que dificulta a sua criopreservação com eficiência. Por isso, a utilização de sêmen congelado em programas de inseminação artificial, com deposição cervical, necessita do desenvolvimento de diluentes que melhorem a taxa de gestação. A trealose tem uma ação crioprotetora, devido ao seu efeito hipertônico, o que diminui a água intracelular e portanto a quantidade de injúrias pela formação de cristais de gelo durante o congelamento e descongelamento. Além disso a trealose confere proteção aos espermatozoides através das interações específicas com os fosfolípidos da membrana. Por não atravessar a membrana plasmática não apresenta efeitos prejudiciais aos espermatozoides em concentrações de até 100 mOsm. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da adição de trealose em um diluente para sêmen ovino, de modo a obter uma adequada integridade celular pós-descongelamento. Os ejaculados de dois ovinos da raça Santa Inês foram coletados com auxílio de uma vagina artificial (marca IMV Technologies), e diluído em TRIS-gema (Tris, ácido cítrico, glicose, gema de ovo, glicerol), acrescido ou não de trealose 0,01M. O resfriamento foi realizado em um congelador programável (Haake C-760), a 0,05°C/min., durante 2h, até atingir 5°C. Nessa temperatura foi realizada a adição do glicerol em três etapas, até obter uma concentração final de 7%. Após duas horas as palhetas contendo 50x10⁶ espermatozoides/mL foram colocadas no vapor de nitrogênio a uma distância de 6 cm da superfície, por um período de 4 minutos e posteriormente imersas em nitrogênio líquido. A avaliação da tolerância ao congelamento foi baseada na motilidade progressiva, vigor e no teste hiposmótico. Os valores médios obtidos de sete repetições demonstraram uma grande redução da motilidade progressiva após o descongelamento, de forma semelhante para amostras congeladas na ausência ou presença da trealose (42,0% ± 10,7 e 48% ± 7,0, respectivamente). Entretanto não houve alteração relevante em relação ao vigor em todas as amostras observadas, permanecendo com escore 4,0 (escala de 0 a 5). Da mesma forma a adição da trealose não alterou a resposta ao teste hiposmótico, dos espermatozoides congelados na ausência (27% ± 9,6) ou na presença (29,5% ± 5,0) da trealose. A qualidade das amostras de sêmen utilizadas nesse experimento pode ter contribuído para que os resultados encontrados não fossem mais elevados, já que a média de motilidade progressiva das amostras de sêmen fresco foi de 76,0%. Nas condições desse trabalho a adição de 0,01M de trealose não promoveu, de modo significativo, uma melhoria nas taxas de motilidade progressiva e preservação da integridade da membrana plasmática dos espermatozoides congelados.

EFEITO DA ADIÇÃO DE EQUEx-STM AO DILUENTE TRIS-GEMA NA MOTILIDADE DO ESPERMATOZÓIDE CRIOPRESERVADO DE CARNEIRO

Maia, M.S.¹; Azevedo, H.C.²; Bicudo, S.D.³; Sousa, D.B.³; Rodello, L.³

¹Embrapa Semi Árido; ²Embrapa Tabuleiros Costeiros; ³Depto. de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ/UNESP, Botucatu-SP, 18618-000, Brasil. sony@fmvz.unesp.br

Objetivou-se avaliar o efeito da adição do detergente Equex-STM ao meio diluidor, na motilidade espermática pós-descongelamento do sêmen de carneiros. Para isso, foram coletados vinte ejaculados de 10 carneiros da raça Santa Inês. O protocolo de congelamento envolveu a diluição do sêmen, em duas etapas, a 32°C com o meio Tris-gema (3,028g de Tris-hidroximetil-amino metano, 1,675g de ácido cítrico monohidratado, 0,2g de glicose, 20mL de gema de ovo em 100mL de água bi-destilada e concentração final de 7% de glicerol) contendo 0; 0,5 e 1,0% de Equex-STM. O sêmen foi envasado em palhetas de 0,25mL, congelado em sistema automatizado de refrigeração e congelamento (Tetakon[®]-TK 3000) e submetido à avaliação computadorizada da motilidade espermática (CASA). A adição de Equex-STM aumentou significativamente ($p < 0,05$) a motilidade total e progressiva do espermatozóide em relação ao meio sem detergente. No diluente Tris 0% a motilidade total foi 34% e a motilidade progressiva 24%, enquanto que no meio Tris 0,5% foi 65% e 39% e no Tris 1% foi 70% e 39% respectivamente. O Equex-STM apresentou um efeito benéfico à motilidade espermática quando adicionado ao meio Tris-gema nas concentrações de 0,5 ou 1%, sugerindo que esse diluente poderá ser usado para a congelamento do sêmen de ovinos incrementando quanti-qualitativamente a motilidade espermática.

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NOS PROCESSOS DEGENERATIVOS DOS TESTÍCULOS DE TOUROS EM REGIME DE COLETA DE SÊMEN

Silva, L.K.X.¹; Silva, A.O.A.¹; Reis, A.N.¹; Sousa, J.S.¹; Ribeiro, H.F.L.²

¹Central de Biotecnologia de Reprodução Animal – UFPA, Castanhal-Pa; ²Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA, Belém-Pa. silva_lilian@yahoo.com.br

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da temperatura ambiente no mecanismo termorregulatório testicular e na produção e qualidade espermática de touros *Bos indicus* e *Bubalus bubalis*. Foram utilizados 6 touros, sendo que 3 *Bos indicus* (Grupo A) e 3 *Bubalus bubalis* (Grupo B). Nos dias de coleta de sêmen, foi aferida a temperatura, em três horários diferentes (07h:00min, 13h:00min e 17h:00min), da cabeça e da cauda do epidídimo, da face posterior do testículo, do cordão espermático de ambos os testículos, e também a temperatura da região próxima à escápula e ao fêmur. A temperatura foi verificada através de um termômetro digital a laser (Modelo RAYNGER ST6™). O sêmen foi obtido através de vagina artificial, sendo 10 amostras retiradas de cada animal. Após a coleta, o sêmen foi avaliado em relação ao volume, cor/aspecto, turbilhonamento, motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática. Os resultados mostraram que no grupo A e no grupo B, não houve diferença estatística em relação à temperatura verificada nos diferentes horários, da cabeça do epidídimo, da cauda do epidídimo, da parte central do testículo, do cordão espermático e da temperatura corporal. Como método estatístico foi utilizado a análise de variância com nível de significância de 5%, e o teste de Tukey. Em conclusão, a temperatura testicular, a qualidade do sêmen e a produção espermática não sofreram influência da temperatura média ambiente entre os grupos A e B, e dentro dos grupos.

BAGU, E. T. *et al.* Theriogenology, v. 62, p. 861-873.

BRITO, L. F. C. *et al.* Theriogenology, v. 61, p. 511-528.

PANT, H. C. *et al.* Theriogenology, v. 60, p.27-34.

BIOMETRIA E HISTOPATOLOGIA TESTICULAR DE BOVINOS DA RAÇA NELORE

Goiozo, P.F.I.¹; Di Santis, G.W.²; De Moura, V.M.B.D.³; Bandarra, E.P.^{2,3}.

¹ Embrapa Gado de Corte. Campo Grande- MS, 79002-970, Brasil.; ¹ Departamento de Clínica Veterinária – Serviço de Patologia Veterinária – FMVZ-UNESP, Botucatu – SP, 18.618-000, Brasil.;

³Faculdade de Medicina Veterinária “Octávio Bastos”- UNIFEOB, São João da Boa Vista – SP, 18.370.000, Brasil. goiozopfi@cnpqc.embrapa.br

Os testículos são sede de inúmeras afecções que podem levar o animal à subfertilidade ou infertilidade, acarretando danos econômicos à pecuária de corte brasileira. Dentre estas alterações, destacam-se a degeneração testicular, hipoplasia testicular, orquites, alterações circulatórias e neoplasias. Foram avaliados macro e microscopicamente 159 testículos de oitenta bovinos da raça Nelore, com média de idade de 26 meses, criados em condições extensivas em pastagens de capim andropogon e com suplementação mineral. O perímetro escrotal (PE) foi mensurado em seu maior diâmetro e, após orquiectomia, obtiveram-se a largura e o comprimento de cada órgão. Para o estudo Histopatológico o material foi fixado em solução de Bouin e corado pelos métodos de HE e PAS. . Dentre as alterações diagnosticadas, degeneração foi a mais freqüente, acometendo 65% dos animais. Orquite (41,3%), alterações circulatórias (16,25%) e hipoplasia testicular (15%) compreenderam as demais lesões. Os valores obtidos na mensuração do PE de animais acometidos por degeneração (26,58 cm) ou hipoplasia moderada ou discreta (27,00 cm) não diferiram significativamente daqueles referentes aos animais com testículos normais (27,07 cm) ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey, contudo a presença de orquite resultou em diminuição significativa desta variável (25,05 cm) ($p < 0,05$), devido a substituição do tecido tubular por tecido conjuntivo. Embora não haja significância no PE de animais com degeneração, esta afecção é de fácil diagnóstico, pois o animal apresentará um alto índice de espermatozoides anormais. A mensuração do PE mostrou não ser um método capaz de identificar animais portadores de hipoplasia testicular discreta ou moderada, evidenciando a importância do controle reprodutivo do rebanho, pois animais com hipoplasia testicular discreta não possuem alterações na fertilidade. Com base nos resultados encontrados, e considerando a escassez de informações referentes a dados epidemiológicos de alterações testiculares sob o ponto de vista histopatológico, o presente estudo visa acrescentar dados referentes a estas na literatura nacional, fornecendo subsídios para futuras pesquisas sobre a fertilidade do macho bovino.

AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE TESTOSTERONA E DAS DIFERENÇAS ENTRE TEMPERATURA RETAL, ESCROTAL E INTRATESTICULAR E DA QUANTIDADE DE GLÂNDULAS SUDORÍPARAS E SEBÁCEAS EM ESCROTO DE BÚFALOS (*Bubalus bubalis*) DE DUAS FAIXAS ETÁRIAS

Satrapa, R.A.¹; Diniz, E.G.²; Beletti, M.E.²; Eberhardt, B.G.¹; Satrapa, R.²

¹Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ/UNESP, Botucatu-SP, 18618-000, Brasil.²Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.
rsatrapa@yahoo.com.br

A elevação dos níveis basais de testosterona é consequência da diferenciação das células de Leydig associada à simultânea proliferação das células germinativas, fenômenos essenciais para que o animal se torne púbere (AMANN, *Jornal of Animal Science*, v.57, p.380-403). Para a maioria dos mamíferos, a temperatura testicular é mantida em valores mais baixos do que a corporal, o que garante um ambiente térmico adequado e decisivo para o curso normal da espermatogênese (MACDONALD, *Theor. Biol.*, v. 145, n. 4, p. 430). Em bovinos (*Bos taurus*), constata-se a importância da participação das glândulas sudoríparas na regulação térmica testicular pelo fato de que, sob temperatura ambiente elevada, o escroto produz cinco vezes mais suor do que a pele de outras regiões do corpo (ROBERTSHAW, *Aust. J. Agric. Res.*, v.31, p.401-407). O objetivo do presente trabalho foi avaliar as concentrações plasmáticas de testosterona, as diferenças entre a temperatura retal (TR), escrotal (TE) e intratesticular (TI) e a quantidade de glândulas sudoríparas (GS) e sebáceas (GSb) em escroto de búfalos em duas faixas etárias. Foram utilizados 52 búfalos da raça Murrah, constituindo dois grupos, sendo o Grupo I formado por 26 animais com idade de 12 a 15 meses e o Grupo II por 26 animais de 18 a 24 meses. As coletas sanguíneas foram realizadas por venopunção da jugular (tubos Vacuntainer® com heparina). Após a colheita, as amostras foram imediatamente centrifugadas a 900 g por 20 minutos e o plasma obtido armazenado a -20 °C, até o momento das análises por radioimunoensaio (kit comercial em fase sólida, Diagnostic Productions Corporation®). As determinações das TR foram feitas com termômetro clínico e as TE e TI com termômetro digital. Para identificação histológica das glândulas sudoríparas, preparou-se lâmina de um fragmento de pele da região distal do escroto de cada animal coradas por hematoxilina-eosina e examinadas em microscopia óptica. Os dados foram analisados através do teste t de student (SAS, 1990). As médias das concentrações plasmáticas de testosterona dos grupos I e II (3,22 e 2,67 ng/mL, respectivamente) foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). As médias das TR, TE e TI do grupo I foram 38,6°C, 35,6°C e 36,9°C, respectivamente e para o grupo II, 39,1°C, 36,0°C e 37,7°C, respectivamente. As TR, TE e TI foram diferentes ($p < 0,05$) dentro de cada faixa etária, bem como entre elas, exceto para a TE entre as duas faixas etárias ($p = 0,25$). As médias do número de GS e GSb no Grupo I, de 1,14 e 1,11 e no Grupo II, de 1,42 e 1,31, respectivamente, diferiram de acordo com a faixa etária ($p < 0,05$). Conclui-se que, com a aproximação da idade reprodutiva, aumenta a responsividade do eixo hipotálamo-adenohipofisário à testosterona circulante e que as temperaturas escrotais e intratesticulares são inferiores à retal bem como a quantidade de glândulas sudorípara e sebácea aumentam no escroto dos animais em idade reprodutiva.

QUANTIFICAÇÃO DE IGFBP-3 NO PLASMA SEMINAL DE BOVINOS: VALIDAÇÃO DA TÉCNICA

Viau, P.¹; Oliveira, C.A.¹; Souza, L.W.O.^{1,2}; Arruda, R.P.^{1,2}

¹Departamento de Reprodução Animal - FMVZ/USP - São Paulo-SP, 05508-000, Brasil. ²Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal - VRA/FMVZ/USP - Pirassununga-SP, 13630-000, Brasil.

arrudarp@usp

O Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3 (IGFBP-3) é uma proteína de 43 kDa encontrada em vários fluidos corpóreos como parte de um complexo mecanismo que controla a disponibilidade dos Insulin-like Growth Factors. O conhecimento atual indica uma modulação do sistema reprodutivo por proteínas e fatores de crescimento produzidos localmente, juntamente com o eixo hipofisário-gonadal. O Insulin-like Growth Factor-I (IGF1) e seus receptores foram detectados nas células de Leydig e observou-se a secreção de IGFBP-3 pelas células de Sertoli em cultivos celulares. Esta proteína carreadora é também produzida por células epiteliais e do estroma prostático e podem tanto estimular como inibir os efeitos do IGF1 nas células prostáticas epiteliais, com a maior parte da IGFBP3 sendo detectada no plasma seminal na forma de pequenos fragmentos (≤ 16 kDa). O objetivo deste trabalho foi validar a dosagem de IGFBP-3 em plasma seminal de touros adultos, utilizando ensaio imunorradiométrico (IRMA), em fase sólida, por meio de conjunto diagnóstico comercial (ACTIVE[®] DSL-5600, Diagnostic System Laboratories, Webster, Texas, USA) desenvolvido para avaliação quantitativa de IGFBP-3 no soro humano. Este conjunto diagnóstico utiliza como elemento traçador o hormônio marcado com ¹²⁵I. Amostras semanais de sêmen foram obtidas de sete touros puros Simental com idades entre 38,8 e 41,5 meses de idade através de eletroejaculação (Eletrojet[®], Eletrovet, Brasil). O plasma seminal foi obtido por centrifugação em duas etapas (500 g / 15 minutos e 6.000 g / 15 minutos à 4 °C) e estocado em tubos criogênicos à -20°C, permanecerem armazenados até o momento do seu transporte para o Laboratório de Dosagens Hormonais (LDH/FMVZ-USP), onde foram realizados os ensaios hormonais. A quantificação hormonal foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante. O controle de qualidade do IRMA, foi realizado através da análise dos coeficientes de variação intra-ensaio, que foi inferior a 9,01% e inter-ensaio, inferior a 1,16%. A sensibilidade mínima detectada foi de 0,04ng/ml. Para etapa de validação do kit hormonal, foi utilizado um “pool” de amostras de baixa concentração hormonal no valor de 0,74ng/ml, a esta amostra adicionamos valores conhecidos de IGFBP-3, a fim de aproximá-los dos pontos da curva padrão fornecida pelo kit comercial (2,0, 5,0, 20,0, 50,0 e 100,00ng/ml de IGFBP-3). Para verificação de paralelismo no método empregado da validação do IRMA, foi realizada uma análise de regressão simples e o índice de correlação obtido foi de $r=1,0$ ($Y=0,037 + 0,878*X$; $R^2=0,999$). Foram dosadas 16 amostras com a curva padrão do kit comercial e com a curva construída com nossa matriz biológica, e o índice de correlação obtido foi de $r=0,99$ ($Y= -0,145 + 1,122*X$; $R^2=0,987$). Sendo assim, podemos concluir que foi verificado paralelismo entre a curva padrão do conjunto diagnóstico e a curva obtida a partir da diluição seriada do *pool de* amostras. Demonstramos matematicamente que não houve interferência da matriz íntegra na ligação do antígeno com o seu anticorpo, validando o uso dos conjuntos diagnósticos da DSL-5600 (Diagnostic System Laboratories, Webster, Texas, USA) para quantificação de IGFBP-3 em plasma seminal bovino. Agradecimento: à FAPESP, processo n°. 01/13940-4.

IMUNOENSAIO PARA DETERMINAÇÃO DE *INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-I* NO PLASMA SEMINAL BOVINO

Oliveira, C.A.¹; Viau, P.¹; Felipe, E.C.G.¹; Souza, L.W.O.² Arruda, R.P.²; Negrão, J.A.³

¹ Departamento de Reprodução Animal – FMVZ/USP, São Paulo-SP, 05508-000, Brasil. ²

Departamento de Reprodução Animal – FMVZ/USP, Pirassununga-SP, 13630-000, Brasil. ³

Departamento de Ciências Básicas – FZEA/USP, Pirassununga-SP, 13630-000, Brasil.

arrudarp@usp.br

A presença de IGF1 nos tecidos e secreções testiculares foi detectada em ratos, suínos, eqüinos e humanos. Verificou-se que a concentração de IGF1 no plasma seminal bovino é similar à do humano. Este fator de crescimento é apontado como possível modulador da função testicular através de mecanismos parácrinos e autócrinos. Muitos pesquisadores consideram o radioimunoensaio (RIE) como o modo mais prático e adequado para quantificar IGF. O objetivo deste estudo foi quantificar IGF1 no plasma seminal de touros adultos, utilizando a técnica de radioimunoensaio (RIE), em fase sólida, por meio de conjunto diagnóstico comercial (IRMAACTIVE[®] DSL-5600, Diagnostic System Laboratories, Webster, Texas, USA) desenvolvido para avaliação quantitativa de IGF1 no soro humano. Este conjunto diagnóstico utiliza como elemento traçador o hormônio marcado com ¹²⁵I. Amostras semanais de sêmen foram obtidas de sete touros puros Simental com idades entre 38,8 e 41,5 meses de idade através de eletroejaculação (Eletrogen[®], Santa Lydia, Presidente Prudente, Brasil). O plasma seminal foi obtido por centrifugação em duas etapas (500 g / 15 minutos e 6.000 g / 15 minutos à 4 °C) e estocado em tubos criogênicos à -20 °C, onde permanecerem congeladas até o momento do seu transporte para o Laboratório de Dosagens Hormonais (LDH/FMVZ-USP), onde foi realizado os ensaios hormonais. A quantificação hormonal foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante, e o kit comercial utilizado foi validado para o uso em plasma seminal de touros por paralelismo ($Y = 3,045 + 0,701 * X$; $R^2 = 0,99$). Os parâmetros de qualidade obtidos nos ensaios foram abaixo de 9,09 para coeficientes de variação intra-ensaio e 4,17 para coeficientes de variação inter-ensaio. Foi realizada uma etapa de extração das amostras em solução etanol/ácido, onde o IGF1 foi separado da proteína carreadora. Os resultados são expressos em ng/mL e a estatística descritiva dos dados foi realizada com uso do programa Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 1985). As concentrações de IGF1 no plasma seminal variaram entre touros e entre ejaculações consecutivas. As concentrações médias de IGF1 (\pm SD) nas amostras de sêmen de dos touros variaram de $22,2 \pm 7,1$ to $396,1 \pm 116,2$ ng/mL. A concentração média total foi de $174,2 \pm 164,1$ ng/mL. Ao longo das sete semanas de experimento a concentração média para todos os ejaculados foi de $174,2$ ng/mL, variando entre $114,2$ e $218,9$ ng/mL. As variações entre os touros foram maiores do que as variações entre as colheitas de um mesmo animal e foram similares a prévias determinações publicadas. Desde que o IGF1 seminal é produzido principalmente nos testículos, é razoável admitir que a variação entre colheitas seja baixa. Concluiu-se que o uso de kit comercial para IGF1 é um método satisfatório para a quantificação deste fator de crescimento no plasma seminal.

Agradecimento: à FAPESP, processo n^o. 01/13940-4.

IMUNOENSAIO SEM EXTRAÇÃO PARA TESTOSTERONA NO PLASMA SEMINAL BOVINO

Oliveira, C.A.¹; Viau, P.¹; Felipe, E.C.G.¹; Souza, L.W.O.²; Arruda, R.P.²; Negrão, J.A.³

¹ Departamento de Reprodução Animal – FMVZ/USP, São Paulo-SP, 05508-000, Brasil. ²

Departamento de Reprodução Animal – FMVZ/USP, Pirassununga-SP, 13630-000, Brasil. ³

Departamento de Ciências Básicas – FZEA/USP, Pirassununga-SP, 13630-000, Brasil.

arrudarp@usp.br

A testosterona é quase exclusivamente de origem testicular e sua concentração no plasma seminal está correlacionada com a concentração espermática, quantidade de espermatozoides móveis e outras características espermáticas. A quantificação de testosterona tem sido feita em vários tipos de amostras de muitas espécies através de radioimunoensaio (RIE). Os níveis de testosterona foram determinados através de RIE após procedimento de extração no soro sanguíneo, fluido intersticial testicular e citosol testicular de ratos; meio de incubação de tecido testicular de hamster com uso de kit de RIE; plasma sanguíneo e seminal de touros através de imunoensaio enzimático (EIE) após extração com butilmetileter terciário. Este estudo teve como objetivo determinar as concentrações de testosterona no plasma seminal de touros maduros utilizando a técnica de RIE utilizando kit comercial em fase sólida de RIA (ACTIVE® DSL 4000 RIA, Diagnostic System Laboratories, Webster, Texas, USA) desenvolvido para avaliação quantitativa de testosterona em soro humano. Este kit comercial utiliza como elemento traçador o hormônio marcado com ¹²⁵I. Sete colheitas semanais de sêmen, obtidas de oito touros puros Simental com idades entre 33 e 41 meses foram obtidas através de eletroejaculação (Eletrogen®, Santa Lydia, Presidente Prudente, Brasil). O plasma seminal foi obtido através de centrifugação em duas etapas (500 g / 15 minutos e 6.000 g / 15 minutos a 4°C) e armazenados em tubos criogênicos ‘a -20°C, até o seu transporte ao Laboratório de Dosagens Hormonais (LDH/FMVZ-USP), onde foram realizados os ensaios hormonais. A quantificação hormonal procedeu-se de acordo com o protocolo do fabricante, o kit comercial utilizado foi validado para o uso em plasma seminal de touros por paralelismo ($Y = 5,47 + 1,073 * X$, $R^2 = 0,98$), e os coeficientes intra e interensaios foram abaixo de 11,57 e 4,51, respectivamente. Os resultados são expressos em ng/mL e estatística descritiva dos dados obtidos foi realizada utilizando o Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 1985). As concentrações de testosterona no plasma seminal variaram entre touros e entre ejaculados consecutivos. As concentrações médias hormonais individuais Testosterona (\pm SD) no plasma seminal variaram entre $0,23 \pm 0,12$ to $1,40 \pm 0,74$ ng/mL. A média total para os oito animais foi de $0,60 \pm 0,65$. Ao longo das sete semanas de colheitas, as concentrações médias dos oito touros variaram entre $0,32 \pm 0,29$ e $0,75 \pm 0,67$ ng/mL. Esperava-se que as concentrações de testosterona observadas no plasma seminal fossem mais elevadas, visto que o hormônio é produzido nos testículos e considerando as referências de literatura. Contudo, deve-se considerar a raça e condição ambiental na ocasião das colheitas, bem como diferenças de idade entre animais utilizados. Outro fator que influencia também a quantificação do hormônio são as proteínas presentes no plasma seminal, as quais se não removidas, como ocorreu no presente estudo, podem reduzir a quantidade de hormônio disponível para reação antígeno-anticorpo no RIE. Desta forma, conclui-se que a utilização de RIE sem processo de extração pode ser utilizado quando se pretende apenas realizar comparações e não é objetivo determinar a quantidade total de hormônio na amostra de plasma seminal. **Agradecimento:** à FAPESP, processo n°. 01/13940-4.

PROTEÍNAS LIGADORAS A HEPARINA NO PLASMA SEMINAL E ESPERMATOZÓIDES EM TOUROS NELORES

Fernandes, C.E.¹; Souza, F.F.¹; Neto, J.S.²; Ribolla, P.E.²; Feliciano Silva, A.E.D.¹

¹ Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ/UNESP, Botucatu-SP, 18618-000, Brasil. ² Instituto Biológico, UNESP, Campus de Botucatu, SP. cesfe@nin.ufms.br

Das proteínas presentes no sêmen bovino, a maioria possui propriedades de ligação à lipoproteínas de alta densidade (HDL), tais como a calmodulina e a heparina. Estas proteínas tem sido reconhecidas como BSPs (*Sperm Binding Proteins*) cujas funções primordiais envolvem a ligação aos fosfolipídeos das membranas plasmáticas dos espermatozóides, participação no processo de capacitação e modulação da reação acrossomal. O objetivo deste estudo foi separar proteínas ligadoras à heparina em touros Nelore usando a cromatografia por afinidade. Touros Nelore (n=4) tiveram amostras (4 mL) de um ejaculado separadas por centrifugação (10.000 g/30 min) em duas frações: plasmática seminal e espermatozóides. Alíquotas de 100 µL de cada fração foram equilibradas em tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 8,0 e submetidas a um fluxo de 650 a 1.000 mL/min. em cromatografia por afinidade à heparina, utilizando-se resina de sefarose (*Heparin-Sepharose*). Ao término da cromatografia, 20 µL das frações representativas da maior absorbância das proteínas adsorvidas à heparina após gradiente de NaCl (1M), foram submetidas a eletroforese unidimensional (SDS-PAGE, 12,5%, com padrão de peso molecular entre 10 e 250 kDa). Os géis resultantes foram corados com *comassie blue* digitalmente analisados. No plasma seminal foram encontradas proteínas de 65,0, 58,0, 54,3, 38,6, 25,0 22,0 17, 4, 15,0 e 10,0 kDa (valores próximos de 100 mABS), nos espermatozóides foram encontradas proteínas de 65,0, 55,3 47,6, 15,1, e 12,9. kDa (próximas a 40 mABS). Esses resultados sugerem que várias proteínas, além das já descritas em *Bos taurus* nas distintas frações estudadas, podem estar presentes no sêmen de touros Nelore e, portanto serem utilizadas como indicadores associados à fertilidade.

EFEITOS DA SOMATOTROPINA SOBRE CARACTERÍSTICAS SEMINAIS DE *Bos taurus taurus* SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE TESTICULAR TÉRMICO

Souza, L.W.O.¹; Garcia, A.R.¹; Celeghini, E.C.C.¹; Andrade, A.F.C.¹; Raphael, C.F.¹; Nascimento, J.¹; Rodrigues, P.H.M.²; Arruda, R.P.¹

¹Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal - VRA/FMVZ/USP, Pirassununga-SP, 13630-000, Brasil, arrudarp@usp.br ²Departamento de Nutrição e Produção Animal – FMVZ/USP, Pirassununga-SP, 13630-000, Brasil.

O Hormônio do Crescimento (GH) exerce seus efeitos através dos Insulin-like Growth Factor I, um potente agente mitogênico importante para o desenvolvimento das células germinativas e manutenção do espermatozóide. Em touros, a administração de GH promove redução das anormalidades morfológicas e aumento da motilidade espermática, aumentando a fertilidade. Um delineamento experimental tipo blocos ao acaso utilizou dezesseis touros adultos submetidos a quatro tratamentos em esquema fatorial 2x2 (0 e 96 horas de insulação testicular, 0 e 1,2 mg bST/kg PV IM – 5 aplicações quinzenais). As amostras de sêmen colhidas semanalmente com uso de eletrojaculador (Eletrogen®, Santa Lydia, Presidente Prudente, Brasil), foram avaliadas quanto às características seminais a fresco (turbilhonamento, motilidade e vigor) e morfologia através de microscopia óptica de contraste de fase. Uma fração do sêmen foi processada para obtenção do plasma seminal através de centrifugação em duas etapas (500 g / 15 minutos e 6.000 g / 15 minutos a 4°C). As determinações das concentrações de testosterona foram realizadas com uso de kit comercial RIA ACTIVE® DSL4000 e de IGF1 com o kit IRMA ACTIVE® DSL5600 (Diagnostic System Laboratories, Webster, Texas, USA). A análise de variância utilizou o PROC GLM do software Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 1985), adicionando-se o fator medidas repetidas no tempo, referente aos diversos momentos de amostragem. As probabilidades de interações com o tempo foram determinadas pelo teste de Greenhouse-Geisse. O nível de significância considerado foi 5%. Durante o período total do experimento, a insulação promoveu aumento ($P<0,05$) na média de ocorrência de alterações de acrossoma (0,6%), defeitos de peça intermediária (1,1%), defeitos da cabeça do espermatozóide (18,8%), defeitos da cauda do espermatozóide (7,4%) e defeitos espermáticos totais (34,8%). A ocorrência de alterações morfológicas variou entre indivíduos, como descrito por Vogler *et al.* (1993), mas a incidência de defeitos apresentou ligeira variação, possivelmente em virtude de diferenças entre os animais utilizados, condições ambientais, duração da insulação e frequência de colheitas. A motilidade espermática diminuiu ($P<0,05$) em decorrência da insulação, (média de 50,4%). Tal redução foi inversamente proporcional à ocorrência de defeitos espermáticos totais, podendo ser atribuída às alterações morfológicas. As concentrações seminais de testosterona (0,60 ng/mL) e IGF1 (150 ng/mL) não sofreram alterações ($P>0,05$) resultantes da insulação testicular. É razoável admitir que a bST não agiu de forma significativa nos testículos, já que a maior parte do IGF1 seminal provém da produção local e não houve aumento nas concentrações seminais deste fator. A somatotropina recombinante bovina não afetou ($P>0,05$) as características espermáticas ou concentrações seminais de testosterona e IGF1 no plasma seminal.

Agradecimento: à FAPESP, processo n°. 01/13940-4.

EFEITOS DA SOMATOTROPINA RECOMBINANTE BOVINA SOBRE A INTEGRIDADE DA CROMATINA DE ESPERMATOZÓIDES BOVINOS

Garcia, A.R.^{1,2}; Souza, L.W.O.¹; Celeghini, E.C.C.¹; Rodrigues, P.H.M.¹; Andrade, A.F.C.¹; Raphael, C.F.¹; Nascimento, J.¹; Arruda, R.P.¹

¹Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal - FMVZ/USP, Pirassununga-SP, 13630-000, Brasil, arrudarp@usp.br ²Faculdade de Medicina Veterinária – CESUMAR, Maringá-PR, 87050-390, Brasil.

A somatotropina é fundamental para o crescimento corporal e o desenvolvimento. Seu uso pode melhorar as taxas de fertilização, por agir sobre as características dos espermatozóides ou favorecer seu metabolismo. Os objetivos do trabalho foram: 1) Avaliar se a degeneração testicular induzida por estresse térmico é capaz de provocar danos à estrutura da cromatina espermática; 2) Estudar o efeito de aplicações exógenas de somatotropina recombinante sobre o número de células com fragmentação da cromatina em touros com degeneração testicular. O delineamento experimental foi em blocos, utilizando medidas repetidas no tempo e com arranjo fatorial de tratamento 2x2. Dezesesseis touros Simental (*Bos taurus taurus*) com 34 ± 10 meses e aptos à reprodução foram usados como doadores de sêmen. Os animais foram mantidos sob as mesmas condições ambientais e o sêmen foi colhido semanalmente por eletroejaculação durante 22 semanas, totalizando 352 ejaculados. Na semana 5, oito animais foram submetidos à insulação testicular (Grupo INSUL, n = 4 e Grupo IbST, n = 4) e oito animais foram mantidos intactos (Grupo CONT, n = 4 e Grupo bST, n = 4). Nas semanas 10, 12, 14, 16 e 18, os animais dos grupos bST e IbST receberam aplicações subcutâneas de somatotropina recombinante bovina (Lactotropin[®], Elanco, São Paulo, Brasil; 1,2 mg/kg PV) enquanto os animais dos grupos CONT e INSUL receberam placebo. A fragmentação da cromatina foi avaliada pela técnica de coloração de acridina laranja sob microscopia de epifluorescência com aumento de 1000x (excitação: 460-570 nm e emissão: 460-610 nm). Foram avaliados 500 espermatozóides por amostra e sua classificação seguiu o método descrito por Tejada e colaboradores (Fertility and Sterility, v. 42, p. 87-91, 1984). Os dados foram submetidos à análise de variância-ANOVA, utilizando os procedimentos contidos no SAS. Imediatamente antes de iniciado o processo de insulação testicular, as médias de espermatozóides com cromatina fragmentada foram de 0,35 ± 0,29% (CONT), de 0,90 ± 0,71% (bST), de 0,10 ± 0,10% (INSUL) e de 0,40 ± 0,12% (IbST). Houve influência do tempo (P=0,0001) e de tempo X insulação (P=0,0001) nos resultados de fragmentação do DNA. Instalada a insulação testicular, houve acréscimo de células com DNA fragmentado nos touros de INSUL e IbST a partir da semana 6. O pico de anormalidade foi manifestado na semana 9, com valores de 0,55 ± 0,25% (CONT), de 0,45 ± 0,21% (bST), de 9,95 ± 4,04% (INSUL) e de 10,63 ± 2,78% (IbST). O tratamento com somatotropina recombinante bovina não influenciou a expressão de espermatozóides com fragmentação de DNA e as médias dos grupos CONT e bST se mantiveram majoritariamente abaixo de 1% entre as semanas 10 a 22. Enquanto isso, houve diminuição de células com DNA fragmentado em INSUL e IbST. Como essa diminuição foi mais lenta para o grupo IbST, não foi observado efeito significativo para o tratamento com somatotropina recombinante bovina (P=0,8807). Após 22 semanas, as médias de espermatozóides com fragmentação de DNA foram de 0,56 ± 0,11% (CONT), de 0,82 ± 0,14% (bST), de 1,48 ± 0,32% (INSUL) e de 3,44 ± 0,70% (IbST). Assim, a insulação testicular é capaz de provocar aumento transitório no número de espermatozóides com cromatina fragmentada enquanto a somatotropina recombinante bovina não acelera o processo de restabelecimento da normalidade da estrutura da cromatina espermática se usada após a instalação do processo de degeneração testicular.

Agradecimento: à FAPESP, processo n° 01/13940-4.

USO DE CMXROS E JC-1 NA AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MITOCONDRIAL, ASSOCIADAS A SONDAS FLUORESCENTES PARA AVALIAÇÃO DA MEMBRANA PLASMÁTICA E ACROSSOMAL EM ESPERMATOZÓIDES BOVINOS

Celeghini, E.C.C.¹; Nascimento, J.¹; Andrade, A.F.C.¹; Raphael, C.F.¹; Souza, L.W.O.¹; Arruda, R.P.¹

¹Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal – VRA/FMVZ/USP; 13630-090, Pirassununga-SP, Brasil. arrudarp@usp.br

A associação de sondas fluorescentes para a avaliação simultânea da integridade das membranas plasmática e acrossomal e a função mitocondrial de espermatozóides bovinos vem sendo realizada na tentativa de desenvolver técnicas laboratoriais que predizem com maior confiabilidade a capacidade fertilizante do sêmen bovino. O uso de MitoTracker red[®] ou CMXRos e de iodeto de 5,5', 6,6'-tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1), sondas fluorescentes para avaliar a função mitocondrial, foi testado e validado em associações com outras sondas fluorescentes tais como iodeto de propídio (PI) e Hoechst 33342 (H342) para identificar a integridade da membrana plasmática e de aglutinina de *Pisum sativum* conjugada ao isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA), para verificar acrossomo intacto. Para a validação destas técnicas foram utilizadas três colheitas de sêmen (Eletrogen[®], Santa Lydia, Presidente Prudente, Brasil) de quatro touros da raça Simental (n=12). Foram utilizados ejaculados que apresentaram motilidade $\geq 80\%$, vigor ≥ 3 e alterações morfológicas $\leq 10\%$. O sêmen foi diluído em meio TALP (25×10^6 espermatozóides/mL) e dividido em duas alíquotas, sendo uma mantida viável e a outra submetida a congelamento rápido em nitrogênio líquido seguida de descongelamento lento (*flash frozen*) por três vezes consecutivas, causando lise das membranas celulares e alterando a função mitocondrial. Três tratamentos foram preparados com as seguintes proporções de Sêmen viável: Sêmen submetido a *flash frozen*: 100:0 (T100), 50:50 (T50) e 0:100 (T0). As técnicas foram preparadas colocando-se 150 μL de sêmen diluído em um microtubo ao qual foram adicionados 2 μL de H342 (40 $\mu\text{g/mL}$), 3 μL de PI (0,5 mg/mL), 50 μL de FITC-PSA (100 $\mu\text{g/mL}$) e 0,5 μL de CMXRos (500 μM) ou 2 μL de JC-1 (153 μM). As amostras foram incubadas a 38,5° C por 8 minutos, no escuro. Após a incubação foram realizadas preparações úmidas e a leitura foi realizada imediatamente sob microscopia de epifluorescência em filtros com excitação de 460-570 e 365nm e emissão de 460-610 e 420nm, contando-se 200 células. De acordo com a fluorescência emitida por cada sonda utilizada foram classificadas oito categorias de células. Os dados obtidos de integridade de membrana plasmática, acrossomal e de função mitocondrial (variável dependente) nos tratamentos T100, T50 e T0 (variável independente) foram submetidos à análise de regressão. Para a associação PI/H342/FITC-PSA e CMXRos, foram obtidas as equações: $Y=1,64+0,82X$ ($R^2=0,93$), para integridade de membrana plasmática, $Y=3,50+0,84X$ ($R^2=0,92$), para a integridade de acrossomo e $Y=1,50+0,80X$ ($R^2=0,93$), para a função mitocondrial. Para a outra associação PI/H342/FITC-PSA e JC-1 foram obtidas as seguintes equações: $Y=0,78+0,92X$ ($R^2=0,92$), para integridade de membrana plasmática, $Y=3,82+0,81X$ ($R^2=0,91$); para integridade de acrossomo e $Y=0,06+0,78X$ ($R^2=0,93$) para potencial de membrana mitocondrial. Baseados nas equações e no alto coeficiente de determinação de ambas as técnicas concluiu-se que estas técnicas são eficientes para a avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial em espermatozóides bovinos. Todavia, uma vantagem da JC-1 foi observada sobre a CMXRos, uma vez que JC-1 separa duas populações de células por código de cor, mostrando mitocôndrias com alto potencial de membrana, marcadas em vermelho e mitocôndrias com baixo potencial de membrana, marcadas em verde.

Agradecimentos: à FAPESP, processos n. 00/14653-6 e 01/13940-4.

AVALIAÇÃO ULTRA ESTRUTURAL E DA FRAGMENTAÇÃO DO DNA DE ESPERMATOZÓIDES BOVINOS CONSERVADOS POR DIFERENTES TRATAMENTOS DE LIOFILIZAÇÃO

Martins, C.F.^{1,2}; Bão, S.N.²; Rumpf, R.¹

¹ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia ² Universidade de Brasília
rodolfo@cenargen.embrapa.br

A liofilização é um processo desenvolvido para preservar materiais biológicos, farmacêuticos e materiais impregnados com solvente. Este procedimento tem sido empregado para alcançar a preservação através da retirada de água dos sistemas biológicos por sublimação do gelo. Recentemente, a liofilização tem sido aplicada para preservar espermatozoides mamíferos, representando uma ferramenta alternativa para conservação do material genético. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi verificar o efeito da liofilização espermática por diferentes tratamentos sobre a estrutura dos espermatozoides bovinos, avaliada por microscopia eletrônica, coloração com acridine orange e teste de TUNEL. Espermatozoides de três touros foram coletados por eletroejaculação e diluídos com três diferentes meios: (T 1) - TCM hank's com 10% de SFB; (T 2) - TCM hank's com 10% de SFB e trehalose 0,2 M; (T 3) – Solução de EGTA, composta de 50mM/L de EGTA [ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid] e 10mM/L de tris-HCl. Como controle foi utilizado sêmen congelado convencionalmente. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e rapidamente levadas ao liofilizador, onde foram submetidas à liofilização por 12-16 horas. Para verificar os eventuais efeitos da liofilização foram avaliadas as principais estruturas envolvidas no processo de fecundação, tais como: membrana plasmática, acrossoma e núcleo. Para isto, foram realizadas avaliações ultraestruturais por microscopia eletrônica e da integridade do DNA espermático pelo corante *acridine orange* e pela técnica de TUNEL. Em todos os tratamentos os espermatozoides perderam a motilidade, no entanto, houve apenas uma perda discreta das caudas (separação da cabeça). A membrana plasmática sofreu maiores alterações nos T2 e T3, enquanto no T1 foi observado somente pequenas ondulações. O acrossoma e as mitocôndrias foram preservadas em todos os tratamentos. Os microtúbulos sofreram completa desorganização nos tratamentos T2 e T3, e mantiveram-se normais no T1. Em relação à estabilidade da cromatina espermática foi observado uma integridade média de 95%, 98%, 100% e 100%, respectivamente para T1, T2, T3 e controle. Pela técnica de TUNEL observaram-se 14%, 5%, 2% e 1% de fragmentação do DNA, igualmente para os tratamentos T1, T2, T3 e controle. Estes resultados indicam que o processo de liofilização espermática é agressivo, tornando os espermatozoides imóveis, porém, o núcleo parece bem protegido pelos tratamentos T2 e T3. Apesar do comprometimento celular, o fato do núcleo permanecer intacto representa ainda possibilidade de fecundação, caso estes núcleos sejam microinjetados no citoplasma de ovócitos pela técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozoide.

Apoio financeiro: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e CNPq.

EFEITO DO GRADIENTE DE PERCOLL SOBRE A INTEGRIDADE ACROSSOMAL E FRAGMENTAÇÃO DA CROMATINA ESPERMÁTICA EM TOUROS COM ALTERAÇÕES NA ESPERMIOGÊNESE

Fernandes, C.E.¹; Feliciano Silva, A.E.D.¹; Dode, M.A.N.²

¹ Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ/UNESP, Botucatu-SP, 18618-000, Brasil. ²Cenargen- Embrapa, Brasília, DF, Brasil. cesfe@nin.ufms.br

Dentre os métodos de seleção espermática usados na fecundação *in vitro* (FIV) o gradiente de Percoll (GP) tem sido amplamente usado. Sua vantagem reside na separação dos espermatozoides de outras células, bactérias e demais partículas indesejáveis. Estudos têm mostrado que a população espermática selecionada por esse método apresenta características superiores em termos de cinética e morfologia espermática. Porém, nos últimos anos o efeito de certas características morfológicas em especial as alterações do núcleo espermático tem sido mais investigadas e representam aspecto importante na redução da eficiência de touros na produção *in vitro* de embriões. O objetivo deste estudo foi estimar o efeito da GP sobre a integridade acrossomal e fragmentação nuclear no sêmen de touros com degeneração testicular induzida. Quatro touros Nelore, com idade entre 2 e 3 anos foram submetidos a degeneração testicular por insulação durante 5 dias. O sêmen foi obtido por eletro-ejaculação e congelado (diluyente a base de Tris-Lactose, glicerol e gema de ovo) antes (P0) e 7 (P7), 14 (P14) e 21 (P21) após remoção do insulto testicular. Três palhetas foram descongeladas de cada touro em cada período (P0, P7, P14 e P21) avaliando-se a integridade acrossomal (IAC) pela coloração de *trypan-blue giemsa* (220 células/1000x/campo claro) e fragmentação da cromatina espermática (FCE) pela coloração de Fuelgen (500 células/1000x/contraste de fase), pré e após centrifugação por gradiente de Percoll (GP, 2 mL de Percoll 45 e 2 mL de percoll 90% e centrifugadas a 700 x g/20 min./30 °C). Os resultados mostraram que não houve interação entre os períodos experimentais e GP para IAC. Essa característica seminal foi superior ($p<0,05$) apenas pós-GP nos períodos P7 ($65,2\pm6,8$), P14 ($67,6\pm0,95$) e P21 ($72,8\pm12,0$) em relação ao P0 ($47,8\pm4,5$). A FCE foi superior ($p<0,05$) pós-GP no P21 ($32,4\pm3,5$) em relação à pré-GP ($22,4\pm3,4$). Conclui-se com essas observações que o gradiente de Percoll pode favorecer a seleção de espermatozoides com maior integridade acrossomal, porém, não é capaz de reter espermatozoides com altos percentuais de fragmentação da cromatina nuclear.

EFEITOS DA REMOÇÃO DO PLASMA SEMINAL NA CONGELABILIDADE DE SÊMEN BOVINO

Alberti, K.¹; Papa, F.O.¹; Siqueira Filho, E.R.¹; Melo, C.M.¹; Dell'Aqua Jr., J.A.¹

¹Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ/UNESP, Botucatu-SP, 18618-000, Brasil. karinaalberti04@yahoo.com.br

A congelação de sêmen bovino é realizada com sucesso há décadas em todo mundo. Muitas biotécnicas de reprodução foram desenvolvidas e aperfeiçoadas neste período. Atualmente com a posição de destaque da pecuária bovina no país e a busca pelo melhoramento genético e rendimento econômico das criações, tornam-se necessárias inovações nas técnicas de congelamento de sêmen. A remoção do plasma seminal é uma técnica utilizada rotineiramente na criopreservação de sêmen equino, sendo essencial e necessária para o sucesso da congelamento. Em carneiros também ocorre melhora significativa nos parâmetros seminais pós-descongelamento, com a remoção do plasma seminal (Oba. et al, Anais do Congresso Internacional de Reprodução Animal, Brasil, v.2, p.481, 2004). O presente trabalho objetivou testar uma nova metodologia de congelamento de sêmen bovino, introduzindo a centrifugação, para a remoção do plasma seminal. Foram coletados 40 ejaculados de touros, aptos a reprodução, manejados em pasto. O ejaculado foi dividido em seis partes, sendo três diluídas com os meios: TRIS, Glicina-gema e Botu-Bov[®] e congeladas pela metodologia convencional e as outras três frações, uma de cada diluente foram centrifugadas com a fração sem crioprotetor para a remoção do plasma seminal. Após a centrifugação desprezou-se o sobrenadante e os "pellets" foram ressuspensos nos referidos meios. Tanto as palhetas da metodologia convencional com as do grupo testado, foram estabilizadas em geladeiras a 5°C por quatro horas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em botijões. As análises do sêmen foram pelo sistema CASA, para a mensuração dos parâmetros espermáticos: Motilidade Total (MT), Motilidade Progressiva (MP) e espermatozoides com movimentos rápidos (RAPID). A análise da integridade da membrana plasmática (IM) foi realizada através das sondas fluorescentes. Comparando-se os resultados dos parâmetros espermáticos do grupo que foi removido o plasma seminal com a metodologia convencional, observa-se uma superioridade das amostras centrifugadas, independente do diluidor utilizado. As médias (MT/MP/RAPID/IM) apresentadas pelos diluentes Botu-Bov[®] utilizando ou não a centrifugação foram de: 66,17^a / 50,97^a / 57,60^a / 35,65^a e 58,57^b / 43,22^b / 48,37^b / 30,12^b; para o diluidor Glicina-gema os valores foram de e 59,07^b / 44,00^b / 48,89^b / 28,72^b e 53,12^c / 38,82^c / 43,65^b / 26,37^{bc} com o diluente TRIS valores de: 54,17^c / 36,10^c / 48,45^c / 28,67^b e 46,92^d / 31,95^d / 38,79^d / 25,90^c respectivamente. Os resultados acima mostram um ganho médio nos três diluidores de 12,6% (MT), 14% (MP), 18,3% (RAPID) e 12% (IM), após a centrifugação. Os dados apresentados no presente trabalho confirmam que a remoção do plasma seminal melhora a taxa de congelabilidade do sêmen bovino, demonstrando que a centrifugação é uma inovação metodológica importante na busca pelo avanço desta técnica e melhoria dos índices de fertilidade nas diferentes biotecnologias da reprodução.

Apoio financeiro: FAPESP

BOTU-BOV® UMA NOVA PROPOSTA DE DILUIDOR NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN BOVINO

Alberti, K.¹; Papa, F.O.¹; Siqueira Filho, E.R.¹; Melo, C.M.¹; Dell'Aqua Jr., J.A.¹

¹Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ/UNESP, Botucatu-SP, 18618-000, Brasil. karinaalberti04@yahoo.com.br

A moderna indústria bovina em todo o mundo é baseada na utilização da inseminação artificial (I.A.) com sêmen congelado (Aires, et al., Theriogenology, v.60, p.269-279, 2003). O desenvolvimento de técnicas adequadas para a preservação de sêmen é um dos passos mais importantes no avanço da reprodução animal nas diferentes espécies e vem sendo conseguido através da aplicação de biotécnicas cada vez mais modernas (Papa et al., Rev. Bras. Reprod. Anim., v.24, n.1, p.39-44, 2000). Apesar da criopreservação de sêmen ser uma metodologia largamente utilizada, apresenta ação deletéria durante o processo de congelamento e a finalidade de novas metodologias visa minimizar esses efeitos prejudiciais ao sêmen. Neste aspecto o meio diluidor de sêmen é de fundamental importância para preservação das células espermáticas, expostas a criopreservação. Com isso a obtenção de diluidores, que promovam maior viabilidade dos espermatozoides após a descongelamento é imprescindível. O presente trabalho objetivou testar a eficiência do diluidor denominado Botu-Bov®, confrontado com os diluidores TRIS e Glicina-Gema, na criopreservação de sêmen bovino pela metodologia tradicional de congelamento. Foi coletado sêmen de 40 touros, 20 *Bos taurus taurus* e 20 *Bos taurus indicus*, em idade reprodutiva, mantidos em regime de pasto. Cada amostra foi fracionada em três partes, e diluídas com os meios TRIS, Glicina-gema e Botu-Bov®. Todas as amostras foram envasadas em palhetas de 0,5 ml e colocadas para estabilizar em geladeiras automáticas a 5°C durante quatro horas. Após este período as palhetas foram submetidas ao vapor de nitrogênio líquido (N₂) por vinte minutos, e então foram imersas no N₂ e armazenadas em botijões criobiológicos. Os parâmetros espermáticos pós-descongelamento foram analisados ao HAMILTON THORN RESEARCH-IVOS 10 (CASA), onde foram avaliadas as percentagens de motilidade espermática total (MT), motilidade espermática progressiva (MP) e de espermatozoides rápidos (RAPID). A análise da integridade da membrana plasmática foi realizada através das sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína e iodeto de propídio. O novo meio diluente mostrou resultados superiores estatisticamente pelo teste de Tukey (p<0,01), em todos os parâmetros espermáticos testados. Os valores (MT/MP/RAPID) encontrados nas amostras de Botu-Bov® foram, 58,57^a/ 43,22^a/ 48,37^a confrontados com Glicina-Gema e TRIS, que obtiveram 53,12^b/ 38,82^b/ 43,65^b; 46,92^c/ 31,95^c/ 38,79^c, respectivamente. O resultado da análise de integridade de membrana plasmática para os três diluidores Botu-Bov®, Glicina-Gema e TRIS foram 30,12%^a, 26,30%^b e 25,90%^b. Dados parciais de inseminação artificial utilizando o diluidor Botu-Bov® demonstraram a eficiência reprodutiva projetando índices promissores de fertilidade. Os resultados obtidos nesse experimento mostraram que o diluidor Botu-Bov® promove maior proteção às células espermáticas no processo de criopreservação, em relação aos outros diluentes testados, culminando na maior viabilidade espermática pós-descongelamento, conferidas nos testes laboratoriais. Com isso conclui-se que o diluidor testado confirma objetivo inicial de desenvolver uma nova fórmula inovadora para as técnicas de congelamento de sêmen bovino.

Apoio Financeiro: FAPESP

EFEITO DOS DILUENTES BOTU-BOV® E TRIS NA CONGELABILIDADE DE SÊMEN DE TOUROS *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*

Alberti, K.¹; Papa, F.O.¹; Siqueira Filho, E.R.¹; Melo, C.M.¹; Dell'Aqua Jr., J.A.¹

¹Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ/UNESP, Botucatu-SP, 18618-000, Brasil. karinaalberti04@yahoo.com.br

A pecuária de corte é um dos setores mais importantes na atual economia nacional. Atualmente a produção bovina no país está embasada em dois grupos de animais oriundos de duas distintas regiões do planeta, os zebuínos, originários da região da Índia e os taurinos, procedentes do continente europeu. Esses dois grupos diferem muito em suas características zootécnicas, produtivas e reprodutivas. No Brasil para amenizar tais diferenças e gerar maior produtividade no rebanho, é comum a realização do choque sanguíneo, ou cruzamento industrial, onde se lança mão do uso de biotécnicas de reprodução como a inseminação artificial. Para o avanço no uso da IA é importante primar pela qualidade do sêmen a ser utilizado nesse processo, portanto é necessário que haja meios diluidores eficientes para a criopreservação de sêmen de ambas as origens genéticas. O presente estudo teve como objetivo avaliar a eficiência do meio diluente Botu-Bov® nos índices de congelabilidade em touros zebuínos e taurinos. O experimento foi realizado com 40 ejaculados de diferentes touros em idade reprodutiva, sendo 20 *Bos taurus taurus* e 20 *Bos taurus indicus*. Cada ejaculado foi fracionado em duas partes, cada uma diluída com um meio, Botu-Bov® e TRIS. As amostras foram envasadas e estabilizadas em geladeira automática a 5°C por quatro horas e congeladas em nitrogênio líquido. Os parâmetros espermáticos pós-descongelção foram analisados por CASA, onde foram avaliadas as percentagens de motilidade espermática total (MT), motilidade espermática progressiva (MP) e de espermatozóides rápidos (RAPID). A análise da integridade da membrana plasmática (IM) foi realizada através das sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína (FDA) e iodeto de propídio (IP). Os resultados encontrados nos testes laboratoriais das amostras mostraram que o diluidor Botu-Bov® apresentou superioridade estatística para o teste Tukey ($p < 0,001$) em todos os parâmetros espermáticos, quando comparado com o outro diluidor. O diluente Botu-Bov® apresentou as seguintes médias de MT/MP/RAPID/IM: 57,45^a/ 42,50^a/ 48,80^a/ 29,40^a em touros zebuínos e 59,70^a/ 43,95^a/ 51,95^a/ 30,85^a, nos taurinos. Para o diluidor TRIS foram observadas as médias 43,35^b/ 29,45^b/ 34,29^b/ 25,00^b e 50,50^c/ 34,45^c/ 43,30^c/ 26,80^b em zebuínos e taurinos, respectivamente. De maneira geral não houve interação entre as origens raciais com o diluente Botu-Bov®, não havendo diferenças significativas nas taxas de viabilidade espermática pós-descongelção, entre os grupos. Os dados mostram superioridade do Botu-Bov® nas duas origens raciais, quando comparado ao TRIS.

EFEITOS DA CRIOPRESERVAÇÃO E DO DILUIDOR SOBRE O SÊMEN BOVINO QUANTO ÀS MEMBRANAS PLASMÁTICA, ACROSSOMAL E FUNÇÃO MITOCONDRIAL

Celeghini, E.C.C.¹; Andrade, A.F.C.¹; Nascimento, J.¹; Raphael, C.F.¹; Bianconi, L.L.¹;
Rodrigues, P.H.M.², Arruda, R.P.¹

¹Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal - VRA/FMVZ/USP; ²Departamento de Nutrição e Produção Animal - FMVZ/USP; 13630-090, Pirassununga-SP, Brasil. arrudarp@usp.br

A criopreservação do sêmen causa injúrias nas membranas espermáticas, o que pode refletir em redução da fertilidade. Estas injúrias são devido a alterações na temperatura e na osmolaridade do meio, que provocam mudanças morfológicas na organização e composição dos lipídios. Todavia, diferentes meios de criopreservação podem diferir na preservação dos diversos componentes celulares. Técnicas mais objetivas, como o uso de sondas fluorescentes, para avaliar integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial em espermatozóides podem fornecer dados sobre a ocorrência de crioinjúrias. Este experimento objetivou avaliar os efeitos da criopreservação sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozóides bovinos frente a dois diluidores diferentes. Para isso, foram realizadas sete colheitas de sêmen de oito touros da raça Simental. Após a colheita, o sêmen foi avaliado simultaneamente quanto a integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial, pela associação de sondas fluorescentes, com o seguinte protocolo: uma amostra de 150 µL de sêmen diluído em meio TALP (25x10⁶ espermatozóides/mL) foi adicionada de 3 µL de iodeto de propídio (PI, 0,5 mg/mL), 50 µL de aglutinina de *Pisum Sativum* conjugada ao isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA, 100 µg/mL) e 2 µL de iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1, 153 µM). A amostra foi incubada (38,5°C/8 min) e a leitura realizada sob microscopia de epifluorescência (Nikon, Eclipse 80i) sob filtro (D/F/R, C58420) com excitação de 340 a 525 e emissão de 435 a 655, contando-se 200 células. Após as análises, o sêmen foi dividido em duas alíquotas, sendo uma diluída com o diluidor Bioxcell[®] (IMV Technologies, IVP do Brasil) e a outra com Botu-Bov[®] (Biotech-Botucatu-Ltda/ME, Brasil), envasado em palhetas de 0,5 mL (50x10⁶ espermatozóides/palheta) e submetido a congelamento com um sistema automatizado (TK-3000, TK Tecnologia em Congelamento Ltda., Uberaba, Brasil). Duas palhetas de cada tratamento foram descongeladas e o sêmen foi novamente avaliado quanto a integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial com a mesma técnica já descrita, com alguma modificação (150 µL de sêmen diluído em TALP, 20x10⁶ espermatozóides/mL, + 3 µL de PI + 50 µL de FITC-PSA + 6 µL de JC-1). A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 1985), os dados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey. Os percentuais de integridade de membrana plasmática (78,06 ± 1,18%), acrossomo intacto (86,08 ± 0,92%) e função mitocondrial (76,88 ± 1,47%) no sêmen pré-criopreservação diminuíram (P<0,05) após a criopreservação com ambos os diluidores. O sêmen criopreservado com Botu-Bov[®] preservou melhor (P<0,05) a integridade das membranas plasmática (28,83 ± 1,11 x 18,16 ± 0,97%) e acrossomal (68,83 ± 0,99 x 55,26 ± 1,77%) e função mitocondrial (23,96 ± 1,06 x 16,96 ± 1,03%) do que com Bioxcell[®]. O percentual de células com membrana plasmática e acrossomo intactos e com função mitocondrial no sêmen pré-criopreservação (72,06 ± 1,43%) também caiu pós-criopreservação nos diluidores Botu-Bov[®] (20,80 ± 1,03%) e Bioxcell[®] (11,19 ± 0,90%), sendo melhor preservado com Botu-Bov[®]. Conclusão, a criopreservação do sêmen causa grande quantidade de injúrias às membranas espermáticas, as quais são menos pronunciadas quando o sêmen é criopreservado com o diluidor Botu-Bov[®] do que com Bioxcell[®]. **Agradecimentos:** à FAPESP, processos n. 00/14653-6 e 01/13940-4. Ao Prof. Dr. Frederico Ozanan Papa (UNESP-Botucatu) e à IVP-Brasil que gentilmente nos cederam os diluidores.

EFEITOS DA CRIOPRESERVAÇÃO E DO DILUIDOR SOBRE A MOTILIDADE DO SÊMEN BOVINO

Celeghini, E.C.C.¹; Andrade, A.F.C.¹; Nascimento, J.¹; Raphael, C.F.¹;
Rodrigues, P.H.M.², Arruda, R.P.¹

¹Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal - VRA/FMVZ/USP ²Departamento de Nutrição e Produção Animal - FMVZ/USP; 13630-090, Pirassununga-SP, Brasil. arrudarp@usp.br

As injúrias causadas durante a criopreservação do sêmen são devido às alterações na temperatura e na osmolaridade do meio, as quais afetam diretamente a motilidade espermática, visto ser esta característica crucial para o transporte espermático no trato reprodutivo feminino, pode, dessa forma, interferir na taxa de fertilidade. O uso de sistemas computadorizados da avaliação espermática (CASA), tem servido como ferramenta mais objetiva para avaliar as alterações dos movimentos espermáticos. Este experimento foi elaborado com o objetivo de avaliar os efeitos da criopreservação e de dois diluidores sobre a motilidade espermática em sêmen bovino. Foram realizadas sete colheitas de sêmen de oito touros da raça Simental. Após a colheita, o sêmen foi avaliado quanto a motilidade espermática avaliada subjetivamente, por estimativa visual e objetivamente por CASA. No CASA, os parâmetros avaliados foram: motilidade total (%), motilidade progressiva (%), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), frequência de batimento flagelar (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %). Após as análises, o sêmen foi dividido em duas alíquotas, sendo uma diluída com o diluidor Bioxcell[®] (IMV Technologies, IVP do Brasil) e a outra com Botu-Bov[®] (Biotech-Botucatu-Ltda/ME, Brasil), envasado em palhetas (50×10^6 espermatozoides/palheta) e submetido a congelamento com um aparelho automatizado (TK-3000, TK Tecnologia em Congelamento Ltda., Uberaba, Brasil). Duas palhetas de cada tratamento foram descongeladas e o sêmen foi novamente avaliado quanto às mesmas características de motilidade avaliadas pré-criopreservação. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 1985), os dados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey. Os percentuais de motilidade subjetiva ($73,13 \pm 0,60\%$) e os parâmetros de motilidade avaliados por CASA, como motilidade total ($79,98 \pm 1,36\%$), motilidade progressiva ($60,38 \pm 1,98\%$), VAP ($137,57 \pm 1,87\mu\text{m/s}$), VSL ($121,12 \pm 1,74\mu\text{m/s}$) e VCL ($193,97 \pm 2,30\mu\text{m/s}$) foram maiores para sêmen pré-criopreservação do que pós-criopreservado com ambos os diluidores. A criopreservação do sêmen com Botu-Bov[®] preservou melhor motilidade subjetiva ($38,57 \pm 1,66$ x $25,09 \pm 1,31\%$), motilidade total ($40,13 \pm 1,92$ x $24,18 \pm 1,44\%$) e motilidade progressiva ($20,86 \pm 1,46$ x $10,71 \pm 0,98\%$) do que Bioxcell[®]. Enquanto, Bioxcell[®] manteve mais altas as VAP ($92,45 \pm 2,63$ x $80,35 \pm 1,37\mu\text{m/s}$), VSL ($81,57 \pm 2,39$ x $73,17 \pm 1,30\mu\text{m/s}$) e VCL ($145,24 \pm 4,11$ x $113,81 \pm 2,06\mu\text{m/s}$) do que Botu-Bov[®]. O valor de BCF do sêmen pré-criopreservação ($36,22 \pm 0,44\text{Hz}$) diminuiu quando comparado com sêmen criopreservado com Bioxcell[®] ($33,95 \pm 0,48\text{Hz}$); entretanto, aumentou quando o sêmen foi criopreservado com Botu-Bov[®] ($38,48 \pm 0,53\text{Hz}$). A STR foi maior no sêmen criopreservado com Botu-Bov[®] ($90,38 \pm 0,38\%$) do que com Bioxcell[®] ($87,98 \pm 0,43\%$) ou pré-criopreservação ($86,96 \pm 0,40\%$). A LIN foi menor no sêmen criopreservado com Bioxcell[®] ($58,64 \pm 0,76\%$) do que com Botu-Bov[®] ($66,07 \pm 0,78\%$) ou pré-criopreservação ($64,24 \pm 0,69\%$). Em conclusão, a criopreservação do sêmen promove queda da motilidade espermática e o uso de diluidores com constituintes diferentes afeta distintamente o percentual de motilidade e a velocidade espermática em sêmen bovino.

Agradecimentos: à FAPESP, processos n. 00/14653-6 e 01/13940-4. Ao Prof. Dr. Frederico Ozanan Papa (UNESP-Botucatu) e à IVP-Brasil que gentilmente nos cederam os diluidores.

EFEITOS DA CRIOPRESERVAÇÃO USANDO DIFERENTES TÉCNICAS DE CONGELAÇÃO E CRIOPROTETORES SOBRE AS MEMBRANAS PLASMÁTICA, ACROSSOMAL E MITOCONDRIAL DO ESPERMATOZÓIDE BOVINO

Arruda, R.P.¹; Forero-Gonzalez, R.A.¹; Celeghini, E.C.C.¹; Raphael, C.F.¹

¹Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal – VRA / FMVZ / USP, Pirassununga-SP, 13630-900, Brasil. arrudarp@usp.br

Durante a criopreservação os espermatozóides passam por muitas mudanças físico-químicas, levando a lesões de diversos graus em sua estrutura. Dentre os fatores que influenciam no resultado da congelação, a curva de resfriamento e o tipo de crioprotetor utilizado merecem atenção. Este experimento foi realizado para comparar os efeitos da criopreservação do sêmen bovino utilizando duas técnicas de congelação (“convencional” e automatizada), com diferentes curvas, além do uso de três crioprotetores (glicerol, etilenoglicol e dimetilformamida) sobre a motilidade e integridade das membranas espermáticas (plasmática, acrossomal e mitocondrial). Foram realizadas seis colheitas em cinco touros da raça Simental. Após a colheita (Eletrogen[®], Santa Lydia, Presidente Prudente, Brasil) o sêmen foi avaliado quanto a motilidade e concentração, então diluído em tris-gema, preparado previamente com os seguintes crioprotetores: glicerol (7%), etilenoglicol (7%) ou dimetilformamida (3%). A metade das doses foi congelada pela técnica convencional (TC), as palhetas foram colocadas na posição horizontal em um suporte e este em uma caixa de isopor de 15 litros contendo seis quilogramas de gelo, por 90 minutos (curva de resfriamento, -0,55°C/min), quando então o suporte foi transferido para outra caixa de isopor, permanecendo as palhetas em vapor de nitrogênio (3 cm acima do nitrogênio líquido), por 15 minutos (curva de congelação, -19,1°C/min). A outra metade das palhetas foi criopreservada pela técnica automatizada (TA), utilizando-se um aparelho programável (TK3000- TK Tecnologia em Congelação Ltda., Uberaba, Brasil), onde as palhetas foram congeladas na posição vertical, com curvas fixas de resfriamento (-0,23°C/min) e congelação (-15,5°C/min). Após a congelação as palhetas foram imersas no nitrogênio líquido (-196°C) e armazenadas em botijões criogênicos, até serem descongeladas a 37°C por 30 segundos. Posteriormente foram feitas avaliações da motilidade por microscopia óptica e da integridade das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial utilizando-se iodeto de propídio (PI), aglutinina de *Pisum sativum* conjugada a fluoresceína (FITC-PSA) e MitoTracker Green FM (MITO), respectivamente, por microscopia de epifluorescência. Foram analisados os efeitos de técnicas de congelação e dos diferentes crioprotetores sobre a motilidade, integridade de membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial mediante análises de variância (ANOVA), empregando-se o programa Stat-View[®] (SAS Institute, Cary, USA). As médias foram comparadas pelo teste de *Fisher*. Não houve diferenças significativas entre as técnicas e nem interação entre crioprotetor e técnica de congelação ($P>0,05$). Houve diferença entre os crioprotetores ($P<0,05$). As porcentagens médias da motilidade com o glicerol foram 30,67±1,41 na TC e 30,50±1,06% na TA, o etilenoglicol 21,17±1,66 na TC e 21,67±1,13% na TA, e a dimetilformamida 8,33±0,65 na TC e 9,17±0,72% na TA. A porcentagem de espermatozóides com membrana plasmática e acrossomal intactas e com função mitocondrial para o glicerol foi 15,58±1,51 na TC e 16,68±1,31% na TA, o etilenoglicol 9,70±1,36 na TC e 10,38±1,30% na TA, e a dimetilformamida 5,33±1,09 na TC e 5,57±0,88% na TA. Assim, neste experimento o glicerol foi o melhor crioprotetor, porém aproximadamente 85% dos espermatozóides apresentaram algum grau de lesão em suas membranas, evidenciando a necessidade de pesquisas para melhoria nos resultados da criopreservação do sêmen bovino.

Agradecimento: à FAPESP, processo n° 01/13940-4.

RESUMOS
Seção de Posters B

AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE IGF-I EM FOLÍCULOS DE VACAS NELORE

Melo, D.S.¹; Leal, L.S.¹; Gioso, M.M.¹; Costa, I.B.¹; Machado, M.S.¹;
Assaf, S.S.¹; Fernandes, C.B.¹; Oba, E.¹

¹Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ/UNESP, Botucatu-SP,
18618-000, Brasil. danilassal@yahoo.com.br

A produção *in vitro* de embriões (PIV) bovinos é uma biotécnica da reprodução que vem sendo muito estudada para a rápida multiplicação e melhoramento genético do rebanho brasileiro. O crescimento do oócito dentro do folículo ovariano é determinado por grande número de fatores que influenciam sua viabilidade e competência para o desenvolvimento *in vitro*. Estes fatores incluem: tamanho folicular, dia do ciclo estral, nível de atresia e influência do folículo dominante. Na OPU os oócitos colhidos para a produção *in vitro* são obtidos de folículos em diferentes etapas do desenvolvimento e em fases distintas do ciclo estral sendo expostos a diferentes concentrações de estradiol, progesterona, LH e FSH e fatores de crescimento que poderiam afetar a competência oocitária para o desenvolvimento de embriões *in vitro*. Vários fatores de crescimento (IGF-I, IGF-II, EGF, TGF α , TGF β e outros) tem sido estudados nos processos de recrutamento, seleção e crescimento folicular assim como na maturação citoplasmática e nuclear de oócitos bovinos. O objetivo deste trabalho foi avaliar as concentrações de IGF-I (fator de crescimento semelhante à insulina) intrafolicular em folículos de vacas Nelore com diâmetro $\geq 6,5$ mm e $< 6,5$ mm visando a obtenção de informações sobre as variações desse fator de crescimento durante a fase de dominância da onda folicular. Foram colhidos ovários de 26 vacas Nelore em abatedouro e transportados em solução salina (NaCl 0,9%) a 36°C, até o laboratório de Endocrinologia do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária (RARV) da UNESP, Botucatu-SP. Os ovários foram avaliados através de ultra-sonografia (Aloka 500, 5 MHz), para determinar a presença e o tamanho do folículo dominante. Folículos $\geq 6,5$ mm foram considerados dominantes (Grupo FD), e o fluido folicular aspirados e armazenados individualmente, e os folículos subordinados do mesmo animal, $< 6,5$ mm, foram todos aspirados formando um pool de fluido folicular (Grupo FS). A concentração de IGF I foi analisada utilizando-se kits comerciais DSL-Diagnostic Systems Laboratories, Corporate Headquarters, 445 Medical Center Blvd, Webster, Texas, e quantificado por radioimunensaio Cobra II. Para a análise estatística utilizou-se a análise de variância (ANOVA), usando o programa SAEG. O Grupo FD apresentou maiores concentrações de IGF-I ($184,61 \pm 19,31$ ng/mL $P=0,009$) do que o Grupo FS. ($113,79 \pm 17,23$ ng/mL). Esses resultados indicam que depois do desvio folicular, o folículo dominante pode estar influenciando nos níveis de IGF-I dos demais folículos de vacas Nelore. As menores concentrações de IGF-I e demais fatores de crescimento, além de outras variações hormonais na fase de dominância, podem induzir a atresia e alterações na competência oocitária, conseqüentemente na quantidade e qualidade de embriões PIV. Entretanto, ambos os grupos experimentais podem conter folículos subordinados e atrésicos em proporções desconhecidas, o que influenciaria os resultados.

Apoio financeiro FAPESP

EXPRESSÃO GÊNICA DO FATOR DE CRESCIMENTO FIBROBLÁTICO 10 (FGF-10) DURANTE O DESENVOLVIMENTO LUTEAL EM BOVINOS

Giometti, I.C.¹; Castilho, A.C.S.¹; Andrade, P.B.¹; Costa, I..B.¹; Machado, M.F.¹; Price, C.A.²; Papa, P.C.³; Buratini Jr, J.¹

¹Departamento de Fisiologia, IB, UNESP-Botucatu. ²Centre de Recherche en Reproduction Animale, University of Montreal, Canada. ³Departamento de Cirurgia, FMVZ, USP.
inesgiometti@yahoo.com.br

O corpo lúteo (CL) é formado a partir da ovulação e tem como produto secretório primário a progesterona que é fundamental para o estabelecimento e manutenção da gestação. A angiogênese, proliferação e diferenciação celular são importantes para a formação do CL. Há evidências de que fatores de crescimento estejam envolvidos nesses processos, dentre eles os FGF. A expressão gênica do FGF-1, FGF-2 e FGF-7 já foi detectada no CL bovino. O FGF-10 participa de interações parácrinas entre células mesenquimais e epiteliais, regulando a proliferação e diferenciação celular. Contudo, o envolvimento do FGF-10 no controle do desenvolvimento luteal ainda não foi estudado. Sendo assim, o presente trabalho objetivou investigar a expressão do RNAm que codifica o FGF-10 no CL bovino. Para tanto, ovários obtidos em matadouro foram dissecados e 10 corpos lúteos de cada um dos quatro estágios de desenvolvimento (estágio 1 = corpo hemorrágico, estágio 2 = CL em desenvolvimento, estágio 3 = CL maduro, e estágio 4 = CL em luteólise) foram selecionados. Posteriormente, de 50 a 100mg de tecido luteal foram destinados à extração de RNA total (Trizol; Invitrogen®). A expressão do FGF-10 foi examinada por RT-PCR semiquantitativo com oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos. O RT-PCR semiquantitativo foi validado pela escolha de números de ciclos de PCR e quantidade de RNA dentro da fase linear da curva de amplificação. A intensidade das bandas foi analisada por densitometria computadorizada. A amplificação do RNAm da enzima GAPDH foi usada como controle interno no PCR e as médias comparadas pelo teste Tukey-Kramer HSD. A expressão do FGF-10 foi detectada em todos os estágios de desenvolvimento luteal, mas não diferiu entre eles. Os valores médios (FGF-10/GAPDH \pm EPM) foram $67,9 \pm 17,4$ (n=10), $72,4 \pm 15,8$ (n=10), $52,6 \pm 16,4$ (n=10) e $95,5 \pm 28,3$ (n=10) para os estágios 1, 2, 3 e 4, respectivamente. Em conclusão, os dados presentes indicam que a expressão do FGF-10 não é regulada ao longo do desenvolvimento luteal. Contudo, a presença do RNAm do FGF-10 no CL bovino é compatível com sua participação como mediador nos processos de diferenciação e proliferação celular durante o desenvolvimento luteal bovino.

Financiado pela FAPESP.

REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DO RECEPTOR DE FATOR DE CRESCIMENTO FIBROBLÁSTICO 2b (FGFR-2b) EM CÉLULAS DA GRANULOSA BOVINAS CULTIVADAS

Buratini Jr., J.¹; Castilho, A.C.S.¹; Cao, M.²; Nicola, E.S.²; Price, C.A.²

¹Departamento de Fisiologia, IB, UNESP, Botucatu, Brasil; ²Centre de Recherche en Reproduction Animale, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, St. Hyacinthe, Canada.
anthony.castilho@ig.com.br

O receptor de fator de crescimento fibroblástico 2b (FGFR-2b) é ativado eficientemente pelo FGF-7 e 10, reconhecidos como mediadores parácrinos entre células mesenquimais e epiteliais, que regulam proliferação e diferenciação celular. O FGF-7 é predominantemente expresso por células da teca (CT) e tem efeito mitogênico sobre as células da granulosa (CG). Em nosso laboratório, a expressão do FGF-10 foi detectada em oócitos e CT de folículos antrais bovinos. No ovário, o FGFR-2b é majoritariamente expresso em CG de folículos estrogênicos. Tendo em vista as mudanças na expressão do FGFR-2b durante o desenvolvimento folicular, é de interesse identificar os fatores reguladores. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do FSH e IGF-1 sobre a expressão gênica do FGFR-2b em CG bovinas cultivadas. Folículos pequenos (2-5 mm de diâmetro) foram isolados de ovários obtidos em matadouro e as CG foram colocadas em meio sem soro suplementado com insulina e FSH bovino (0; 0,1; 1; 10 ou 100ng/ml) ou análogo de IGF-1 (0; 5; 10; 50 or 100ng/ml). As células foram cultivadas por 6 dias, com troca de meio a cada 2 dias. No sexto dia, as células foram recuperadas em Trizol para extração de RNA total. A expressão do FGFR-2b foi examinada por RT-PCR semiquantitativo utilizando-se a abundância do RNAm da histona 2a (H2a) como controle interno. Os experimentos foram realizados em três “pools” independentes de células e as médias comparadas pelo teste de Tukey-Kramer HSD. A expressão do FGFR-2b (RNAm FGFR-2b/RNAm H2a) foi maior em células tratadas com 10ng/ml de FSH (28,1±2,3) do que em células tratadas com 0 ou 0,1ng/ml de FSH (5,3±1,1 e 4,3±1,1; respectivamente), enquanto que níveis intermediários foram observados em células tratadas com 1 ou 100ng/ml de FSH (15,8±2,4 e 15,8±4,4; respectivamente). Em CG tratadas com IGF-1, a expressão do FGFR-2b foi menor com 10ng/ml (2,4±0,8) do que com 0ng/ml (7,2±1,2; P<0,05), enquanto que níveis intermediários foram observados com 5, 50 ou 100ng/ml (5,7±0,6, 4,1±0,5 e 4,4±0,7; respectivamente). Os dados presentes indicam efeitos opostos do FSH e IGF-1 na regulação da expressão do FGFR-2b em CG bovinas em cultivo, corroborando a hipótese de que este receptor desempenha um papel importante durante a diferenciação e proliferação das CG de folículos antrais bovinos mediante ativação pelo FGF-7 e FGF-10.

Financiado pela FAPESP, Brasil e NSERC, Canadá.

IDENTIFICAÇÃO DE CONEXINA-37 E CONEXINA-43 EM FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS DE OVÁRIOS DE FETOS BOVINOS DA RAÇA NELORE

Basso, A.C.^{1,2}; Tetzner, T.A.D.²; Garcia, J.M.²; Esper, C.R.²

¹ Departamento de Reprodução Animal - FMVZ/USP – São Paulo-SP-Brasil

² Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal - FCAV/UNESP – Jaboticabal-SP-Brasil. acbusp@hotmail.com

Durante a foliculogênese, a manutenção das junções entre as células granulosas e o oócito é essencial para o desenvolvimento normal do folículo (NUTTINCK *et al.* Mol. Reprod. Devel. v.57, p.60-66, 2000), pois são responsáveis por carrear suprimentos e regular a entrada de proteínas específicas (GRANOT *et al.* Biol. Reprod. v.66, p.568–573, 2002). As junções tipo Gap são implicadas como as principais responsáveis por esta comunicação e, no folículo ovariano, estão diretamente relacionadas à presença de conexina 37 e conexina 43 desde a fase pré-antral (SIMON *et al.* Nature. v.385, p.525-529, 1997). O objetivo deste estudo foi identificar a presença de Cx37 e Cx43 nas regiões de junção entre as células granulosas de folículos pré-antrais de ovários de fetos bovinos. Para isso, fragmentos de tecido ovariano fetal foram fixados em Metacarn (60% álcool metílico + 30% clorofórmio + 10% ácido acético glacial) por 30 minutos e armazenado em álcool 95% para posterior inclusão em parafina. Os anticorpos Primários Policlonais utilizados foram anti conexina37 (anti-Cx37) de coelho (Alpha Diagnostic) e anti conexina43 (anti-Cx43) de rato (Zymed Laboratories). O Anticorpo Secundário foi Policlonal Conjugado a FITC (Zymed Laboratories). As lâminas avaliadas sob microscopia de fluorescência (Nikon E-800, Tóquio, Japan) possibilitaram a detecção de Cx37 e Cx43, pela primeira vez, nas regiões de membrana correspondentes às junções entre as células granulosas e o oócito em folículos pré-antrais de fetos bovinos. Concluímos por este estudo que, assim como em vacas adultas, os folículos pré-antrais oriundos de ovários de fetos bovinos também apresentam junções específicas entre as células granulosas e o oócito, compostas pelas conexinas Cx37 e Cx43, comprovando a existência de trocas precoces entre o oócito e as células foliculares ainda durante a vida fetal e indicando atividade metabólica nesta fase.

EXPRESSÃO DAS ISOFORMAS DO GENE CODIFICADOR DO RECEPTOR DE LH EM CÉLULAS DA TECA E DA GRANULOSA DE FOLÍCULOS ANTRAIS BOVINOS

Nogueira, M.F.G.^{1*}; Pinto, M.G.L.²; Rainho, C.A.³; Avellar, M.C.W.⁴; Price, C.A.⁵;
Buratini Jr., J.⁶; Barros, C.M.¹

Departamentos de ¹Farmacologia, ³Genética e ⁶Fisiologia, IB, e ²Reprodução Animal, FMVZ, UNESP, Botucatu, SP, Brasil, ⁴Departamento de Farmacologia, INFAR, UNIFESP-EPM, São Paulo, SP, Brasil, ⁵CRRA, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canadá. marcelo@femanet.com.br

O crescimento do folículo dominante, na ausência de FSH circulante, e os eventos subsequentes ao pico pré-ovulatório de LH, que culminam na ovulação, dependem da interação entre o LH e seu receptor (LHR). Quatro transcritos alternativos do LHR foram observados em células da teca e da granulosa de folículos bovinos. Apenas dois deles são traduzidos em proteínas funcionais com afinidades distintas em relação aos ligantes. Em humanos e símios, a isoforma completa (“full-length”) tem afinidade pelo LH e hCG, enquanto que a isoforma que apresenta deleção do exon 10 tem afinidade somente pelo hCG. Além disso, isoformas com deleção do exon 3 foram observadas em ratos, embora nenhum outro estudo tenha investigado essa região do gene bovino. Objetivou-se com este trabalho caracterizar o padrão da expressão do gene do LHR nas células da teca e da granulosa de folículos antrais bovinos. Ovários foram coletados em matadouro, os folículos (5-14 mm) foram dissecados e as células da teca e da granulosa separadas para extração de RNA total com Trizol. As concentrações de esteróides no fluido folicular foram determinadas por RIE. A expressão gênica do LHR foi mensurada por RT-PCR semiquantitativo com oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) específicos para amplificar o fragmento entre o final da região extracelular e o final da intracelular (LHRBC; “primers” posicionados nos exons 9 e 11). A ocorrência de transcritos alternativos oriundos do início da região extracelular (LHRA; “primers” posicionados nos exons 2 e 9) foi investigada mediante amplificação por RT-PCR. Como controle interno no PCR, utilizou-se a expressão da GAPDH. Para o fragmento LHRBC foram detectadas quatro isoformas; M1 (completa), M2 (deleção do exon 10), M3 (deleção de parte do exon 11) e M4 (deleção conjunta do exon 10 e parte do exon 11). Não foi observada correlação entre a expressão das isoformas do LHR nas células da teca e concentração de estradiol e progesterona ou diâmetro folicular. Também não houve correlação entre a concentração de estradiol e a expressão das isoformas do LHR nas células da granulosa, mas os níveis de RNAm de todas as isoformas aumentaram tanto com a concentração de progesterona como com o diâmetro folicular ($P < 0,01$). A expressão das isoformas do fragmento LHRBC foi observada em células da granulosa de folículos com diâmetros a partir de 7 mm. Apenas um folículo de 7 mm dentre 6 analisados (16,7%), apresentou expressão do LHR em células da granulosa, enquanto que a maioria das amostras de células da granulosa de folículos ≥ 8 mm apresentaram expressão do LHR (87,5%; 21/24). Não foram observadas quaisquer isoformas do LHR para as amostras de células da granulosa oriundas de folículos com 5 e 6 mm de diâmetro ($n=7$). Foi observada a expressão de um transcrito alternativo com a deleção do exon 3 nos amplicons resultantes da amplificação do segmento LHRA. Conclui-se que, em células da granulosa de folículos com diâmetro ≥ 8 mm, a expressão gênica do LHR aumentou com o diâmetro folicular e a concentração de progesterona no fluido folicular. Além disso, foram detectados sítios de “splicing” alternativo nos exons 3, 10 e 11 do gene do LHR bovino.

*Bolsista da FAPESP.

DETECÇÃO DA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE ENDOTELIAL (eNOS) EM OVÁRIOS BOVINOS

Natori, M.M.¹; Santos, N.P.¹; Adona, P.R.^{1,2}; Pires, P.R.L.¹; Caldas-Bussiere, M.C.²; Leal, C.L.V.¹

¹Departamento de Ciências Básicas – FZEA / USP – Pirassununga-SP, ²Laboratório de Reprodução Animal – LMGA/CCTA/UENF – Campos dos Goytacazes-RJ, mmnatori@ig.com.br

O óxido nítrico é uma molécula gasosa volátil produzida pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), a qual é expressa em 3 isoformas: neuronal (nNOS), induzível (iNOS) e endotelial (eNOS). Estudos vêm demonstrando que este gás participa de várias funções celulares, dentre estas, algumas relacionadas à reprodução, como ovulação, maturação de oócitos e fecundação (Thaler e Epel, Curr Pharm Design, v.9, p.399-409, 2003). O objetivo deste trabalho foi de determinar a presença da isoforma eNOS em tecido ovariano e oócitos bovinos imaturos e maturados *in vitro*, por imunohistoquímica e imunofluorescência, respectivamente. Para o primeiro procedimento (3 repetições), os ovários foram fixados em solução Metacarn (60% de metanol, 30% de clorofórmio, 10% de ácido acético), emblocados em parafina e cortados a 5 µm. Os cortes passaram por bloqueio de peroxidase endógena (3% H₂O₂, em PBS) por 30 min, bloqueio de ligação inespecífica (20% de soro de cabra em 0,01 M PBS) por 1 hora e, a seguir, incubados com anticorpo anti-eNOS (1:100 em PBS + BSA 1%) a 4°C *overnight*. Adicionou-se então o anticorpo secundário (1:400 em PBS + BSA 1%) por 1 hora. A seguir, foram submetidos ao complexo avidina-biotina e peroxidase (1:150 em PBS + BSA 1%) por 1 hora e em 0,05% DAB + 0,03% H₂O₂ em PBS por 13 minutos. Por fim, foram corados com hematoxilina para visualização dos núcleos. Para o segundo procedimento (4 repetições), ovários oriundos de abatedouros foram aspirados e os oócitos foram maturados *in vitro*, por 24 horas (TCM-199 com SFB 10%, hormônios e antibiótico) ou avaliados ainda imaturos (após a aspiração). Os dois grupos de oócitos foram desnudados e fixados (3,7% de paraformaldeído e 0,6% de Triton X-100 em PBS por 1 hora). A seguir, foram bloqueados em soro de cabra a 3% por 45 minutos e depois incubados com o anticorpo anti-eNOS (1:100) até o dia seguinte. Posteriormente, foram incubados com anticorpo secundário conjugado com FITC (1:100) por uma hora, corados com iodeto de propídio (10 µ/ml por 15 min) e avaliados sob microscópio de epifluorescência. Na imunohistoquímica foram avaliadas seis lâminas, todas com marcação positiva em oócitos de folículos primordiais a terciários e no endotélio vascular. Como controles (sem anticorpo primário) foram ainda avaliadas três lâminas nas quais não houve marcação. Na imunofluorescência, todos os oócitos maturados (38) e imaturos (35) apresentaram o citoplasma corado. Nenhum dos oócitos controle (incubados em PBS sem anticorpo primário, sendo 19 maturados e 13 imaturos) apresentou fluorescência. Conclui-se que a eNOS está presente no tecido ovariano bovino e que ela é detectada desde o início da foliculogênese até o final da maturação. Essa é a primeira descrição da detecção da eNOS em tecido ovariano bovino.

Apoio financeiro Fapesp 04/11733-0 (AR) e PIBIC-CNPq (MMN)

EFEITO DO ÓXIDO NÍTRICO NAS CÉLULAS DA GRANULOSA DE FOLÍCULOS ANTRAIS DE VACAS ZEBUÍNAS

Faes, M.R.¹; Caldas-Bussiere, M.C.¹; Moreira, L.¹; Carvalho, C.S.P.¹

¹Setor de Reprodução Animal, LMGA, CCTA, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Av. Alberto Lamego, 2000, Parque Califórnia, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil, Cep: 28013-602, marrfaes@uenf.br

A apoptose é um processo de deleção celular seletiva, considerado como um mecanismo básico da atresia folicular ovariana. O principal tipo celular acometido por este processo no folículo é a célula da granulosa (CG). O óxido nítrico (NO) é um radical livre sintetizado a partir da L-arginina e do O₂ molecular pela enzima óxido nítrico sintase. Vários estudos vêm demonstrando sua participação na foliculogênese, esteroidogênese e atresia folicular. O presente estudo teve como objetivos verificar se a síntese de NO pelas CGs varia em função do tamanho do folículo e tempo de cultivo e o efeito dose resposta do NO ao longo de 24 h na apoptose das células da granulosa. O nitroprusside de sódio (SNP) foi usado na cultura com um doador de NO. Ovários foram obtidos em abatedouro local. Os folículos de tamanhos pequenos (<5 mm), médios (5-8 mm) e grande (>8 mm) foram puncionados para obtenção das CGs antrais. As CGs foram semeadas (5x10⁶) em placas de 24 poços contendo 1 ml de meio α MEM/Ham's F12, suplementado com androstenediona (10⁻⁷M); penicilina (100U/ml), sulfato de estreptomicina (100ug/ml), PVA (0,1%), 1% ITS (5ng/ml de selenito de sódio; 5,5 ng/ml de transferrina, insulina 5,5ng/ml e 1% de solução MEM aminoácidos não essenciais 100x. O FSH foi adicionado ao meio cultivo de acordo com o tamanho do folículo original na concentração de 2 ng/ml (< 5 mm) e 1 ng/ml (5-8 e > 8 mm). As CGs foram incubadas a 38,5°C. Após 48 h de cultura, 70% do meio foi substituído por meio sem (controle) e com SNP (10⁻⁷, 10⁻⁵, 10⁻³, M). Após 24 horas do tratamento, o meio e as CGs foram colhidos para as dosagens de nitrito (NO₂⁻) por reação de Greiss e eletroforese do DNA em agarose gel para avaliação da apoptose, respectivamente. A síntese de NO₂⁻ pelas CGs não diferiu (P>0,05) entre os tamanhos de folículo no mesmo período de tempo de cultivo. Entretanto, a concentração NO₂⁻ aumentou (P<0,05) com o tempo de cultura em todos os grupos de folículos. O NO₂⁻ foi mais elevado no meio de cultura de todos os grupos tratados com 10⁻³ M de SNP em relação aos demais grupos (10⁻⁷, 10⁻⁵ M e controle). No entanto, apesar do NO₂⁻ estar aumentado no meio de cultura, a fragmentação do DNA das CGs não foi observada. Estes resultados sugerem que: 1) a concentração de NO no meio de cultura não variou de acordo com o tamanho do folículo, mas com o tempo de cultura; 2) o NO em concentração alta no meio não induziu a apoptose das CGs em 24 h de cultura. Concentrações mais elevadas devem ser testadas e em um tempo de cultura maior para se verificar se o óxido nítrico pode estar envolvido na apoptose das células da granulosa de folículos ovarianos de bovinos.

Apoio financeiro: CAPES/FAPERJ/FINEP

ANÁLISE QUANTITATIVA E MORFOMÉTRICA DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIOS DE FETOS BUBALINOS: RESULTADOS PRELIMINARES

Santos, S.D.S.¹; Carvalho, A.C.^{1*}; Ferreira, M.A.P.¹; Silva, M.S.¹; Silva, E.S.^{2*}; Cordeiro, M.S.²; Biondi, F.C.²; Ohashi, O.M.²

¹ Departamento de Histologia e Embriologia - CCB/UFPA, Belém-PA, Brasil; ² Laboratório de Fertilização *in vitro* - CCB/UFPA, Belém-PA, Brasil; * Bolsista PIBIC - UFPA / PIBIC - CNPq damasc@ufpa.br

Folículos pré-antrais são a maior fonte de oócitos e sua utilização como uma importante ferramenta para estocar um grande número de gametas femininos, para uso futuro em programas de reprodução, tem sido investigada. A foliculogênese em bubalinos é pouco conhecida, existindo somente trabalhos sobre seu início durante a vida fetal e sobre a população folicular em fêmeas adultas, com nenhum relato sobre a quantificação e a morfometria durante a fase pré-natal. O presente trabalho objetivou realizar estudos quantitativos e morfométricos de folículos pré-antrais de fetos bubalinos. Oito ovários de fetos bubalinos de 5 e 6 meses de idade, determinada segundo ABDEL-RAOUF & EL-NAGGAR (UAR J. Vet. Sci., 5, 37-43, 1968), foram coletados em abatedouro e fixados em solução de Bouin para processamento histológico de rotina. A quantificação folicular foi feita segundo GOUGEON & CHAINY (J. Reprod. Fertil., 81, 433-442, 1987) e para determinar o diâmetro oocitário e folicular utilizou-se uma ocular micrométrica Zeiss acoplada ao microscópio de luz (OLYMPUS CHC20). A análise preliminar dos dados mostrou uma população de 48.612,42 ($\pm 17.301,96$), 25.071,25 ($\pm 10.578,32$) e 724,85 ($\pm 375,54$) folículos primordiais, primários e secundários por ovário, respectivamente. Os diâmetros folicular, oocitário e o número de células foliculares foram respectivamente de 28,9 $\pm 3,4$ μm , 21,66 $\pm 2,81$ μm e 7,12 $\pm 1,4$ (Folículos primordiais); 34,68 $\pm 5,89$ μm , 24,3 $\pm 3,43$ μm e 11,97 $\pm 2,44$ (Folículos primários) e 59,38 $\pm 12,6$ μm , 33,0 $\pm 7,66$ μm e 13,76 $\pm 2,43$ (Folículos secundários). Observou-se que entre 5 e 6 meses a foliculogênese já está estabelecida, com a presença de folículos primordiais, primários e secundários.

CRIOPRESERVAÇÃO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS BOVINOS

Celestino, J.J.H.; Santos, R.R.; Matos, M.H.T.; Martins, F.S.; Costa, S.H.F.; Silva, J.R.V.;
Rodrigues, A.P.R.; Figueiredo, J.R.

Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Ovarianos Pré-Antrais – LAMOFOPA – FAVET
- UECE, Fortaleza-CE, 60740-000, Brasil. htmatos@yahoo.com

Este estudo avaliou a viabilidade de folículos pré-antrais (FOPA) bovinos criopreservados com ou sem prévia conservação dos fragmentos ovarianos por 24 h a 4 °C em solução salina 0,9%. Cada par ovariano bovino foi dividido em 39 fragmentos. Um fragmento foi imediatamente fixado após coleta e os demais transportados a 4 ou 20 °C em solução salina 0,9%. No laboratório, um dos fragmentos transportados a 20 °C foi destinado ao isolamento folicular e submetido à análise com Azul de Trypan, e os demais fragmentos submetidos ao teste de toxicidade (TT) ou congelação em Glicerol (GLI), Propanodiol (PRO), Etilenoglicol (EG) ou DMSO nas concentrações de 0, 1,5 e 3,0 M. Os fragmentos transportados a 4 °C foram mantidos a essa temperatura por 24 h e, em seguida, um fragmento foi submetido ao isolamento folicular e os demais aos procedimentos de TT e congelação como supracitado. Após o término de cada tratamento, os fragmentos foram destinados ao isolamento folicular, e as suspensões foliculares avaliadas com Azul de Trypan. Os FOPA foram classificados em viáveis (não corados) ou não viáveis (corados). O percentual de FOPA viáveis foi comparado utilizando o teste Qui-quadrado com $P < 0,05$. Não foi observada redução significativa na percentagem de FOPA viáveis após transporte a 4 (80%) ou 20 °C (78%) quando comparado ao controle (85%). Resultados similares foram observados quando os FOPA foram expostos a meio sem crioprotetor ou expostos a EG 1,5 M sem prévio resfriamento a 4 °C. Após congelação, as maiores taxas de FOPAs viáveis foram obtidas quando os fragmentos ovarianos foram congelados na presença de EG 1,5M com (77%) e sem (74%) prévio resfriamento ou DMSO 1,5 M sem prévio resfriamento a 4 °C (76%). Em conclusão, o procedimento de resfriamento não afeta a congelação negativamente, desde que os fragmentos ovarianos bovinos sejam criopreservados na presença de EG 1,5 M.

VIABILIDADE DE FOLÍCULOS PRIMORDIAIS OVINOS INCLUSOS EM CORTEX OVARIANO APÓS CRIOPRESERVAÇÃO E CULTIVO *IN VITRO*

Tsuribe, P.M.; Landim-Alvarenga, F.C.

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ/UNESP, Botucatu-SP, 18618-000, Brasil. pmtsuribe@ig.com.br

Os avanços no tratamento de câncer por quimioterapia e radioterapia fizeram melhorar consideravelmente a sobrevivência de pacientes jovens portadoras de câncer. No entanto, estes tratamentos têm efeitos altamente deletérios sobre os ovários causando uma redução severa na fertilidade. A congelação de fragmentos do córtex ovariano antes (teste de toxicidade) de realizar o tratamento seria uma alternativa para preservação da fecundidade. A criopreservação do tecido ovariano poderia ser aplicada em associação ao transplante do córtex ovariano para restaurar a produção cíclica de óvulos ou, em associação ao cultivo e maturação *in vitro* de folículos primordiais do tecido congelado para a obtenção de ovócitos maduros para a fertilização *in vitro* (FIV). Poucos são os estudos que comparam a utilização de diferentes crioprotetores (DMSO, EG, PROH e GLI) e seus efeitos tóxicos sobre o tecido ovariano. O objetivo principal deste experimento foi comparar os efeitos dos crioprotetores DMSO, EG e associação destes sobre os folículos pré-antrais de ovino antes e após a congelação. Foram utilizados 50 ovários de ovelhas de 12 a 24 meses de idade. A viabilidade folicular foi analisada através da coloração com Hoescht 33342 e iodeto de propídio (IP), logo após o isolamento, após o teste de toxicidade e criopreservação, bem como ao final do período de cultivo. Após o isolamento (mecânico) dos folículos pré-antrais (controle), o número de folículos viáveis foi de 78,9%. A percentagem de folículos viáveis no teste de toxicidade usando EG (1,5M), DMSO (1,5M) e EG+DMSO (1,5M) foi de 77,1%, 68,4% e 60,7% respectivamente. A criopreservação também reduziu a viabilidade dos folículos, sendo 75% para EG, 60% para DMSO e 55,6% para EG+DMSO. O número médio de folículos pré-antrais isolados após a criopreservação em todos os tratamentos ($13,3 \pm 5$ para EG; $10,1 \pm 6$ para DMSO e $5,9 \pm 4$ para EG/DMSO) foi inferior ao tecido a fresco ($23,2 \pm 8$). Nos primeiros dias de cultivo, foi observado que os folículos mudaram a sua aparência mas permaneciam translúcidos. As células da granulosa originária da superfície dos folículos se proliferaram, aderidas a placa, formando uma monocamada ao redor do folículo. Por volta do 10º dia, a estrutura folicular inicial foi perdida e os folículos apresentaram um crescimento bidimensional. No dia zero, não foi observada diferença morfológica identificável entre folículos isolados de tecido a fresco, submetidos à ação dos crioprotetores e congelados-descongelados com EG e DMSO. No entanto, os folículos criopreservados em EG+DMSO apresentaram sinais de degeneração. No grupo controle, bem como naquele submetido à ação do EG, a viabilidade folicular, no 1º dia de cultivo, foi similar (66,4% para controle e 62% para EG), mas inferior ao D0 controle (78,9%). Após 6 e 10 dias de cultivo houve uma diminuição na porcentagem de folículos considerados viáveis em todos os grupos. No caso dos folículos submetidos à ação dos crioprotetores DMSO e EG+DMSO, bem como os criopreservados a viabilidade folicular foi reduzida significativamente quando comparada ao grupo controle. No sistema de cultivo utilizado, houve crescimento dos folículos *in vitro* em todos os grupos estudados. Entretanto, o cultivo *in vitro* depreciou a qualidade dos folículos em todos os grupos. O tratamento com EG ofereceu resultados mais próximos aos obtidos com o grupo controle.

Agradecimento: FAPESP

CARACTERIZAÇÃO ULTRA-ESTRUTURAL DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS DE BUBALINOS (*Bubalus bubalis*)

Mondadori, R.G.^{1,2}; Luque, M.C.A.¹; Santin, T.R.²; Bão, S.N.¹

¹Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, DF 70910-900 ²Laboratório de Reprodução Animal, Departamento de Medicina Veterinária, UPIS – Faculdades Integradas, SEPS EQ 712/912, Conjunto A, Brasília – DF, 70390-125. mondadori@upis.br

O objetivo do presente trabalho foi caracterizar a ultra-estrutura de folículos pré-antrais (FOPAs) de bubalinos. Essa caracterização é importante para fornecer informações, visando embasar estudos que permitam otimizar a utilização da genética das fêmeas bubalinas. Após seleção sob estereomicroscópio, porções do córtex ovariano de búfalas em idade reprodutiva foram processadas para microscopia óptica e eletrônica de transmissão. Os fragmentos de tecido ovariano foram fixados em solução de 2% de glutaraldeído e 2% de paraformaldeído em tampão cacodilato de sódio 0.1 M a 4°C por 24 horas. Após foram pós-fixados em tetróxido de ósmio e contrastados in block com acetato de uranila, sendo então desidratados por uma série crescente de acetona e incluídos em Spurr. Cortes semi-finos (3µm) foram corados com azul de toluidina e observados ao microscópio óptico para localização da região nuclear do oócito. Os cortes ultra-finos (70nm) foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e observados ao microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1011. Folículos primordiais caracterizam-se por um oócito circundado por uma camada de células da granulosa pavimentosas. O oócito dos folículos primordiais tem um diâmetro médio de 24,87 µm e o folículo mede 35,02 µm. Na análise ultra-estrutural, o núcleo do oócito é relativamente grande e excêntrico; no citoplasma é observada em abundância mitocôndrias, vesículas e cisternas de retículo endoplasmático, principalmente liso. As células foliculares apresentam diversas invaginações na membrana plasmática, as quais ocorrem entre si e com o oócito; ainda observa-se o início de deposição da zona pelúcida, com a formação de lacunas entre as células da granulosa e o oócito. Nos folículos primários, o oócito, com aproximadamente 26,91 µm de diâmetro, é rodeado por uma camada de células da granulosa cubóides, sendo que o folículo mede 41,80 µm. Nessas estruturas pode ser observado um maior acúmulo de glicoproteínas na zona pelúcida, além do aparecimento de junções de adesão entre o oócito e células da granulosa. Os folículos secundários, os quais são rodeados por mais de uma camada de células da granulosa cubóides, medem 53,35 µm, com o oócito medindo 29,38 µm. Na análise ultra-estrutural observa-se uma grande quantidade de vesículas, as quais se concentram e coalescem na região periférica do citoplasma. A zona pelúcida se apresenta bastante espessada, com grande acúmulo de glicoproteínas. A ultra-estrutura dos FOPAs bubalinos é semelhante ao de bovinos com exceção da grande quantidade de vesículas que estão presentes no citoplasma do oócito desde o início do desenvolvimento folicular. Ainda, oócitos e FOPAs de bubalino apresentam diâmetros inferiores aos de bovinos, principalmente em folículos primários e secundários (Meirelles, *et al.* Anim. Rep. Sci. 87: 45-57, 2005).

Suporte Financeiro: CNPq, FINEP, FINATEC

ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIOS OVINOS CULTIVADOS NA PRESENÇA DE ÁCIDO-INDOL-ACÉTICO, EGF E FSH

Andrade, E.R.¹; Landim-Alvarenga, F.C.²; Blaschi, W.³; Alfieri, A.A.³; Seneda, M.M.³; Figueiredo, J.R.¹; Toniolli, R.¹

¹ Faculdade de Medicina Veterinária, PPGCV, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza-CE, 60740-000, Brasil. ² Universidade Estadual Paulista - UNESP, FMVZ, Botucatu-SP, 18618-000, Brasil. ³ Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, 86051-990, Brasil.
wblaschi@hotmail.com

O objetivo deste trabalho foi determinar as características ultraestruturais de folículos pré-antrais ovinos cultivados na presença de ácido-indol-acético (IAA), fator de crescimento epidermal (EGF) e Hormônio folículo estimulante (FSH). O córtex ovariano foi dividido em pequenos fragmentos que foram cultivados individualmente em placas de cultivo contendo: Meio Essencial Mínimo (MEM) suplementado com ITS (insulina-transferrina-selênio), piruvato, glutamina, hipoxantina, albumina sérica bovina e antibióticos (MEM+); MEM+ acrescido de IAA (40 ng/mL); MEM+ acrescido de IAA+EGF (100 ng/mL) ou MEM+ acrescido de EGF+FSH (100 ng/mL). Depois de 6 d de cultivo, a análise ultraestrutural foi realizada em folículos pré-antrais de todos os tratamentos. Foram avaliados somente folículos classificados como morfológicamente normais nos cortes semi-finos. Resumidamente, fragmentos de córtex ovariano foram fixados em uma solução de glutaraldeído (2,5%) em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) e pós-fixados em tetróxido de ósmio (1%) no mesmo tampão. Subseqüentemente, as amostras foram desidratadas em séries crescentes de acetona e embebidas em resina Epon. Cortes semi-finos (3 mm) foram corados com azul de toluidina. Os cortes ultra-finos (80 nm) foram obtidos com navalha de diamante, montados em grades de cobre, contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinados ao microscópio eletrônico de transmissão (Philips CM100). Folículos pré-antrais cultivados em MEM com IAA+EGF ou EGF+FSH exibiram um oócito saudável circundado por uma ou mais camadas de células da granulosa bem organizadas. O ooplasma continha numerosas mitocôndrias arredondadas ou alongadas apresentando cristas pouco desenvolvidas. Em alguns casos foram observadas mitocôndrias em forma de alteres indicando a multiplicação destas organelas. Complexos de Golgi eram raros, mas bem desenvolvidos. Foi observado retículo endoplasmático liso e rugoso, em agregações isoladas ou associações complexas com mitocôndrias e vesículas. Um número variável de vesículas espalhadas pelo ooplasma também foi notado. Foram visíveis algumas microvilosidades na membrana do oócito e, ocasionalmente, pequenas quantias de material da zona pelúcida. Em todos estágios de desenvolvimento uma grossa camada de glicoproteínas, a membrana basal, envolvia os folículos pré-antrais. As células da granulosa eram pequenas, com alto índice núcleo:citoplasma. Estas células apresentavam muitas mitocôndrias alongadas, retículo endoplasmático liso e rugoso e Complexo de Golgi, além de algumas vesículas elétron-densas. Em conclusão, folículos pré-antrais ovinos cultivados em meio adicionado de IAA e EGF ou EGF e FSH podem manter a viabilidade por até 6 d.

EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ÁCIDO 3-INDOL-ACÉTICO NO CULTIVO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS BOVINOS: RESULTADOS PRELIMINARES

Blaschi, W.¹; Andrade, E.R.²; Delboni, M.I.¹; Boselli, C.C.¹; Bracarense, A.P.F.R.L.¹; Alfieri, A.A.¹; Figueiredo, J.R.²; Seneda, M.M.¹

¹ Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, 86051-990, Brasil.

² Faculdade de Medicina Veterinária, PPGCV, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza-CE, 60740-000, Brasil. wblaschi@hotmail.com

O objetivo deste trabalho foi avaliar a ativação e crescimento de folículos pré-antrais bovinos após o cultivo *in vitro* do córtex ovariano em diferentes concentrações de ácido 3-indol acético (IAA). Um par de ovários de uma novilha Nelore foi obtido em abatedouro, a 15 minutos de deslocamento até o laboratório. Os ovários foram lavados em álcool 70%, solução salina 0,9% e transportados imediatamente para o laboratório em solução fisiológica suplementada com penicilina (200 UI/mL) e estreptomicina (200 mg/mL) a 39 °C. O córtex ovariano foi dividido em fragmentos de aproximadamente 5 x 5 mm (1 mm espessura). Um fragmento foi fixado em Carnoy (controle – dia 0) e os demais foram cultivados por dois ou seis dias em Meio Essencial Mínimo (MEM) suplementado com ITS (insulina – transferrina – selênio), piruvato, glutamina, hipoxantina, albumina sérica bovina e antibióticos (MEM+) ou em MEM+ acrescido de 10, 40, 100, 500 ou 1000 ng/mL de IAA. Após dois ou seis dias de cultivo em cada tratamento, os fragmentos ovarianos foram fixados em Carnoy, desidratados em etanol, diafanizados em xilol e incubados em parafina. Para cada fragmento de córtex, sessões teciduais de 5 µm foram montadas em lâminas e coradas pelo método hematoxilina-eosina. Os folículos foram classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento como primordiais ou em crescimento (primários e secundários). Foram avaliados 30 folículos por tratamento após 2 ou 6 dias de cultivo. Os resultados mostraram que houve uma redução de folículos primordiais (25% - 3/12) e aumento de folículos em desenvolvimento (75% - 8/12) para o tratamento suplementado com 40 ng/mL de IAA após dois dias de cultivo indicando a ocorrência de ativação folicular. Resultado semelhante foi observado para o MEM+ suplementado de 10 ng/mL de IAA após 6 dias de cultivo. Quando o meio de cultivo foi suplementado com 1000 ng/mL de IAA após 2 ou 6 dias de cultivo, observou-se respectivamente que 80% (24/30) e 86.7% (26/30) dos folículos pré-antrais apresentaram algum grau de degeneração. Ressaltamos que o tratamento controle (dia 0) apresentou 30% (9/30) de folículos pré-antrais morfolologicamente normais, sendo que, 55.5% (5/9) foram classificados como primordiais e 44.5% (4/9) como folículos em crescimento. Observamos que folículos primordiais bovinos podem ser ativados *in vitro* após o cultivo em MEM+ suplementado com 40 ng/mL de IAA após 2 dias ou 10 ng/mL de IAA após 6 dias, e altas concentrações de IAA podem ser prejudiciais a estes folículos. Ressaltamos o fato destes resultados serem preliminares e uma melhor análise será possível com a continuidade dos trabalhos.

CONTAMINAÇÃO EM CULTIVO DE EMBRIÕES COM O USO DE SÊMEN COMERCIAL: RELATO DE CASO

D'Angelo, M.; Vieira, S.E.M.; Pavão, D.L.; Malaguti, J.M.A.; Rojas, N.; Souza, R.J.; Athayde, C.S.; Ruyz, D.C.; Galuppo, A.G.; Pinheiro, E.S.

Centro de Sanidade Animal-Instituto Biológico de São Paulo, São Paulo-SP, CEP04014-002, Brasil
dangelo@biologico.sp.gov.br

O sêmen pode ser considerado como potencial fonte de contaminação de microrganismos não-patogênicos e patogênicos. A coleta, quando realizada corretamente apresenta-se com baixa contaminação, porém não necessariamente estéril, sendo recomendado o uso de antibióticos. É importante considerar que alguns microrganismos são resistentes a antibióticos, e que em alguns casos podem não ser eficientes na eliminação de contaminação. Existem relatos de contaminação de embriões PIV por amostras de sêmen contaminadas com: *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus sciuri*, *Acinetobacter cacloaceticus*, *Pantoeau agglomerans* ou *Flavobacterium spp* (Stringfellow, Theriogenology, 53: 85, 2000). O objetivo desse trabalho foi relatar que a concentração de microrganismos aceitável para uma amostra de sêmen utilizada para inseminação pode não ser segura para a realização de uma fertilização *in vitro* (FIV). As FIVs foram realizadas com oócitos obtidos por aspiração folicular de ovários bovinos coletados em abatedouros, maturados *in vitro*. As amostras de sêmen foram descongeladas e processadas em Percoll (CULTILAB-Campinas, SP). Os oócitos foram lavados em meio HTF + 10%SFB e colocados para fertilização junto com os espermatozoides. Após a verificação de contaminação, no dia seguinte à fertilização, em duas FIVs consecutivas, com amostras de sêmen distintas e aparentemente normais, foi realizado um teste para localização do foco de contaminação. Uma terceira FIV foi feita, utilizando-se amostras de sêmen das mesmas partidas anteriores. O procedimento foi realizado conforme protocolo padrão. Foram montadas placas com 4 gotas de meio, na gota 1 foi realizada a FIV convencional, na 2 foram colocados apenas oócitos, na gota 3 sêmen e a gota 4 foi utilizada para controle do meio. As placas permaneceram em estufa de CO₂ por 18h. A presença de contaminação foi observada nas gotas 1 e 3 de cada placa, indicando o sêmen como possível foco de contaminação. O restante das amostras dessas duas partidas foram encaminhadas para cultura, juntamente com outras 7 amostras ainda não utilizadas, além de oócitos e meio. Os oócitos e o meio de cultura apresentaram cultura negativa. Já o resultado das 2 primeiras amostras de sêmen apresentou-se positivo com crescimento de: *Acinetobacter spp* (5000 ufc), *Enterobacter aerogenes* (5000 ufc), *Escherichia coli* (5000 ufc) e *Streptococcus spp* (incontáveis ufc). Para o restante foram obtidos 3 resultados negativos e 4 positivos, com crescimento de: *Acinetobacter spp* (300ufc e 1600 ufc), *Enterobacter aerogenes* (incontáveis ufc) e *Alcaligenes faecalis* (incontáveis ufc). A presença dessas bactérias nas amostras de sêmen inviabilizaram a FIV. A cada fase de desenvolvimento tecnológico de técnicas conceptivas artificiais, criam-se novos desafios em relação ao controle de doenças. Portanto, deve-se ter em mente que padrões de controle de qualidade já estabelecidos para técnicas existentes, não podem ser considerados seguros para as novas tecnologias, como no caso do controle de microrganismos em amostras de sêmen, que poderão ser utilizadas para inseminação ou FIV. Aparentemente nesse último caso a amostra deve ser isenta da presença de contaminantes, pois a condição *in vitro* do procedimento promove ambiente favorável para seu crescimento.

Suporte financeiro: CULTILAB

PRIMEIROS RESULTADOS DA FIV COM ESPERMATOZÓIDES SEXADOS NO BRASIL

Oliveira, K.M.^{1,3}; Franco, R.V.R.¹; Diniz, E.G.³; Vieira, F.V.²; Galassi, A.G.¹; Tavares, M.⁴;
Braga, M.Q.¹; Galeli, G.¹; Rodrigues, L.F.¹

¹ Goyaike Brasil Agropecuária Ltda –Laboratório de Sêmen Sexado – Uberaba – MG – Brasil. ² ABS PecPlan – Laboratório de Sêmen Convencional – Uberaba - MG-Brasil. ³ Departamento de Reprodução Animal – FAMEV/ UFU, Uberlândia – MG, Brasil. ⁴ Departamento de Matemática - FAMAT/ UFU, Uberlândia – MG, Brasil kmello@goyaike.com.br; rfranco@goyaike.com.br

A fecundação *in vitro* (FIV) ou produção de embriões *in vitro* em bovinos é uma técnica que inclui os processos de maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário no estágio de pré-implantação, propiciando o desenvolvimento de outras biotécnicas da reprodução animal como clonagem e transferência de genes. É uma tecnologia utilizada para acelerar a produção de animais geneticamente superiores permitindo também a utilização de fêmeas portadoras de alterações adquiridas, propiciando o aprofundamento dos conhecimentos relativos aos processos biotecnológicos. Um dos desafios da biotecnologia da reprodução animal e cujo sucesso foi procurado intensamente desde a descoberta da inseminação artificial; foi a sexagem de sêmen proporcionando grandes benefícios para o melhoramento genético. A sexagem de sêmen por citometria de fluxo é baseada na diferença de DNA existente nos cromossomos sexuais X e Y sendo que, o cromossomo sexual X no bovino possui 3,8% mais DNA que o cromossomo Y. Portanto a aplicação do sêmen sexado na espécie bovina constitui um enorme avanço no campo da reprodução animal. O sêmen sexado por citometria de fluxo é uma ferramenta que pode ser aplicada em conjunto com a FIV e outras biotécnicas, permitindo eliminar uma limitação encontrada na FIV, o maior nascimento de machos em relação às fêmeas. O objetivo desse trabalho foi relatar os resultados obtidos da fecundação *in vitro* realizada com sêmen sexado por diferentes laboratórios com touros da raça Nelore e Brahman no Brasil. O método utilizado para preparação dos espermatozóides para FIV foi o gradiente de Percoll. Foram utilizadas doses de sêmen sexado de três touros da raça Nelore e um touro da raça Brahman. A FIV foi realizada por quatro diferentes laboratórios. Totalizando 2717 oócitos viáveis os mesmos foram inseminados com respectivo sêmen obtendo-se 50,2% de clivagem e 23,6 % de embriões viáveis. Os dados foram analisados pelo Teste t de Student. ($p \leq 0,05$). Os resultados mostram a viabilidade de se usar o sêmen sexado em FIV apresentando resultados similares aos obtidos com o sêmen convencional.

ESPERMATOZÓIDES SEXADOS NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES (PIV) BOVINOS

Brum, D.S.¹; Leivas, F.G.¹; Saliba, W.P.²; Alvim, M.T.T.²

¹Nova Índia – Cenatte Embriões, Uberaba-MG. ²Cenatte Embriões, Pedro Leopoldo-MG
danisbrum@yahoo.com.br

O sêmen espermatozóides sexados comercializado no Brasil desde agosto de 2004 é uma importante ferramenta para produção de fêmeas. No entanto, é necessária cautela para o introduzir em trabalhos comerciais, devido ao seu alto custo e resultados variáveis relatados em outros países. Em nosso laboratório, utilizou-se até o momento para a produção *in vitro* de embriões (PIV), o sêmen de cinco touros de diferentes raças: Holandesa (HO), Nelore Mocho (NM), Brahman (BR), Nelore (NE) e Girolando (GO). Após a seleção, 259 oócitos de 10 doadoras (HO, BR, NM, NE e GO) obtidos através de ovum pick-up (OPU), foram maturados por 24h em meio TCM 199 modificado, em estufa com 5% de CO₂ em ar, 39°C e umidade saturada. A fecundação *in vitro* (FIV) foi realizada por 18-22h em meio FERT-TALP acrescido de PHE e heparina. O sêmen foi descongelado e processado através da passagem por Gradientes de Percoll, sendo a inseminação realizada com 2x10⁶ de espermatozóides/mL, nas mesmas condições atmosféricas da MIV. O cultivo *in vitro* (CIV) foi realizado em meio SOFaaci suplementado com fonte protéica por 6 dias em estufa com 5% CO₂, 5% O₂, 39°C e umidade saturada. As avaliações foram realizadas no D2 (clivagem) e D7 (embriões TE), considerando-se D0 (dia zero) o dia da FIV. O diagnóstico de gestação foi realizado aos 60 dias juntamente com a sexagem. O procedimento realizado com o sêmen GO apresentou contaminação após a FIV, sendo desconsiderado neste trabalho. As taxas de clivagem foram de 100% (14/14), 100% (66/66), 77% (46/60) e 50% (43/86) para os touros HO, NM, BR e NE, respectivamente. As porcentagens de embriões transferíveis em relação ao número de oócitos foram de 50, 79, 40 e 22% e prenhez foram 57, 46, 33 e 53% para os touros HO, NM, BR e NE, respectivamente, resultando em 83% (38/46) de fêmeas. Os resultados médios de produção embrionária 45% (102/226) e taxa de prenhez 45% (46/102) obtidos até o momento são similares aos resultados com sêmen não sexado em nosso laboratório. A utilização de um maior número de vezes destes touros, assim como diferentes partidas, comprovariam a repetibilidade destes resultados.

PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES EM DIFERENTES RAÇAS ZEBUINAS, UTILIZANDO ESPERMATOZÓIDES SEXADOS POR CITOMETRIA DE FLUXO

Ereno, A.F.C.; Andrade, R.F.; Pontes, J.H.F.

In Vitro Brasil, Mogi Mirim-SP, 13800-970, Brasil. josehenrique@invitrobrasil.com.br

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o uso do sêmen contendo espermatozóides sexados por citometria de fluxo na produção *in vitro* de embriões (FIV) em diferentes raças zebuínas. Para a obtenção dos oócitos, foram utilizadas matrizes de alto valor genético das raças Nelore, Brahman e Gir leiteiro. Os ovócitos foram maturados a 38,5°C in 5% CO₂ em meio TCM 199 suplementado com hormônios e 10% de soro fetal bovino. Após 24 h os ovócitos foram submetidos à fecundação *in vitro* em meio Fert-TALP por 18 h e cultivados em meio SOF a 38,5°C sob 5% de CO₂. O sêmen comercial previamente sexado de fêmea por citometria de fluxo, foi descongelado a 35° em água por 30 s e separado em gradiente de percoll de 45 e 90%. Foram analisados a taxa de clivagem, produção de embrião, prenhez e o percentual de fêmeas aos 60 dias de gestação. Os índices de clivagem e produção de embrião foram (52% e 31%), (56% e 34%) e (55% e 34%) para Nelore, Brahman e Gir Leiteiro respectivamente. As taxas de gestação e os percentuais de fêmeas foram (32% e 95%), (36% e 96%) e (34 e 96%) para Nelore, Brahman e Gir Leiteiro respectivamente. Em conclusão, o uso de sêmen sexado por citometria de fluxo pode ser considerado como uma nova ferramenta para uso em PIV comercial quando um maior número de fêmeas for desejado.

PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS A PARTIR DE SÊMEN SEXADO

Tonello, T.T.M.¹; Accorsi, M.F.¹; Ferraz, M.L.¹; Watanabe, M.R.¹; Meirelles, F.D.P.²;
Meirelles, F.V.²; Watanabe, Y.F.^{1,2}

¹Vitrogen® Pesquisa e Desenvolvimento em Biotecnologia da Reprodução, Cravinhos–SP, Brasil.

²Depto de Ciências Básicas da FZEA-USP, Pirassununga-SP, Brasil. tatiana@vitrogen.com.br

O crescimento contínuo da pecuária brasileira está gerando grande expectativa em relação às novas biotecnologias que estão surgindo no mercado. A utilização de sêmen sexado agregado a outras biotécnicas, como a FIV é, portanto uma ferramenta muito importante para intensificar e acelerar o melhoramento genético de animais de alto valor zootécnico. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia do sêmen com espermatozóides sexados, em bovinos, utilizado no processo de fecundação *in vitro*. Para tanto, foram analisadas 30 doses de sêmen sexado de 9 touros diferentes, acasalados com 168 doadoras, totalizando 3.622 oócitos. Os mesmos foram maturados em meio TCM 199 acrescidos de FSH, LH, Estradiol e 10% de soro fetal bovino durante 24 horas a 38,8°C e 5% de CO₂ em ar. As doses utilizadas foram descongeladas em banho-maria a 35°C e o sêmen depositado em tubo com gradiente de Percoll (45% e 90%) para separação dos espermatozóides móveis. O sêmen foi centrifugado a 250 g durante 30 minutos e em seguida foi analisada a viabilidade dos espermatozóides mediante motilidade espermática. Foi utilizada a dose inseminante de 1x10⁶ espermatozóides/mL e o co-cultivo (espermatozóide e oócito) foi realizado em microgotas de meio FIV (TALP + PHE + 10 µg de heparina/ml) seguindo para incubadora a 38,8°C e 5% de CO₂ em ar por um período de 18 a 22 horas. Os prováveis zigotos foram cultivados em meio CR2 acrescido de 10% de SFB nas mesmas condições de temperatura e atmosfera gasosa. Os dados foram analisados por ANOVA e as médias comparadas aplicando o teste de TUKEY-KRAMER HSD. A porcentagem de clivagem avaliada no terceiro dia de cultivo apresentou média de 53,2% e uma diferença altamente significativa entre os touros (P < 0,0001) com variação de 6,2 ± 20,1% a 70,6 ± 29,5%. A taxa média de blastocisto avaliada no 7º e 8º dia de cultivo foi de 13,8% e também apresentou diferença significativa (P < 0,01), com variação entre os touros de 0,0 ± 8,4% a 52,9 ± 14,6%. No entanto, a taxa de prenhez não foi significativa nos 3 touros que apresentaram gestação (P > 0,05), apesar da variação de 0 a 52 ± 0,1%, onde a média foi de 40,7%. Deste modo, podemos concluir que existe grande variação na taxa de clivagem, blastocisto quando utilizado sêmen sexado. No entanto, cabe salientar a grande variação entre partidas e intra partidas, indicando que estudos devem ser efetuados para melhorar os protocolos e a viabilidade dos espermatozóides sexados.

EFEITO DA PRESENÇA DE ESPERMATOZÓIDES NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS DE CADELAS DOMÉSTICAS (*Canis familiaris*)

Rocha, A.A.¹; Bastos, R.¹; Cunha, I.C.N.¹; Quirino, C.R.¹.; de Souza, D.B.²; Paes de Carvalho, C.S.¹

¹Laboratório de Melhoramento Genético Animal – Universidade Estadual do Norte Fluminense
Av. Alberto Lamego, 2000-Horto - Campos dos Goytacazes - RJ-Brasil amanda@uenf.br,
rocha_aa@yahoo.com.br ²Clínica Cirúrgica e Cirurgia-Hospital Veterinário-UENF.

No uso de biotecnologias reprodutivas aplicadas à canídeos, os oócitos recuperados de folículos ovarianos das fêmeas representam fonte importante de estudos que envolvem o desenvolvimento dos gametas femininos. A maturação *in vitro* (MIV) de oócitos de cadelas possui índices de sucesso bastante inferiores quando comparados a de outros mamíferos, sendo que a presença de espermatozóides pode influenciar no processo MIV. O objetivo deste trabalho foi otimizar o protocolo de MIV de oócitos de cadelas domésticas (*Canis familiaris*), avaliando o efeito da co-incubação entre espermatozóides e oócito na retomada das divisões meióticas. Foram utilizadas 47 cadelas da rotina de ovariosalpingohisterectomia (OSH) do Hospital Veterinário da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF) e do Centro de Controle de Zoonoses de Campos dos Goytacazes – RJ. Os ovários coletados foram levados ao Laboratório de Melhoramento Genético Animal – UENF e os oócitos obtidos por fatiamento do tecido ovariano. Os oócitos foram divididos em grau I, grau II e degenerados de acordo com a qualidade (HEWITT et al., *Theriogenology*. 49: 957-966, 1998), sendo as estruturas de grau I selecionadas para o processo de MIV. O meio de MIV utilizado foi preparado diariamente com TCM 199 acrescido de 10% soro de cadela em estro e antibióticos. O experimento foi dividido em dois grupos: o grupo tratado, sendo os oócitos imaturos incubados por 24 horas com os espermatozóides de cão e após este período foram submetidos a MIV por mais 48 horas, completando 72 horas de cultivo e o grupo controle, em que os oócitos foram submetidos ao processo de MIV por 72 horas sem contato com espermatozóides. Os dados foram comparados pela ANOVA, seguido de teste de comparação de médias. Os grupos controle e tratado com espermatozóides durante o processo de MIV apresentaram taxas de MII de 4,91% 19,96% de maturação, respectivamente, sendo a maturação no grupo tratado significativamente maior ($P < 0,05$) quando comparado com o grupo controle. Durante o processo de co-incubação entre espermatozóides e oócitos, a zona pelúcida de célula oocitária é um local de grande importância para a interação entre o gameta masculino e feminino. De acordo com EPPIG (EPPIG, J.J. *Reproduction*, 122:829-838, 1991) a forte união das células do *cumulus* de oócitos de camundongos realiza efeito inibitório no processo de maturação, sendo revertido no momento em que se inicia a expansão da camada de células do *cumulus*. HAY (HAY M.A., Doctoral thesis - The Faculty of Graduate Studies of The University of Guelph - Toronto, 182p, 1996) cita que vários autores descreveram o fato da interação entre espermatozóides e a zona pelúcida dos oócitos estimular a síntese do fator promotor da maturação (MPF) no citoplasma oocitário em espécies como bovinos, suínos e ovinos, podendo induzir a quebra da vesícula germinativa, levando a retomada das divisões meióticas até a fase de MII. Os resultados permitem concluir que a presença de espermatozóides durante o processo de MIV pode induzir a retomada meiótica, sugerindo que a interação estimulada pelo espermatozóide de cão pode controlar fatores citoplasmáticos dos gametas femininos.

Agradecimentos: Canil - Centro de Controle de Zoonoses (Campos – RJ) e Dept^o Cirurgia Hvet – UENF

PENETRAÇÃO ESPERMÁTICA EM OÓCITOS SUÍNOS SUBMETIDOS A DIFERENTES SISTEMAS DE MATURAÇÃO *IN VITRO*

Lima, A.S.; Nascimento, A.B.; Oliveira, V.P.; Marques, M.G.;
Assumpção, M.E.O.A.; Visintin, J.A.

Departamento de Reprodução Animal – FMVZ-USP, São Paulo-SP, Brasil
aballarotti@yahoo.com.br

O objetivo deste estudo foi avaliar os índices de penetração espermática, polispermia e formação pronuclear em oócitos suínos submetidos a três diferentes sistemas de maturação *in vitro* (MIV). Folículos de ovários de abatedouro foram aspirados e os oócitos subdivididos em três grupos de maturação *in vitro* por 44 horas, utilizando os meios NCSU23, Whitten ou TCM199. Após a MIV, os oócitos foram fecundados no meio MTBM por seis horas e colocados para cultivo em NCSU23 por 18 horas, sendo em seguida fixados em paraformaldeído a 4% e corados com Hoechst 33342 para avaliar a polispermia. Os índices de penetração espermática foram de 85,8% no meio NCSU23, 79,7% no Whitten e 80,3% no TCM199, não diferindo significativamente ($p < 0,05$). Os índices de polispermia não apresentaram diferença estatística entre os meios ($p < 0,05$), sendo de 78,4%, 68,6% e 70,6%, respectivamente, para o NCSU23, Whitten e TCM199. A formação de pró-núcleos foi de 78,3% no NCSU23; 75,4% no Whitten e 100% no TCM199, não apresentando diferença ($p < 0,05$). Concluiu-se que a penetrabilidade dos oócitos, os altos índices de polispermia e a formação pronuclear não foram afetados pelos tratamentos de maturação *in vitro* e que novas abordagens precisam ser adotadas para minimizar a ocorrência da polispermia.

INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES ESPERMÁTICAS E FONTES PROTÊICAS NOS ÍNDICES DE CLIVAGEM E DE DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE EMBRIÕES EM SUÍNOS

Nascimento, A.B.; Marques, M.G.; Oliveira, V.P.; Coutinho, A.R.S.; Gonçalves, J.S.A.; Assumpção, M.E.O.A.; Visintin, J.A.

Departamento de Reprodução Animal – FMVZ-USP, São Paulo-SP, Brasil
aballarotti@yahoo.com.br

O objetivo deste trabalho foi avaliar os índices de clivagem e de desenvolvimento de embriões fecundados por diferentes concentrações espermáticas e cultivados em meio com soro fetal bovino (SFB) ou albumina sérica bovina (BSA). Foram utilizadas concentrações de 2×10^3 ou 4×10^3 sptz/oócito para FIV (DO) e o meio NCSU23 suplementado com 3 mg de BSA/mL para cultivo dos embriões até o dia 5 pós-fecundação (D5). No D5, os embriões foram divididos em dois grupos de cultivo: NCSU23 com 10% SFB e NCSU23 com 3mgBSA/mL. Os índices de clivagem foram avaliados no D3 e o de blastocisto do D6 ao D8 de cultivo. Para a análise estatística foi utilizado a ANOVA e o teste Tukey ($p < 0,05$). Não houve diferença nos índices de clivagem no D3 entre 2×10^3 (56,8%) e 4×10^3 sptz/oócito (56,9%). Foi observada diferença nos índices de blastocisto entre o NCSU23 com SFB (12,8 e 11,8%) e o NCSU23 com BSA (17,1 e 16%), respectivamente, para 2×10^3 e 4×10^3 sptz/oócito. Concluiu-se que diferentes concentrações espermáticas podem ser usadas na fecundação *in vitro* e que o meio de cultivo NCSU23 com BSA pode melhorar a produção *in vitro* de embriões em suínos.

Suporte financeiro FAPESP 04/01141-8

EFEITO DE VARRÕES, EJACULADOS, DILUIDORES E CAFEÍNA SOBRE OS ÍNDICES DE CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA *IN VITRO*

Nascimento, A.B.; Nichi, M.; Coutinho, A.R.S.; Marques, M.G.; Oliveira, V.P.; Gonçalves, J.S.A.; Assumpção, M.E.O.A.; Visintin, J.A.

Departamento de Reprodução Animal – FMVZ-USP, São Paulo-SP, Brasil
aballarotti@yahoo.com.br

Uma das maiores dificuldades encontradas na produção *in vitro* de embriões em suínos é o estabelecimento de um protocolo de capacitação espermática confiável que resulte em altos índices de embriões monospérmicos e com desenvolvimento adequado. A busca deste protocolo tem encontrado dificuldade diante da grande variabilidade individual entre varrões e entre ejaculados, que são reconhecidamente as maiores fontes de variação na estimativa de sucesso da produção *in vitro* de embriões. O objetivo deste trabalho foi comparar os índices de capacitação espermática entre três varrões (A, B e C) e entre seis ejaculados de cada um destes animais. Foram utilizados dois diluidores, *Beltsville Thawing Solution* (BTS) e água de coco desidratada (ACP250[®]), associados (CAF) ou não (CTL) à cafeína, totalizando quatro grupos: T1 (ACP250[®]+CTL), T2 (ACP250[®]+CAF), T3 (BTS+CTL) e T4 (BTS+CAF). A análise estatística foi realizada pelo ANOVA e pelo teste Tukey com 5% de significância. Houve diferença na capacitação espermática entre os grupos sem cafeína (T1=18% e T3=18,5%), em relação aos com cafeína (T2=44,8% e T4=45,9%), independentemente do diluidor ($p<0,05$). Entretanto, não houve diferença entre os varrões (A=38,6%, B=34,6% e C=22,2%) e entre os ejaculados de cada varrão ($p>0,05$). Concluiu-se que não houve influência dos varrões ou dos ejaculados, mas sim da presença da cafeína sobre os índices de capacitação espermática.

Suporte financeiro FAPESP 04/01141-8

EFEITO DE ANTIOXIDANTES DURANTE A FECUNDAÇÃO *IN VITRO* SOBRE A QUALIDADE E FERTILIDADE DE ESPERMATOZÓIDES BOVINOS

Gonçalves, F.S.¹; Barretto, L.S.S.¹; Arruda, R.P.²; Mingoti, G.Z.³

¹Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal-SP, Brasil. ²FMVZ, USP, São Paulo-SP, Brasil. ³Medicina Veterinária, UNESP, Araçatuba-SP, CEP 16050-680, Brasil.
viuva_vet98@yahoo.com.br

As espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas *in vitro* reagem com proteínas celulares, lipídeos e DNA, causando alterações na viabilidade celular, inclusive em espermatozoides. Apesar de ter sido demonstrado que ROS diminuem a motilidade espermática, outros achados indicam que ROS podem estar envolvidas no processo de capacitação espermática. Assim, propusemos avaliar o efeito de antioxidantes (2-Mercaptoetanol - 2-ME ou Cisteamina - Cist) durante o processo de fecundação *in vitro* (FIV) sobre a qualidade e fertilidade de espermatozoides, através da clivagem de oócitos após FIV. Oócitos (N=230) foram maturados, por 24 horas, em estufa a 38,5°C e atmosfera a 5% CO₂, em ar, em meio TCM-199 suplementado com 10% de SFB, 0,5 (g FSH/mL, 100 UI hCG/mL e 1 (g estradiol/mL. O meio de FIV empregado foi o TALP, suplementado com 10 µg/mL de heparina (grupo controle), com adição de 50 (M de 2-ME ou 50 (M de Cist ou, ainda, com 5 mM de buthionine sulfoximine (BSO), um inibidor da síntese de glutatona, o qual facilita a ação das ROS. Imediatamente após a adição do sêmen (100x103/100 µL TALP) nas gotas de FIV (0 h) e 4 h após o início da FIV (hpi), uma alíquota do meio de FIV foi retirada para avaliação de patologias espermáticas, sob microscopia de contraste de fase. Foi analisada, também, a clivagem após 36 hpi e, os dados avaliados através de ANOVA ($P<0,05$). O percentual de clivagem foi de 73,1% (controle), 67,6% (Cist), 46,4% (2-ME) e 68,6% (BSO), não havendo diferença ($p>0,05$) entre grupos. Com relação aos defeitos totais, avaliados 4 hpi, observou-se porcentagem inferior a 30% para todos os grupos, portanto, dentro da normalidade: 15,7% (controle), 19,1% (Cist), 25,4% (2-ME) e 10,6% (BSO). Embora os dados sejam preliminares e as diferenças observadas não sejam estatisticamente significativas, observa-se um provável efeito prejudicial do 2-ME durante a FIV, o qual deve ainda ser melhor avaliado.

EFEITO DO TEMPO DE FECUNDAÇÃO *IN VITRO* E DA CAFEÍNA NA REDUÇÃO DA POLISPERMIA DE EMBRIÕES EM SUÍNOS

Oliveira, V.P.; Marques, M.G.; Nascimento, A.B.; Gonçalves, J.S.; Mendes, C.M.;
Assumpção, M.E.O.A.; Visintin, J.A.

Departamento de Reprodução Animal – FMVZ-USP, São Paulo-SP, Brasil purri@usp.br

Um dos obstáculos na produção *in vitro* de embriões em suínos é a alta incidência de polispermia. Embriões polispérmicos atingem o estágio de blastocisto, porém apresentam menor massa celular interna, o que pode ser a causa do atraso ou mesmo da paralisação do desenvolvimento embrionário *in vitro*. Este trabalho teve como objetivo avaliar três tempos (2, 4 ou 6 horas) de fecundação *in vitro* com sêmen refrigerado e capacitado prévia (3 horas) ou simultaneamente à fecundação com 2mM de cafeína sobre os índices de embriões polispérmicos. Oócitos de fêmeas pré-púberes foram maturados no meio TCM 199 por 44 horas e fecundados *in vitro* no meio MTBM com 1×10^5 espermatozoides/ml em três períodos (2, 4 ou 6 horas). Dezoito horas após a fecundação, os embriões foram fixados e corados com Hoechst 33342 para avaliação dos pró-núcleos. Os resultados foram analisados pelo SAS e pelo PROC NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica, sendo o efeito dos tratamentos verificados pelo teste de Kruskal-Wallis e as comparações múltiplas pelo teste de Wilcoxon, com tratamentos comparados dois a dois. O nível de significância foi de 5%. Para espermatozoides capacitados prévia ou simultaneamente à fecundação, os índices para 2, 4 ou 6 horas foram, respectivamente, para estruturas não fecundadas de 58,9 e 51,6%, 38,6 e 49,4% e de 30,1 e 41,3%; embriões monospérmicos de 23,3 e 23,6%, 40,3 e 30,6% e de 41,6 e 32,6% e embriões polispérmicos de 17,8 e 24,8%, 21,1 e 20,0% e de 28,3 e 26,1%. Em relação à capacitação espermática prévia ou simultaneamente à fecundação, não houve diferença significativa entre os índices de embriões monospérmicos e polispérmicos. Concluiu-se que, nestas condições, o tempo de fecundação não teve influência sobre os índices de embriões monospérmicos e polispérmicos. Suporte financeiro CAPES

ATIVIDADE MITOCONDRIAL DE ESPERMATOZÓIDES BOVINOS INCUBADOS EM DIFERENTES PERÍODOS COM OU SEM DNA EXÓGENO

Feitosa, W.B.; Rovegno, M.; Simões, R.; Milazzotto, M.P.; Caetano, H.V.A.; Visintin, J.A.,
Assumpção, M.E.O.A.

Departamento de Reprodução Animal-FMVZ-USP, São Paulo-SP, Brasil- wfeitosa@usp.br

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do DNA exógeno sobre o potencial de mitocôndria em espermatozoides bovinos. O sêmen foi descongelado e separado em gradiente de Percoll (45/90%) a 600 x g, por 30 minutos, sendo o sedimento ressuspensado, lavado 3 vezes no meio TALP-sêmen e centrifugado a 200 x g, por 5 minutos. Os espermatozoides foram ressuspensos no meio de fecundação (sem heparina) na concentração de 5×10^6 /mL e incubados a 39°C e 5% CO₂ em ar, com 500ng/mL de pEYFP-Nuc (Clontech BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ-EUA; grupo DNA) e sem DNA (grupo controle), por 4 horas. O potencial de membrana mitocondrial foi avaliado às 0, 1, 2, 3 e 4 horas (h) de incubação, utilizando sonda fluorescente JC-1 (Molecular Probes, Eugene OR-EUA), a qual cora as mitocôndrias em vermelho quando o potencial de membrana é alto e em verde quando é baixo. Um volume de 150µL de meio FIV, contendo 5×10^6 sptz/mL, foi incubado com 2µL de JC-1 (76,5µM em DMSO), à temperatura ambiente, por 15 minutos. Um total de 200 células foram avaliadas em microscopia de epifluorescência (Zeiss). Para análise estatística foi aplicado o SAS, empregando o teste Tukey e $p < 0,05$. A porcentagem de espermatozoides que apresentaram alta atividade mitocondrial nas diferentes horas foi de 81,9%^a (0 h), 68,4%^b (1 h), 47,8%^c (2 h), 29,8%^d (3 h) e 20,6%^d (4 h) no grupo controle, enquanto que, no grupo incubado com DNA, o potencial de membrana mitocondrial foi de 81,9%^a (0 h), 69,2%^b (1 h), 46,9%^c (2 h), 27,4%^d (3 h) e 22,3%^d (4 h). Não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos controle e DNA para o potencial de mitocôndria em nenhum período de incubação. Conclui-se que, o DNA não influenciou o potencial de membrana de mitocôndria de espermatozoides bovinos.

Suporte financeiro: FAPESP – processos 03/10234-7 e 03/07456-8

INFLUÊNCIA DO DNA EXÓGENO SOBRE A CAPACITAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES EM BOVINOS

Feitosa, W.B.; Milazzotto, M.P.; Simões, R.; Nicacio, A.C.; Nascimento, A.B.;
Visintin, J.A.; Assumpção, M.E.O.A.

Departamento de Reprodução Animal – FMVZ-USP, São Paulo-SP, Brasil - wfeitosa@usp.br

As células espermáticas de mamíferos possuem a habilidade natural de se ligarem ao DNA exógeno, podendo ser utilizadas como vetores na produção de animais transgênicos, pois fisiologicamente transferem DNA exógeno para dentro dos oócitos durante o processo de fecundação. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da incubação de espermatozóides bovinos com DNA exógeno sobre a capacitação espermática. Sêmen descongelado foi centrifugado em gradiente de Percoll (45/90%) para separar os espermatozóides vivos. O sedimento foi ressuspenso, lavado em meio TALP sêmen e centrifugado a 200 x g, por 5 minutos. Foram testados três tratamentos com dez repetições cada. Para cada tratamento, 5×10^6 espermatozóides, móveis, em 1 mL de meio FIV, foram incubados, por 4 horas, a 39°C e 5% de CO₂, em ar. O sêmen foi incubado em meio FIV sem heparina (grupo controle), em meio FIV com 500ng/mL de pEYFP-NUC (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ-EUA; grupo DNA) e em meio FIV com 100µg de heparina/mL (grupo heparina). Na avaliação da capacitação espermática foram usadas as sondas fluorescentes iodeto de propídeo e diacetato de carboxifluoresceína. Para a análise estatística foi utilizado o SAS, aplicando o teste Tukey e $p < 0,05$. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre o grupo DNA ($17,5\% \pm 1,6^{ab}$) e os grupos heparina ($24\% \pm 2,5^a$) e controle ($16\% \pm 1,9^b$) para os índices de capacitação, mas diferença significativa ($p < 0,05$) ocorreu entre os grupos heparina ($24\% \pm 2,5^a$) e controle ($16\% \pm 1,9^b$). Conclui-se que, a incubação dos espermatozóides com DNA não predispõe à capacitação espermática, podendo ser um método alternativo para a produção de embriões transgênicos.

Suporte financeiro: FAPESP – processos 03/10234-7 e 03/07456-8

EFEITO DA INIBIÇÃO DA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZÍVEL NA MOTILIDADE E INTEGRIDADE DE MEMBRANA DE ESPERMATOZÓIDES BOVINOS CAPACITADOS *IN VITRO*

Ferreira-Berbari, J.B.P.; Caldas-Bussiere, M.C.; Paes de Carvalho, C.S.; Silva, A.E.

Setor de Reprodução Animal, Laboratório de Melhoramento Genético Animal, CCTA, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, 28013-602, Brasil.
jbbarcelos@uol.com.br

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o papel do óxido nítrico (NO), produzido pela enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) na motilidade e integridade de membrana durante a capacitação *in vitro* de espermatozóides bovinos *in natura* da raça Guzerá. Utilizou-se diferentes concentrações de aminoguanidina (AG - 0,1; 0,01; 0,001 M), inibidor específico da iNOS, na cinética de capacitação *in vitro* induzida pela heparina durante 300 min. A motilidade foi avaliada de modo subjetivo com o uso de microscopia de luz direta e a integridade de membrana pelo uso da coloração vital com Trypan-blue a 0,2%. Este experimento foi avaliado pela análise de variância, na qual as médias das diferentes concentrações foram comparadas pelo teste “t” ($p < 0,05$). A aminoguanidina na concentração de 0,1M diminuiu a motilidade a partir dos 15 min ($p < 0,05$) em relação ao controle ($10 \pm 0,0$ % e $73,3 \pm 5,2$ %, respectivamente). Aos 120 min, esta foi totalmente inibida em relação ao controle e demais tratamentos ($p < 0,05$). Observou-se a ligação de espermatozóides (5-8) na região acrossomal desde 15 até 300 min, impedindo a motilidade progressiva dos mesmos. Contudo, este comportamento não foi observado quando se utilizou as concentrações de 0,01 e 0,001 M. Foi verificada diminuição da motilidade aos 300 min ($p < 0,05$), quando se avaliou a concentração 0,01 M de AG ($16,7 \pm 15,1$ %), em relação ao controle e à concentração de 0,1 M de AG ($40,0 \pm 8,9$ e 0%, respectivamente). Uma diminuição significativa do número de espermatozóides íntegros foi evidenciada aos 15 min ($p < 0,05$), quando se comparou o controle ($64,5 \pm 8,2$ %) às concentrações de 0,1 e 0,01 M de AG ($38,8 \pm 7,7$ % e $46,2 \pm 9,6$ %, respectivamente), fato este que não se repetiu nos demais tempos de observação e tratamentos. Estes resultados demonstram que o NO produzido pela enzima iNOS está envolvido na motilidade de espermatozóides bovinos durante a capacitação *in vitro*, mas não na integridade de membrana.

Apoio Financeiro: FAPERJ, CAPES E FINEP

EFEITO DE BLOQUEADORES DE CANAIS DE ÍONS CÁLCIO VOLTAGEM-DEPENDENTES SOBRE A FERTILIDADE *IN VIVO* E *IN VITRO* DE ESPERMATOZÓIDES DE MAMÍFEROS*

Gabaldi, S.H.¹; Esper, C.R.²; Tedesco, A.C.³; Wolf, A.⁴; Oliveira, J.A.⁵

¹ Dep. de Reprod. An. - FMVZ-USP, São Paulo, shgabaldi@hotmail.com; ² Dep. de Med. Vet. Prev. e Reprod. An. - FCAV-UNESP, Jaboticabal; ³ Dep. de Química - FFCLRP-USP, Ribeirão Preto, Brasil; ⁴ Dep. de Reprod. An.e Radiol. Vet. - FMVZ-UNESP, Botucatu, Brasil
⁵ Dep. de Ciências Exatas - FCAV-UNESP, Jaboticabal, Brasil

Há relatos que bloqueadores de canais de íons cálcio voltagem-dependentes, utilizados na terapia anti-hipertensiva, podem levar à infertilidade masculina, pois o íon cálcio é importante na capacitação espermática e reação acrossomal. Este experimento teve como objetivo verificar a influência dos bloqueadores de canais de íons cálcio voltagem-dependentes do tipo-*L*, verapamil, nifedipina e diltiazem, sobre a fertilidade *in vivo* e *in vitro* de espermatozóides de hamsters. Foram realizados tratamentos *in vitro* no Experimento I: espermatozóides foram capacitados em meios contendo a concentração de 0, 10 μ M, 100 μ M ou 1mM dos bloqueadores de canais de cálcio e avaliados quanto à motilidade, hiperatividade e fertilidade *in vitro*. A capacitação espermática foi avaliada pela coloração de clortetraciclina fluorescente em cinco momentos (na colheita, uma, duas, três e quatro horas), e a fertilidade *in vitro* pela utilização de oócitos (n=1307) de fêmeas hamsters superovuladas e corados pela coloração de Hoechst 33342 após 6 horas da fecundação *in vitro*, em microscopia de epifluorescência. No Experimento II, os bloqueadores verapamil (40mg/kg/d), nifedipina (50mg/kg/d) ou diltiazem (40mg/kg/d) foram administrados aos machos por via oral, duas vezes ao dia, e durante 60 dias e, posteriormente, analisados quanto à fertilidade *in vivo* (prenhez de 16 fêmeas e 8 machos/grupo), capacitação e hiperatividade espermáticas (8 machos/grupo) e fecundação *in vitro* (5 machos/grupo; 1667 oócitos). No Experimento III, a concentração intracelular de cálcio foi mensurada em espermatozóides na presença de 50 μ M dos bloqueadores de canais de íons cálcio, pela intensidade de fluorescência do Fluo-3AM por 720 seg. No experimento I e II, os resultados foram avaliados pelo teste do Qui-Quadrado (p<0,05) e no Experimento III por ANOVA (p<0,05). Como resultados, no Experimento I, os fármacos atuaram de forma dose-dependente, os espermatozóides tratados apresentaram menor taxa de capacitação espermática, de hiperatividade e de fecundação *in vitro*. O Experimento II demonstrou que os machos dos grupos tratados tiveram menor taxa de capacitação espermática, de hiperatividade e de fertilidade *in vitro* em relação ao grupo controle, e nos grupos verapamil e nifedipina houve uma redução da fertilidade refletida no número de fêmeas paridas em relação ao grupo controle e diltiazem. No Experimento III, notou-se que os fármacos causaram um bloqueio do influxo de cálcio extracelular nos espermatozóides (grupo controle = 2,51 μ M; verapamil = 0,45 μ M; nifedipina = 0,46 μ M, diltiazem = 0,40 μ M). Concluiu-se que os espermatozóides possuem em sua membrana plasmática canais de íons cálcio sensíveis aos bloqueadores de canais de cálcio voltagem-dependentes do tipo-*L*, e que estes antagonistas atuaram negativamente na motilidade e hiperatividade espermáticas, taxa de capacitação, reação acrossomal e na fecundação *in vivo* e *in vitro* e, finalmente, que a terapia com bloqueadores de canais de cálcio voltagem-dependentes do tipo-*L* reduziu a fertilidade de machos hamsters.

* Suporte financeiro: FAPESP - São Paulo, Brasil.

INFLUÊNCIA DA VOLTAGEM DE ELETROPORAÇÃO NA VIABILIDADE ESPERMÁTICA PARA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES EM BOVINOS

Simões, R.; Binelli, M.; Nicacio, A.C.; Yamada, C.; Milazzotto, M.P.; Rovegno, M.; Visintin, J.A.; Assumpção, M.E.O.A.

Departamento de Reprodução Animal FMVZ – USP, São Paulo-SP, Brasil resimoes@usp.br

O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes voltagens de eletroporação para otimizar a produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos. O sêmen foi descongelado e submetido ao gradiente Percoll (45/90%) a 600g por 30 minutos. A eletroporação foi realizada com diferentes voltagens (100V, 500V, 750V, 1000V ou 1500V), capacitância de 25 μ F, tempo de 12mseg e concentração de 5x10⁶espermatozoides por grupo, em quatro repetições. Espermatozoides não eletroporados foram usados como controle. Oócitos de ovários de matadouro foram maturados *in vitro* no meio TCM199 + 10%SFB + FSH + HCG + E₂ em estufa a 39°C, alta umidade e 5%CO₂ em ar, por 24hs. Após a eletroporação, os espermatozoides foram lavados no meio Talp sêmen por centrifugação a 200g por 5 minutos, sendo utilizadas 1x10⁵ células para inseminar 20 oócitos maduros/microgota por 18hs. Os presumíveis zigotos foram co-cultivados em meio SOFaa com monocamada de células da granulosa a 39°C, alta umidade e 5%CO₂ em ar. Os índices de blastocisto (%BL) e de eclosão (%BE) foram avaliados, respectivamente, nos dias 9 e 12 após a inseminação, sendo analisados por ANOVA. As variáveis independentes foram repetição e voltagem. Os índices de BL e de BE variaram de 17,2 a 45,1% e de 39,7 a 98,8%, respectivamente, entre as repetições (p<0,03). Os índices de BL e de BE diminuíram com o aumento da voltagem, observando queda acentuada a partir de 500V (p<0,04). Em conclusão, estes resultados indicam que a eletroporação não otimiza a PIV de embriões em bovinos, contudo baixas voltagens podem ser úteis para a PIV de embriões bovinos transgênicos já que a eletroporação é um método que otimiza a incorporação de DNA pela célula.

Suporte financeiro FAPESP 03/08542-5 e 03/07456-8

INFLUÊNCIA DA RAÇA DO TOURO E DA RAÇA DA VACA NA RESISTÊNCIA DE EMBRIÕES BOVINOS AO ESTRESSE TÉRMICO *IN VITRO*, DURANTE A FASE INICIAL DE DESENVOLVIMENTO

Eberhardt, B.G.¹; Satrapa, R.A.^{2a}; Capinzaiki, R.L.¹; Barros, C.M.¹

¹Depto. de Farmacologia, IB-UNESP, ²Depto. de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ/UNESP. brunogiorno@yahoo.com.br

Vários trabalhos indicam que embriões *Bos indicus* são mais tolerantes ao estresse térmico (ET) que embriões *Bos taurus*. Recentemente, foi levantada a hipótese de que o oócito desempenharia papel preponderante, em relação ao espermatozóide, no desenvolvimento de tolerância ao choque térmico. Este trabalho foi delineado para avaliar tanto a influência do oócito como do sêmen na resistência de embriões *Bos indicus* (Nelore), *Bos taurus* (Holandês e Angus) e mestiço, submetidos à ET durante a fase inicial de desenvolvimento *in vitro*. No Experimento 1, oócitos de vacas Nelore (N) e mestiças (M) foram coletados em abatedouro e fertilizados com espermatozoides de dois touros da raça Nelore (N) e dois touros da raça Angus (A). Os embriões foram distribuídos em tratamento controle (39°C) ou EC 12, 48 ou 96 horas pós-inseminação (ET 12, 48 ou 96 hpi; 41°C por 12 h). As taxas de clivagem e proporção de embriões que se desenvolveram até as fases de blastocisto e blastocisto eclodido foram registradas nos dias 2, 8 e 10, respectivamente. O ET 12, 48 e 96 hpi não diminuiu as taxas de clivagem em nenhum grupo ($p > 0,05$). Entretanto, o ET 12 e 48 hpi reduziu a porcentagem de embriões Nelore e mestiços fertilizados com sêmen de touro Nelore ou Angus que se desenvolveram até blastocisto (NxN=47,8 vs 35,3, NxA=52,6 vs 35,7, MxN=62,8 vs 30,2 e MxA=57,5 vs 34,8; $p < 0,05$, 12 hpi; NxN=61,6 vs 51,7, NxA=61,1 vs 44,4, MxN=55,7 vs 44,0 e MxA=55,8 vs 40,5; $p < 0,05$, 48 hpi, onde a primeira letra representa a raça da vaca e a segunda a do touro), porém o ET 96 hpi não diminuiu as taxas de blastocisto em nenhum dos grupos, exceto no Grupo MxA (NxN=39,1 vs 34,9, NxA=45,8 vs 40,2, MxN=43,5 vs 36,5, $p > 0,05$; MxA=45,0 vs 34,3, $p < 0,05$; 96 hpi). No Experimento 2, oócitos de vacas Nelore e Holandesa foram fertilizados com sêmen de touros Nelore ou Angus, e submetidos a ET por 12 h a 96 hpi. O ET a 96 hpi diminuiu as taxas de blastocisto somente nos grupos em que se utilizou oócitos de vacas Holandesas (HxA=27,9 vs 12,7 e HxN=30,8 vs 22,7; $p < 0,05$, 96 hpi). Houve interação entre raça da vaca e raça do touro, sendo que embriões HxN foram mais resistentes ao ET que embriões HxA (30,8 vs 22,7 e 27,9 vs 12,7, controle vs EC, $p < 0,05$). Conclui-se que embriões Nelore são mais resistentes ao estresse calórico que embriões da raça Holandesa ou mestiços, durante a fase inicial de desenvolvimento *in vitro*. Além disso, a resistência ao ET resultou da contribuição genética do oócito e do espermatozóide, uma vez que oócitos de vacas Holandesas fertilizados com sêmen Nelore foram mais resistentes ao estresse calórico (12 h, 96 hpi) que aqueles fertilizados com sêmen Angus.

^aBolsista da Fapesp.

DIFERENÇAS NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE BLASTOCISTOS EXPANDIDOS, BLASTOCISTOS E BLASTOCISTOS INICIAIS ENTRE 29 TOUROS TESTADOS.

Elias, F.P.¹; Fernandes, M.B.¹; Queiroz, L.F.M.²; Vila, R.A.¹; Galerani, M.A.V.¹;
Nomelini, J.¹; Vozzi, P.A.¹; Lôbo, R.B.¹

¹Departamento de Genética/BlocoC – FMRP/USP, Ribeirão Preto – SP, Av. Bandeirantes, 3900, 14040-030, Brasil. ²Associação Nacional de Criadores e Pesquisadores, Ribeirão Preto – SP, R. João Godoy, 463,14020-230, Ribeirão Preto – SP, Brasil. fpelias@genbov.fmrp.usp.br

A chance de um embrião produzido *in vitro* resultar em uma prenhez, após sua transferência para receptora depende, dentre outros fatores, do seu estágio de desenvolvimento no momento de sua transferência para a receptora (Dayan, A., Theriogenology, vol. 57, p. 242, 2002). Diante disso, este trabalho teve por objetivo avaliar não somente a produção *in vitro* total de embriões (Fertilidade *in vitro*), mas também a produção de embriões nos estágios de Blastocistos Inicial (Bi), Blastocisto (Bl) e Blastocisto expandido (Bx) para cada um dos 29 touros jovens testados do Programa de Melhoramento Genético da Raça Nelore coordenado pelo Departamento de Genética da FMRP-USP. Para tanto, coletou-se 4666 óocitos de ovários oriundos de matadouro e maturados em meio TCM 199 + 10% SFB + 0,5µg FSH/ml + 0,5µl LH/ml + 1 µg estradiol/ml, por 24h a 38, 5°C, 5% CO₂ em atmosfera. Obtiveram-se espermatozoides viáveis por centrifugação em gradiente de Percoll (45 e 90%) e foram utilizados para Fecundação *in vitro* numa concentração de 2 milhões de sptz/ml em meio TALP + 10µg de Heparina/ml. Após 18h, os supostos zigotos foram co-cultivados em meio de cultivo CR₂ + 10% SFB com células do cumulus. No 4º dia de cultivo realizou-se o descolamento dos embriões do tapete de células formado, remoção dos embriões com número de células inferiores a 16 e acréscimo de meio de cultivo. Após 163h da fertilização, classificou-se os embriões viáveis em Bx, Bl e Bi. Os touros foram escolhidos ao acaso para cada experimento e testados em 3 experimentos distintos. Os testes Qui-Quadrado e Coeficiente de Correlação de Spearman foram feitos pelos Procedimentos Freq e Corr (SAS Online Doc. Version 8. SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA, 1999), respectivamente. Há diferença significativa (p<0,01) entre touros para Fertilidade *in vitro*, proporções de embriões nos estágios de Bx e Bi. Há correlação entre a Fertilidade *in vitro* e a produção de embriões no estágio de Bl (r =0,82; p<0,01) e de Bx (r =0,40; p=0,03), em relação ao número total de óocitos fecundados, mas não em relação ao número total de embriões. Ou seja, animais de mesma Fertilidade *in vitro* podem apresentar diferenças nas proporções de Bx e Bi em relação ao número de embriões totais e conseqüentemente, diferentes taxas de prenhezes. A informação da Fertilidade *in vitro* de um touro associada ao seu desempenho na produção de embriões nos estágios de Bx é de grande interesse para núcleos de seleção que utilizam o sistema de produção *in vitro* de embriões, haja vista que este estágio de desenvolvimento é o que possui maior chance de prenhez após a transferência do embrião para a receptora.

Agradecimentos: PRONEX; FAPESP; CNPq; ANCP.

VARIAÇÃO DE TOUROS NA PRODUÇÃO *IN VITRO* E A INTERAÇÃO COM DIFERENTES DOADORAS

Accorsi, M.F.¹; Gonçalves, D.D.¹; Ferraz, M.L.¹; Watanabe, M.R.¹; Meirelles, F.D.P.²;
Meirelles, F.V.²; Watanabe, Y.F.^{1,2}

¹Vitrogen® Pesquisa e Desenvolvimento em Biotecnologia da Reprodução, Cravinhos–SP, Brasil.

²Depto de Ciências Básicas da FZEA-USP, Pirassununga-SP, Brasil. monica@vitrogen.com.br

A produção *in vitro* (PIV) de embriões vem sendo utilizada rotineiramente em larga escala comercial, em animais de alto valor zootécnico, onde é possível observar uma variação na produção dos diferentes animais (doadoras e touros). O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de embriões e prenhez dos touros mais utilizados em trabalhos comerciais e, conseqüentemente, a interferência das doadoras neste processo. Os oócitos foram obtidos por aspiração folicular (OPU) com o auxílio de um transdutor vaginal acoplado a um ultra-som e selecionado segundo sua morfologia e, posteriormente, seguiram para o processo de maturação. Na MIV (maturação *in vitro*), os oócitos permaneceram 22-24 horas em meio TCM199 acrescido de FSH/LH/Estradiol + 10% SFB a 38,8°C em 5% CO₂ em ar. Após esse período, os oócitos já maturados seguiram para gotas de meio FIV (TALP acrescido de BSA, PHE e heparina numa concentração de 10µg/ml) contendo 1x10⁶ espermatozóides móveis/ml, o qual foi preparado em gradiente Percoll (45 e 90%). Entre 20 a 22 horas os zigotos foram cultivados em microgotas de meio CR2 + 10% SFB em co-cultura com células da granulosa. Somente os embriões desenvolvidos até mórulas e blastocistos e de boa qualidade foram transferidos para receptoras devidamente sincronizadas. Foram considerados 9 touros acasalados com 139 doadoras em 1.021 sessões de OPU, onde obteve-se 16.800 oócitos viáveis, 5.929 embriões (35,3%), dos quais 5.437 foram transferidos resultando em 1.977 prenhez (36,4%). Os dados foram analisados por ANOVA e as médias comparadas pelo teste de TUKEY-KRAMER HSD. De acordo com os resultados observamos uma variação altamente significativa (P<0,0001), entre os touros quanto à taxa de embriões (27,5±1,5% a 44,4±2,2%), prenhez (25,8±1,7% a 48,7±1,9%) e também na média de prenhez por touro a cada sessão de aspiração, (1,6±0,1 até 4,1±0,3). Avaliando alguns acasalamentos foi possível observar que as doadoras foram fontes de variação entre o mesmo touro. O touro F que apresentou uma média de prenhez de 27,7% (467/1.507) foi acasalado com 36 doadoras em 287 repetições, apresentando uma variação de 0,0 (0/22) a 55,4% (46/83). O mesmo ocorreu com o touro A, acasalado com 6 doadoras em 31 repetições, com produção média de prenhez de 43,2% (189/282), e variação entre as doadoras de 17,6 (6/34) a 60,7% (21/34). Em conclusão, houve uma diferença estatística significativa entre os touros quanto à produção de embriões, prenhez e média de prenhez por sessão de aspiração folicular. Além disso, as doadoras interferem significativamente na produção dentre o mesmo touro, assumindo a interação vaca x touro como uma influência importante no resultado da produção *in vitro* de embriões comerciais.

EFEITO TOURO NA TAXA DE DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES *IN VITRO* ORIGINADOS DE PUNÇÃO FOLICULAR GUIADA POR ULTRA-SOM

Morelli Júnior, J.¹; Atique Netto, H.¹; Martins, A.R.¹; Prado, R.B.¹; Fazio, F.L.¹

¹ Centro Universitário de Rio Preto – Hospital Veterinário “Dr. Halim Atique”, UNIRP, São José do Rio Preto - SP, 15025-400, Brasil. halimnetto@unirpnet.com.br

A produção *in vitro* de embriões (PIV) é uma técnica largamente utilizada comercialmente e em estudos de maturação e fecundação de oócitos, capacitação espermática, cultivo de embriões, clonagem, sexagem de embriões, transferência de genes, microinjeção de espermatozoides, congelamento e descongelamento de espermatozoides, oócitos e embriões. Quando as condições de fertilização *in vitro* são ajustadas, há diferenças entre os touros nas taxas de fecundação, desenvolvimento de blastocistos, eclosão e conseqüentemente na competência destes embriões (SHI et al., 1990; KREYSING et al., 1997; ACCORSI, 2000). Espermatozoides de sêmen congelado e descongelado são largamente utilizados em programas de PIV devido a sua viabilidade e conveniência prática (LEIBFRIED-RUTLEGE, 1999). O propósito deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes touros na produção de embriões *in vitro* (PIV). Foi utilizado sêmen de 16 touros da raça Nelore Padrão, testados em relação à fertilidade no campo (inseminação artificial) comercializados em centrais devidamente regularizadas pela ASBIA (Associação Brasileira de Inseminação Artificial, Uberaba - MG, Brasil), sendo submetidos à fertilização *in vitro*. As 54 doadoras utilizadas são pertencentes à Fazenda Chácara Mata Velha (BR 0,50, Km 192), localizada no município de Uberaba – MG, Brasil, essas com idades entre 25 e 218 meses e com fertilidade comprovada na propriedade (anamnese e exame ginecológico). A Aspiração Folicular Guiada por Ultra-Som - OPU (Ovum Pick-UP) foi feita com auxílio de um aparelho de ultra-som (aloka SSD-500V) e com uma probe convexa de 5MHz acoplada a uma bomba de vácuo (cook – 75 mm Hg), as vacas não foram submetidas à aplicação de gonadotrofinas. Após cada sessão de aspiração os oócitos foram selecionados quanto a sua morfologia e imediatamente encaminhados para o laboratório onde seguiam-se a maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV). Resultados mostraram uma porcentagem de embriões para o touro 1 de 7,69% (amplitude mínima) sendo 39 oócitos, 13 oócitos viáveis resultando em 1 embrião, e para o touro 16 encontramos 65% (amplitude máxima) com 28 oócitos, 20 oócitos viáveis originando 13 embriões. Obteve-se uma taxa média dos touros na fertilização *in vitro* até a produção de embriões de 42,49%. Ao realizar o teste não paramétrico do Qui-quadrado ($32,83 > 30,57$), $gl = 15$; $p < 0,01$, observou-se que há diferença significativa entre os touros para esta característica. Este trabalho ressalta a importância na seleção de touros para utilização em programas de produção *in vitro* de embriões.

ACCORSI, M.F. Relatório Final; Iniciação Científica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, 2000.

LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L. *Theriogenology*, vol. 51, p.473-85, 1999.

KREYSING, U.; NAGAI, T.; NIEMANN, H. *Reprod Fertil Dev*; vol.9(4), p.465-74, 1997.

SHI, DS.; LU, K.H.; GORDON, I. *Theriogenology*, vol.33, p. 324, 1990.

EFEITO DA PRESSÃO DE ASPIRAÇÃO FOLICULAR SOBRE A TAXA DE RECUPERAÇÃO E A QUALIDADE DO COMPLEXO CUMULUS-OÓCITO DE CABRAS E OVELHAS EXPLORADAS NO NORDESTE DO BRASIL

Paula, N.R.O.; Magalhães, D.M.; Arruda, I.J.; Andrade, M.L.L.; Souza, A.L.; Pereira, A.F.; Almeida, K.C.; Avelar, S.R.G.; Silva, J.D.A.; Rondina, D.; Freitas, V.J.F.

Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução - FAVET/UECE, 60740-000, Fortaleza-CE, Brasil. neyromulo@uece.br

A aspiração folicular é a primeira etapa do processo de produção *in vitro* de embriões (PIV). Neste sentido, o sucesso da aspiração folicular implica em um maior número de estruturas viáveis colhidas, o que auxilia na otimização das etapas de maturação, fecundação e cultivo *in vitro* de embriões. No entanto, existem poucos dados na literatura relativos à determinação de uma pressão ótima para punção folicular em pequenos ruminantes. Este trabalho objetivou verificar o efeito da pressão exercida em bomba de vácuo, durante a punção folicular, sobre a taxa de recuperação e qualidade dos complexos cumulus-oócito (CCO's) em cabras e ovelhas sem raça definida (SRD) exploradas no Nordeste do Brasil. O experimento foi conduzido no Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução (FAVET/UECE). Foram utilizados 54 pares de ovários colhidos em abatedouro local e oriundos de ovelhas (27 pares) e cabras (27 pares) SRD, exploradas no semi-árido do Estado do Ceará. Os ovários foram transportados para o laboratório em recipiente térmico contendo solução salina aquecida a 37 °C. No laboratório, os ovários foram transferidos para outro recipiente em banho-maria contendo nova solução salina aquecida a 37 °C. A punção folicular foi realizada através de uma bomba a vácuo (GenX international, Pioneer Pro-Pump, EUA) acoplada a uma agulha 18 G. Para cada espécie, os ovários foram equitativamente divididos em três grupos de diferentes pressões (50, 100 e 150 mmHg). Após as punções, o lavado folicular foi colocado em placa de Petri e examinado sob estereomicroscópio (Nikon, SMZ-1B, Japão). Foi observada a taxa de colheita (número de CCO's/ ovário), bem como o grau da qualidade dos CCO's: grau I (oócito contornado com três ou mais camadas de células do cumulus); grau II (oócito contornado com uma a duas camadas de células do cumulus); grau III (oócito desnudo) e grau IV (oócito degenerado ou com zona pelúcida rompida). A eficiência das diferentes pressões foi comparada utilizando o teste do Qui-quadrado ($P < 0,05$). Nas cabras foi obtido um maior número de estruturas recuperadas nas pressões de 100 ($n=93$) e 150 ($n=79$) mmHg, verificando-se uma taxa média de colheita de 3,22; 5,17 e 4,39 para as pressões de 50, 100 e 150 mmHg, respectivamente. No que se refere à qualidade, foi observado a presença de CCO's de grau I apenas na pressão de 50 mmHg, além de um maior número de estruturas de grau II para esta pressão. Já para as ovelhas, a taxa média de colheita foi de 2,00; 2,22 e 1,83 para as pressões de 50, 100 e 150 mmHg, respectivamente. Em adição, observou-se um maior número de CCO's de qualidade inferior na pressão de 150 mmHg. Portanto, para cabras e ovelhas SRD exploradas no Nordeste do Brasil a pressão de 50 mmHg demonstrou ser a ideal para a obtenção de CCO's viáveis para ser utilizada nas etapas posteriores da produção *in vitro* de embriões.

ASPIRAÇÃO FOLICULAR EM FÊMEAS CAPRINAS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE LAPAROSCOPIA

Cordeiro, M.F.¹; Vicente, W.R.R.¹; Di Filippo, P.A.¹; Alves, A.E.¹; Ribeiro, G.¹; Pavão, G.D.¹; Dias, D.P.M.¹; Dória, R.G.S.¹; Beretta, C.A.G.¹; Pereira, R.F.S.¹; Sousa, R.A.F.¹

¹Departamento de Reprodução Animal – FCAV/UNESP, Jaboticabal – SP, 14884-900, Brasil.wilter@fcav.unesp.br

A laparoscopia tem ganhado destaque dentre as técnicas cirúrgicas para obtenção de oócitos em pequenos ruminantes por ser menos invasiva e ter menor tempo de execução, reduzindo o estresse sofrido pelo animal (BALDASSARRE *et al.*, 2002, *Theriogenology*, v.57, p.275-284; KÜHHOLZER *et al.*, 1997, *Theriogenology*, v.48, p.545-550). Este trabalho teve como objetivo avaliar a técnica de laparoscopia para aspiração folicular de cabras jovens e adultas submetidas a repetidas intervenções. Foram colhidos oócitos de seis cabras (três adultas e três jovens) uma vez por semana durante seis semanas, totalizando 36 laparoscopias. Através de três punções no abdome (região cranial ao úbere) foram introduzidos trocartes para a colocação do endoscópio, da pinça de manipulação atraumática e da agulha de aspiração conectada a um sistema de vácuo. O abdome foi insuflado com CO₂, utilizando-se uma pressão total de 6 a 8mmHg para as cabras jovens e 10 a 12mmHg para as adultas. Para introdução da agulha de aspiração no interior da cavidade, sem que houvesse riscos de perfuração de órgãos abdominais, utilizou-se uma bainha plástica. O ovário era seguro pela pinça atraumática e ponta da agulha era exposta somente ao aproximar-se do folículo a ser aspirado. Ao final da aspiração, os ovários eram banhados com solução de PBS heparinizado a fim de evitar futuras aderências. O líquido aspirado foi levado ao estereomicroscópio e os oócitos encontrados foram classificados de acordo com a qualidade e transferidos para placas de cultivo em meio de maturação sob óleo mineral, durante 27 horas, a 39°C, em estufa com 5,0% de CO₂ em ar e atmosfera úmida. Ao final do cultivo, todos os oócitos foram fixados para posterior observação do estágio de maturação nuclear. O número total de oócitos recuperados foi em média de 26/cabra. A taxa de colheita foi considerada baixa tanto no grupo adulto (42,65%) quanto no grupo jovem (26,15%), o que pode ter sido atribuído ao número de folículos puncionados que foi inferior ao número de folículos observados, bem como ao calibre da agulha (18G) que prejudicou a aspiração de folículos pequenos (<5mm). A pressão utilizada no vácuo causou o desnudamento de alguns oócitos comprometendo sua qualidade. Contudo, a taxa de maturação foi considerada satisfatória, não havendo diferença estatística entre o grupo jovem (64,3%) e o adulto (78,5%). Não foi observada formação de aderências entre as estruturas do sistema genital e destas com outros órgãos na grande maioria das fêmeas. As punções na pele cicatrizavam já no terceiro dia pós-operatório. Ao longo do experimento, notou-se que a experiência do operador e o entrosamento da equipe reduziram o tempo das laparoscopias ficando em média 35 minutos por intervenção. A técnica de laparoscopia para aspiração folicular mostrou ser segura, podendo ser utilizada diversas vezes na mesma fêmea em um curto intervalo de tempo.

EFEITO DO LH NA QUALIDADE DE OVÓCITOS OBTIDOS POR MEIO DA OPU EM ANIMAIS DA RAÇA GUZERÁ.

Ueno, V.G.¹; Fontes, R.S.¹; Fonseca, F.A.²; Gama Filho, R.V.²; Bucher, C. H.¹; Ramos, J.L.G.¹; Carvalho, C.S.P.¹; Shimoya, A.³

¹Laboratório de Melhoramento Genético Animal, UENF, Campos-RJ, Brasil ²Laboratório de Zootecnia e Nutrição Animal, UENF, Campos-RJ, Brasil ³Laboratório de Estatística, Universo, Campos-RJ, Brasil vanessaueno@hotmail.com

O presente experimento objetivou avaliar o efeito do LH na qualidade dos ovócitos obtidos de folículos ≤ 6 mm e > 6 mm por meio da OPU em animais da raça Guzerá. Todos os animais (n=8) foram sincronizados por meio da inserção de um dispositivo liberador de progesterona (CIDR-B[®]), durante nove dias, juntamente com aplicação de 2 mg de benzoato de estradiol (Estrogin[®]), em qualquer fase do ciclo estral, considerado o dia zero (D0). Cinco dias após a inserção do CIDR (D5), foi iniciado o tratamento estimulatório com a dosagem total de 100 mg de FSH (Folltropin-V[®]) durante três dias consecutivos em intervalos de 12 horas entre as aplicações, sendo realizada a aplicação de 500 μ g de PGF2 α (Ciosin[®]) 48 h após o início da aplicação do FSH. No grupo I (controle, n=4), os animais receberam somente a aplicação de FSH e, no GII (LH, n=4), foi realizada a administração de FSH associada à aplicação intramuscular de 25 mg de LH (Lutropin[®]) 6 horas antes da OPU. Em ambos os grupos, a OPU foi realizada 48 horas após a última aplicação de FSH. Os dados foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey. Pode ser observada diferença significativa entre os tamanhos de folículos no grupo LH, com total de ovócitos e número de ovócitos de graus I e II provenientes de folículos ≤ 6 mm ($16 \pm 3,82$ e $8,0 \pm 1,61$) e > 6 mm ($7,3 \pm 4,61$ e $3,7 \pm 1,5$). Quanto ao grupo-controle, não foi observada diferença significativa entre os tamanhos de folículos ≤ 6 mm ($8,3 \pm 5,18$ e $3,5 \pm 1,20$) e > 6 mm ($6,0 \pm 2,94$ e $2,5 \pm 1,0$) no total de ovócitos e no número de ovócitos de graus I e II. Com os resultados obtidos neste trabalho, pode ser sugerido que o protocolo utilizado associado à aplicação de LH proporciona o aumento no número e na qualidade de ovócitos de grau I e II.

OBTENÇÃO DE OÓCITOS E PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES EM VACAS NELORE (*Bos taurus indicus*) TRATADAS COM FSH PREVIAMENTE À ASPIRAÇÃO

Nonato Junior, I.¹; Pontes, J.H.F.¹; Ereno Jr., J.C.¹; Sanches, B.V.¹; Seneda, M.M.²

¹In Vitro Brasil, Mogi Mirim-SP, 13800-970, Brasil. ²Departamento de Clínicas Veterinárias – CCA/UEL, Londrina-PR, Brasil. ismael@invitrobrasil.com.br

Com os avanços das biotécnicas reprodutivas, a produção de embriões apresenta-se em expansão, verificando-se expressivo crescimento na América Latina, particularmente no Brasil (REINCHENBACH, *Acta Scientiae Veterinariae*, v.31, p.15-27, 2003). O objetivo deste trabalho foi avaliar a obtenção de oócitos e a produção *in vitro* de embriões em vacas Nelore tratadas com FSH de maneira intercalada previamente a aspiração folicular. Cinco doadoras foram submetidas a 26 sessões de aspiração folicular, constituindo um grupo controle (GC) e um grupo tratamento (GT), sendo que todas as doadoras foram aspiradas nos dois grupos. Durante o tratamento, um implante auricular contendo 3 mg de Norgestomet (Crestar, Intervet, Boxmeer, Holanda) foi colocado no dia 0 (D0) nas doadoras que não encontravam-se ciclando, e o folículo dominante foi aspirado no dia 3 (D3). Entre o dia 4 (D4) e o dia 6 (D6), 50 mg de FSH (Folltropin, Vetrepharm, Belleville, Canadá), i.m., foram administradas em duas doses com intervalo de 12 horas, e, 36 após, foi realizada a retirada do implante auricular e a aspiração folicular. Obteve-se média de 29,30 oócitos/aspiração para o GC, e 24,90 oócitos/aspiração para o GT. As taxas de produção embrionária foram de 28,9 % (48/166) para o GC e 39,0% (23/59) para o GT. A administração prévia de FSH na aspiração folicular não aumentou a média de oócitos obtidos, porém, aumentou a taxa de produção embrionária, o que é benéfico para a tecnologia de produção *in vitro* de embriões.

INFLUÊNCIA DO ESTRESSE TÉRMICO CALÓRICO NA TAXA DE FORMAÇÃO DE BLASTOCISTOS DE EMBRIÕES BOVINOS (INDICUS VS TAURUS) PRODUZIDOS A PARTIR DE OVÓCITOS OBTIDOS DE ASPIRAÇÃO FOLICULAR (OPU)

Sartorelli, E.S.^{1a}; Barcelos, A.C.^{2b}; Satrapa, R.A.^{1a}; Nogueira, M.F.G.^{1a}; Martins, D.F.²; Eberhardt, B.G.^{1a}; Potiens, J.R.³; Seneda, M.M.⁴; Barros, C.M.²

¹ Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ/UNESP; ² Departamento de Farmacologia, IBB/UNESP, Botucatu-SP, 18618-000, ³ Central Bela Vista (Pardinho, SP),

⁴ Departamento de Clínicas Veterinárias, CCA, Universidade Estadual de Londrina, PR, 86051-990, Brasil. essartorelli@yahoo.com.br

Existem evidências de que os efeitos deletérios do estresse térmico calórico (ETC) sobre a fertilidade são menos pronunciados em *Bos indicus* que em *Bos taurus*, devido primariamente às diferenças na capacidade de termoregulação. No presente trabalho, a resistência ao ETC de embriões Nelore (*Bos indicus*) foram comparados ao das raças *Bos taurus* não adaptadas (Angus) ou adaptadas (Bonsmara) a altas temperaturas. No experimento 1 (Nelore vs Angus) e 2 (Nelore vs Bonsmara) os oócitos obtidos pela OPU foram maturados (TCM199), fecundados e cultivados (SOFaaci) *in vitro*. Noventa e seis horas pós-inseminação (hpi), os embriões maiores de 16 células foram separados ao acaso em dois grupos: Grupo Controle (mantidos todo o tempo à 39°C) e Grupo ETC (colocados a 41°C por 12 horas e depois retornaram a 39°C). No sétimo dia de cultivo, foram avaliadas as taxas de formação de blastocistos. No experimento 1, foram utilizados 294 ovócitos da raça Nelore e 144 da raça Angus, sendo que 67,89% e 59,40% dos mesmos clivaram, respectivamente. No quarto dia de cultivo (96hpi), os embriões com mais de 16 células foram divididos em 4 grupos: Nelore controle (n=97), Nelore ETC (n=95), Angus controle (n=34) e Angus ETC (n=25). As taxas de formação de blastocistos foram de 39/97(40,21%), 23/95(24,21%), 19/34(55,88%) e 8/25(32,00%), respectivamente. A queda na produção de blastocistos causada pelo ETC, na raça Nelore (16%) e Angus (23%) foi próxima da significância (ANOVA; p=0,069) e sugere que embriões da raça Nelore podem ser mais tolerantes ao ETC que embriões Angus, produzidos a partir de oócitos obtidos pela OPU. No entanto, é necessário aumentar o número de blastocistos por grupo para caracterizar melhor o efeito do ETC nos embriões. No experimento 2, foram utilizados 294 oócitos da raça Nelore e 101 da raça Bonsmara, sendo que 41,21% e 51,20% dos mesmos clivaram, respectivamente. No quarto dia de cultivo (96hpi), os embriões com mais de 16 células foram divididos em 4 grupos: Nelore controle (n=44), Nelore ETC (n=49), Bonsmara controle (n=22) e Bonsmara ETC (n=22). As taxas de formação de blastocistos foram de 35/44(79,50%), 30/49(61,22%), 10/22(45,50%) e 6/22(27,30%), respectivamente. Apesar da raça Bonsmara apresentar taxa de blastocistos menor que à Nelore, a queda causada pelo ETC foi similar entre as raças Nelore (18,3%) e Bonsmara (18,2%). Mais aspirações foliculares estão sendo realizadas, para testar a hipótese de que a termotolerância de embriões Nelore é similar à de raças *Bos taurus* adaptadas a altas temperaturas (Bonsmara) e superior à de embriões de raças não adaptadas (Angus).

Bolsistas da FAPESP^a e CAPES^b

USO DA ÁGUA DE COCO COMO MEIO DE MANUTENÇÃO NO TRANSPORTE DE OVÓCITOS BOVINOS IMATUROS

Cordeiro, M.S.¹; Silva*, E.H.S.¹; Biondi, F.C.¹; Miranda, M.S.¹; Pauxis*, D.R.¹;
Santos, S.S.D.²; Andreoti, M.¹; Ohashi, O.M.¹

¹Laboratório de Fertilização *in vitro* - CCB/UFPA, Belém-PA, Brasil. ²Departamento de Histologia e Embriologia - CCB/UFPA, Belém-PA, Brasil. * Bolsista PIBIC - CNPq marcela@ufpa.br

O desenvolvimento de um meio de manutenção que forneça maior viabilidade aos ovócitos durante o transporte é um passo importante para a aplicabilidade comercial da Produção *in vitro* de embriões (PIVE). O estresse causado pelas condições e tempo de transporte é um dos fatores limitantes para a manutenção da qualidade ovocitária. Soluções a base de água de coco foram utilizadas na preservação de sêmen, manutenção e cultivo de células e tecidos de diversas espécies, na tentativa de preservar a viabilidade celular. O objetivo desse trabalho foi avaliar a eficiência da solução à base de água de coco como meio de manutenção para o transporte de ovócitos bovinos imaturos utilizados na PIVE. Para simular o transporte, ovócitos bovinos, obtidos de abatedouro, foram selecionados e distribuídos entre os Grupos: Controle - submetidos a MIV imediatamente após a seleção; Grupo 1 - mantidos em Meio 199 (Hepes) acrescido de 10% de SFB, antibióticos e piruvato, durante 6, 9 e 12 horas, protegidos da luz e à 30°C; e Grupo 2 - ovócitos mantidos em solução de água de coco (75% de água de coco + 25% de água ultrapura) com 25 mM de Hepes, 10% SFB, antibióticos e piruvato, durante 6, 9 e 12 h, sob as mesmas condições do Grupo 1. Após cada tempo, os ovócitos foram maturados em Meio 199 (Bicarbonato) com 10% SFB, hormônios, piruvato, insulina e 2 mercaptoetanol, em 5% de CO₂ a 38,5°C com atmosfera úmida, durante 18 h. Após a MIV, os ovócitos foram fertilizados *in vitro* e cultivados em meio CR2. Foram analisadas as taxas de clivagem, blastocisto e eclosão no 2º, 7º e 9º dia de cultivo, respectivamente. Comparações entre proporções foram feitas pelo teste de χ^2 , com nível de significância de 5%. A análise dos dados mostrou que quando comparados, os Grupos 1 e 2, a única diferença significativa encontrada foi no tempo de 12 h, onde os ovócitos expostos a solução de água de coco (Grupo 2) obtiveram maior capacidade de formação de blastocistos (49,18% vs. 26,67%). Para determinar se a viabilidade ovocitária foi prejudicada pelo tempo de transporte, os Grupos 1 e 2 foram comparados ao Grupo Controle. Nesta comparação, o Grupo 2 não diferiu em nenhuma das taxas testadas. Já na comparação com o Grupo 1, houve diferença, no tempo de 9 h, tanto para clivagem quanto para blastocisto (50,85% vs. 75% e 25,42% vs. 53,33%) e no tempo de 12 h, apenas para a taxa de blastocisto (53,33% vs. 26,67%). De acordo com os resultados, a água de coco pode ser usada na manutenção de ovócitos bovinos imaturos durante 12 h com menor perda na viabilidade ovocitária.

Suporte financeiro: CAPES, CNPq e Central Genética Campo de Boi.

INFLUÊNCIA DA ESTAÇÃO DO ANO NA PRODUÇÃO DE OÓCITOS EM VACAS DA RAÇA NELORE

Rubin, K.C.P.¹; Max, M.C.¹; Pontes, J.H.F.²; Nonato Jr., I.²; Ereno Jr., J.C.²; Uvo, S.²; Sanches, B.V.²; Rocha, J.L.³; Seneda, M.M.¹

¹Departamento de Clínicas Veterinárias, CCA, Universidade Estadual de Londrina, PR, 86051-990. karinac8@aol.com ² In Vitro Brasil – Central de Biotecnologia da Reprodução – Mogi Mirim ³ IAPAR – Instituto Agrônômico do Paraná – PR.

O presente trabalho teve por objetivo analisar a influência da estação do ano na produção de ovócitos em vacas da raça Nelore submetidas à aspiração folicular (AF). Foram realizadas 96 sessões de AF em 30 doadoras da raça Nelore, não gestantes, e com idade média de cinco anos. Em cada animal realizou-se em média 3,2 aspirações, sendo no mínimo uma e no máximo cinco, em um período aproximado de 4 meses. Das 96 coletas realizadas, 2463 ovócitos foram obtidos. Destes, 2192 oócitos foram classificados como viáveis (GI, GII, GIII) e 263 como inviáveis. Durante o período de primavera e verão foram realizadas 54 sessões e outras 42 no período de outono e inverno. No período de primavera e verão a média de ovócitos foi de 25,77 por sessão, dos quais 94,30% eram viáveis. No período de outono e inverno, obtêve-se média de 26,12 ovócitos por sessão e 83,06% de viáveis. Nos períodos analisados (primavera/verão ou outono/inverno), não houve diferença significativa ($p>0,05$) na produção média de ovócitos. Por outro lado, houve diferença significativa ($p\leq 0,05$) na porcentagem de ovócitos viáveis, sendo a melhor porcentagem encontrada nas estações primavera/verão. Os resultados sugerem um incremento na eficiência da obtenção dos oócitos com a concentração dos procedimentos de aspiração folicular, durante os meses mais quentes do ano, pela possibilidade de disponibilizar oócitos de melhor qualidade para a produção *in vitro* dos embriões. Outros aspectos, como a disponibilidade de forrageiras e a oferta de receptoras tendem a ser facilitados no mesmo período de primavera/verão, reforçando a perspectiva de otimização da produção *in vitro* de embriões neste período.

MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OVÓCITOS EQUÍNOS TRANSPORTADOS

Jáuregui Lorda, M.¹; Herrera, C.³; Pinto, M.¹; Losinno, L.²; Miragaya, M.H.¹

¹Area de Teriogenología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Buenos Aires, Argentina;

²Cátedra de Producción Equina, Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Rio Cuarto, Rio Cuarto, Argentina; 3. Halitus Biotecnología, Halitus Instituto Médico, Buenos Aires, Argentina

Condições ideais para maturação *in vitro* ovócitos equinos não estão ainda bem definidas. Existindo também poucas informações sobre fontes de energia e hormônios necessários para maturação *in vitro* do complexo-cumulus oócito equino (COCs). Sendo importante este conhecimento para produção *in vitro* de embriões através de injeção intra-citoplasmática de espermatozoides (ICSI). Desta forma poderemos melhorar a técnica de fertilização *in vitro* a qual não esta dominada em equinos como em outras espécies. O objetivo do presente trabalho foi induzir a maturação de ovócitos equinos de provenientes de ovários de matadouro e transportados em condições de temperatura controlada. Os ovários foram transportados para o laboratório a 25°C em solução fisiológica, duas horas após o sacrifício das éguas. Cada folículo entre 7 e 30 mm foi individualmente dissecado do ovário sendo raspado e lavado com solução de ringer com lactato heparinizada. COC's foram localizados com auxílio de um estereomicroscópio sendo classificados como compactos, expandidos e desnudos das células do cumulus. Tendo sido transportados em um recipiente adequado 38°C durante 8 hours, a uma distância de 600 Km em meio de cultura TCM199 contendo Hepes. Foram processados 503 ovários onde 1137 folículos foram obtidos e 904 ovócitos recuperados (79.5% de índice de recuperação de ovócitos por folículo), 364/904 apresentavam-se com as células do *cumulus* compactas (40.2%), 377/904 expandidos (41.7%) e 163/904 estavam desnudos (18.0%). TCM 199 contendo FSH 5µg/ml, LH 2µg/ml, IGF-1 100µg/ml, EGF 100ng/ml, e 10% FCS a 38°C em 5% CO₂ em ar, foi utilizado como meio de maturação *in vitro*. Compactos COC's foram cultivados por 36 h e os expandidos por 24 h. As células do Cumulus foram removidas com hialuronidase a 10% em PBS e aqueles que apresentavam um corpúsculo polar visível foram considerados como maduros. Um total de 220 oocytes forma colocados em cultivo depois que chegaram ao laboratório de destino (99 compactos COC's and 121 expandidos COC's). O percentual de oócitos em metaphase II foi de 84.0%, (185/220) sendo 41.0% (76/185) provenientes dos compactos e 58.9% (109/185) dos expandidos. Estes resultados demonstram que o sistema proposto permite um alto índice de maturação de ovócitos. Desta forma ovócitos transportados em um recipiente com controle de temperatura podem ser utilizados em programas de maturação *in vitro*. Podendo representar na melhoria de condições para aplicação de técnicas de reprodução assistida em cavalos.

AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO* (PIV) PROVENIENTES DE OÓCITOS EXPOSTOS EXPERIMENTALMENTE AO HERPESVIRUS BOVINO TIPO 1 (BHV-1) DURANTE O PERÍODO DE MATURAÇÃO

D'Angelo, M.; Athayde, C.S.; Souza, R.J.; Vieira, S.E.M.; Malaguti, J.M.A.; Rojas, N.;
Melo, G.M., Pavão, D.L.

Centro de P&D de Sanidade Animal do Instituto Biológico de São Paulo Av. Conselheiro Rodrigues
Alves, 1252, CEP 04014-002- São Paulo, BR dangelo@biologico.sp.gov.br

O BHV-1 causa a rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), podendo causar aborto e reabsorção embrionária. Devido ao crescente uso da PIV de embriões, surgiu a necessidade de estudos visando o controle sanitário dos mesmos. O objetivo desse trabalho foi avaliar o desenvolvimento de embriões oriundos de oócitos expostos ao BHV-1 durante o período de maturação e, posteriormente, fertilizados *in vitro*. Os parâmetros nessas avaliações foram alterações na morfologia e desenvolvimento dos embriões após o período de fertilização. Oócitos (n=264) aspirados de ovários provenientes de abatedouro foram divididos aleatoriamente entre os grupos controle (n=131) e grupo exposto (n=133) a 30µl da suspensão do BHV-1, da estirpe Colorado (ATCC-VR864, título $10^{5,1} \text{TCID}_{50/\text{mL}}$). Após 24 horas de maturação, foi feita a fertilização *in vitro* em meio HTF com 10%SFB e, nos dias 5 e 6, as estruturas em cultivo foram avaliadas e fotografadas em microscópio ótico invertido. Como resultados preliminares, verificou-se que no dia-5, no grupo infectado, somente 0,75% (n=1) dos zigotos atingiram o estágio de 2 células, e os demais apresentaram alterações morfológicas tais como retração e granulidade citoplasmática e espaço perivitelinico aumentado. No grupo controle, observou-se 45% (n=59) de clivagem, sendo 5% (n=6) das estruturas no estágio de 2 células, 29,5% (n=39) de 8 células e 10,5% (n=14) de mórulas iniciais. No dia-6, o grupo controle atingiu o estágio de mórula (38,9%; n=51). Esses resultados, possivelmente, indicam que o BHV-1 pode interferir na fertilização e/ou desenvolvimento de embriões *in vitro*. A relevância desses estudos está em elucidarmos as interações patógenos/gametas, no sentido de melhor atuarmos na prevenção e disseminação de doenças em técnicas de reprodução assistida em animais.

Apoio financeiro: Embriocare/Cultilab

AVALIAÇÃO DA MATURAÇÃO NUCLEAR DE OVÓCITOS DE CADELAS EM ESTRO E ANESTRO UTILIZANDO DOIS MEIOS DE CULTIVO

Martins, L.R.¹; Ponchirolli, C.B.¹; Beier, S.L.²; Landim-Alvarenga, F.C.¹; Lopes, M.D.¹

¹Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ Botucatu, Universidade Estadual Paulista, denise@fmvz.unesp.br

² Departamento de Anestesiologia – FM Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

O presente estudo objetivou avaliar a taxa de maturidade nuclear dos ovócitos provenientes de cadelas em estro e em anestro submetidos à maturação. Dois meios de cultivo foram utilizados, TCM 199 (*Tissue Culture Medium*) e SOF (*Synthetic Oviduct Fluid*). As fêmeas foram divididas em dois grupos; grupo 1, onze (11) cadelas em anestro e grupo 2, constituído de seis (6) cadelas em estro. Em cada grupo, os ovócitos foram removidos dos ovários e metade deles foi imediatamente corada com Hoechst 33342 e classificados como VG (vesícula germinativa), QVG (quebra da vesícula germinativa), MI (metáfase I) e D/NI (degenerados/não passíveis de identificação) e a outra parte foi maturada em SOF e em TCM 199 por 24 horas, corados e avaliados conforme descrição anterior. Foram recuperados 511 e 373 ovócitos grau I nos grupos 1 e 2 respectivamente. O número médio de ovócitos grau I obtidos por cadela no anestro foi de $46,45 \pm 25,23$. Para as fêmeas do grupo 2, este valor foi de $62,16 \pm 8,18$ ovócitos/cadela. Quando submetidos à maturação *in vitro* os ovócitos provenientes de fêmeas em estro e em anestro apresentam taxas de QVG semelhantes (21,68% TCM 199 e 23,61% SOF – anestro; 20% TCM199 e 23% SOF - estro), porém a taxa de MI foi superior no grupo de ovócitos provenientes de fêmeas em estro (9,79% TCM 199 e 9,72% SOF – anestro; 25% TCM 199 e 58% SOF – estro). O protocolo que utilizou ovócitos provenientes de doadoras em estro e maturação *in vitro* no SOF foi superior aos demais protocolos testados, demonstrando que a maturação ovocitária é beneficiada pela associação entre a fase do ciclo estral e o meio de maturação *in vitro* (58% MI). Pôde-se ainda evidenciar que em todos os protocolos testados, o tempo de maturação *in vitro* de 24 horas foi insuficiente para a obtenção da configuração nuclear de metáfase II.

Palavras-chave: Cadelas, Maturação; Ovócitos; Ciclo reprodutivo.

Apoio: CAPES

Agradecimento: Premier® Pet, pelo fornecimento de ração comercial.

DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DERIVADOS DE OÓCITOS BOVINOS MATURADOS EM MEIO SEM CONTROLE DA ATMOSFERA GASOSA

Jasmin.^{1,2}; Polisseni, J.¹; Torres-Júnior, J.R.S.¹; Sá, W.F.¹; Camargo, L.S.A.¹; Ferreira, A.M.¹; Folhadella, I.M.¹; Viana, J.H.M.¹; Ramos, A.A.³

¹ Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, 36038-330, Brasil. ² Universidade Federal de Ouro Preto (graduanda), MG, Brasil. ³ Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – EPAMIG, MG, Brasil. jasminjf@terra.com.br

O sucesso da produção *in vitro* de embriões pode ser influenciado pelo período de transporte dos oócitos até o laboratório, por afetar a maturação e conseqüentemente o desenvolvimento embrionário, sendo este um fator limitante na produção em escala comercial. O objetivo do presente trabalho foi avaliar um protocolo de maturação de oócitos bovinos, sem controle da atmosfera gasosa, por diferentes períodos de transporte. Os oócitos (n=552) recuperados de ovários bovinos coletados em matadouro foram selecionados e distribuídos aleatoriamente em três tratamentos: grupo controle - oócitos (n=192) maturados em meio TCM-199 com sais de Earle (Gibco Labs., Grand Island, NY) acrescido de 10% de soro de vaca em cio (SVC) e FSH, por 24h em estufa incubadora a 38,5°C, com 5% de CO₂ em ar atmosférico e 95% de umidade; grupo 12h – oócitos (n=175) maturados em tubos com meio TCM-199 com sais de Hanks e tamponado com HEPES (Gibco Labs., Grand Island, NY) acrescido de 10% de SVC e FSH, por 12h em banho-maria a 38,5°C, sem controle da atmosfera gasosa. Logo após este período, os oócitos foram transferidos para o meio de maturação, por mais 12h, nas mesmas condições do grupo controle, completando 24h de maturação; e no grupo 24h – oócitos (n=185) maturados em meio TCM-199 com sais de Hanks e tamponado com HEPES (Gibco Labs., Grand Island, NY) acrescido de 10% de SVC e FSH, por 24h em banho-maria a 38,5°C, sem controle da atmosfera gasosa. Os oócitos maturados foram fertilizados por espermatozoides obtidos pelo método de *swim up*. Após 22 horas de fecundação em meio FERT-TALP acrescido de 10 µl/ml de heparina, com uma dose inseminante de 2,0 x 10⁶ espermatozoides/ml, os possíveis zigotos foram co-cultivados com células da granulosa, em meio CR_{2aa}, acrescido de 10% de soro fetal bovino na estufa incubadora, nas mesmas condições atmosféricas do grupo controle. A avaliação da taxa de clivagem foi realizada 72 horas após a fecundação e a produção de blastocisto no sétimo e oitavo dias de cultivo, sendo a taxa de eclosão avaliada no décimo dia de cultivo. Os dados foram analisados pelo teste Qui-quadrado. Observou-se que o grupo controle apresentou maior taxa de clivagem (67,2%) em relação aos grupos 12h (P<0,05; 57,1%) e ao 24h (P<0,01; 48,1%), que por sua vez não diferiram entre si (P>0,05). A produção de embriões nos sétimo e oitavo dias e as taxas de eclosão no décimo dia, respectivamente, foram maiores no grupo controle (29,7%, 31,8% e 57,4%) do que no grupo 12h (P<0,05; 18,3%, 20,6% e 33,3%) e no grupo 24h (P<0,01; 13,0%, 14,6% e 22,2%), apesar de que as taxas de blastocistos e de eclosão não diferiram (P>0,05) entre os grupos 12h e 24h. Conclui-se que o protocolo de maturação sem controle de atmosfera gasosa sustentou o desenvolvimento embrionário, porém com taxas inferiores às do protocolo de maturação *in vitro* convencional.

ESTÍMULO DA SÍNTESE DE GLUTATIONA NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS *

Wolf, A.¹; Gabaldi, S.H.²; Perecin, F.³; Garcia, J.M.³

¹ Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária - FMVZ – UNESP, Botucatu-SP, Brasil. ² Departamento de Reprodução Animal - FMVZ – USP, São Paulo-SP, Brasil. ³ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal - FCAV – UNESP, Jaboticabal-SP, Brasil. wolfgabaldi@yahoo.com.br

As biotecnologias mais avançadas utilizam a produção *in vitro* (PIV) de embriões como suporte, a qual é realizada em três etapas igualmente importantes: maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV). O objetivo deste trabalho foi avaliar a MIV de oócitos bovinos na presença de estimuladores da síntese de glutationa (GSH), em substituição ao SFB. O meio TCM-199 (Gibco BRL Life Technologies™, Carisbad, USA), suplementado com bicarbonato de sódio (26mM), piruvato (0,25mM), sulfato de amicacina (75µg/mL), FSH (0,5µg/mL), hCG (100UI/mL) e estradiol 17β (1µg/ml) foi utilizado como meio base (TCM-199b) para os seis meios de maturação avaliados, a saber: controle do laboratório (S = TCM-199b + 10% de SFB), controle BSA (B = TCM-199b + 0,5% de BSA) e aditivos, cisteína (BC = meio B + 825µM de L-cisteína), cisteína-cisteamina (BCC = meio BC + 100µM de cisteamina), cisteína-cisteamina-mistura de insulina, transferrina e selênio (BCCI = meio BCC + ITS 8µg:8µg:8ng/mL, respectivamente) e cisteína-ITS (BCI = meio BC + ITS). Oócitos bovinos (n=2104) obtidos de ovários de vacas de abatedouro, apresentando *cumulus oophorus* compacto e ooplasma uniforme, foram maturados *in vitro* por 24h, em estufa a 38,5°C, 5% de CO₂ em ar e atmosfera úmida, para verificar os índices de maturação nuclear, pelo estágio de meiose, e citoplasmática, pelos parâmetros da migração dos grânulos corticais (GCs) para a periferia da membrana citoplasmática (n=1084) e da concentração intracelular de GSH ([GSHi]) (n=1020) (Browne & Armstrong, Methods Molecular Biology, 1998; 108:347-53). Os resultados foram analisados pela ANOVA e as médias pelo teste de Duncan, para as variáveis maturação nuclear e migração dos GCs, e pelo teste de Tukey, para a [GSHi], com p<0,05. Os índices médios de maturação nuclear e de migração dos GCs para a periferia da membrana citoplasmática não apresentaram diferenças significativas entre os grupos, mas a [GSHi] (pmol/oócito) foi maior nos grupos BC (4,25), BCC (4,97) e BCCI (4,42) em comparação com os grupos S (1,83), B (2,63) e BCI (2,23). Concluiu-se que: a adição destes componentes de thiol no meio de MIV não aumentou os índices de maturação nuclear e de migração dos GCs em nenhum dos grupos, apesar de elevar a [GSHi] nos grupos BC, BCC e BCCI; a maturação e a estocagem intracelular de GSH foram eventos independentes durante a IVM; o SFB pode ser substituído na MIV de oócitos bovinos, pelos aditivos avaliados neste estudo, sem prejudicar os índices de maturação nuclear e de migração dos GCs.

Suporte financeiro: FAPESP (processo nº 01/00597-0) - São Paulo, Brasil.

INFLUÊNCIA DA SÍNTESE DE GLUTATIONA DURANTE A MATUREZAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS SOBRE A QUALIDADE E O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO *

Wolf, A.¹; Gabaldi, S.H.²; Perecin, F.³; Garcia, J.M.³

¹Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária-FMVZ-UNESP, Botucatu-SP, Brasil. ²Departamento de Reprodução Animal-FMVZ-USP, São Paulo-SP, Brasil. ³Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal-FCAV-UNESP, Jaboticabal-SP, Brasil.
wolfgabaldi@yahoo.com.br

A qualidade embrionária está diretamente ligada à concentração intracelular de antioxidantes estocados durante a maturação oocitária. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de estimuladores da síntese de glutatona (GSH), adicionados no meio de maturação *in vitro* (MIV), sobre a quantidade e a qualidade dos embriões cultivados *in vitro* (CIV) em dois sistemas. O meio TCM-199 (Gibco BRL Life Technologies™, Carisbad, USA), suplementado com bicarbonato de sódio (26mM), piruvato (0,25mM), sulfato de amicacina (75µg/mL), FSH (0,5µg/mL), hCG (100UI/mL) e estradiol 17β (1µg/ml) foi utilizado como meio base (TCM-199b) para os três meios de maturação avaliados: controle do laboratório (S = TCM-199b + 10% SFB) e aditivos, cisteína (BC = TCM-199b + 0,5% BSA + 825µM de L-cisteína) e cisteína-cisteamina (BCC = meio BC + 100µM de cisteamina). Oócitos bovinos (n=3403) obtidos de ovários de vacas de abatedouro, apresentando *cumulus oophorus* compacto e ooplasma uniforme, foram maturados *in vitro* por 24h, em estufa a 38,5°C, 5% de CO₂ em ar e atmosfera úmida, no meio S, BC ou BCC. Após 24h de MIV os oócitos foram fertilizados *in vitro* em meio TALP-FIV por 20h, nas mesmas condições, e cultivados *in vitro* por sete dias em dois sistemas (meio SOFaa + 2,5% de SFB + 0,5% de BSA e atmosfera com 5% de CO₂ e 20% de O₂, ou meio SOFaa + 0,5% de BSA e atmosfera com 5% de CO₂ e 5% de O₂). Ao final do cultivo foram avaliadas as taxas de clivagem e de produção de blastocisto (Bl), bem como a qualidade proporcional do número de células da massa celular interna e do trofoblasto (MCI:TF), pela coloração diferencial, e do número de células em apoptose, pela coloração TUNEL. Os BIs produzidos foram classificados como superiores quando MCI:TF≥1:2 ou a MCI>24 e, como excelentes quando a MCI foi maior ou igual a somatória da média de células da MCI (24) e do desvio padrão (12) (MCI+SD=36). Os resultados da quantidade de embriões PIV foram analisados pela ANOVA e teste de Duncan, e a qualidade pelo teste de Fisher, com p<0,05. As taxas médias de clivagem e produção de Bl não apresentaram diferenças significativas entre os grupos, mas o sistema de CIV com 5% de O₂ produziu BIs de melhor qualidade MCI:TF, tendo maior número de células na MCI em comparação ao grupo cultivado em 20% de O₂ (35,09% vs 27,06%, respectivamente). Este grupo apresentou ainda maior frequência de BIs superiores (MCI:TF≥1:2=58,54% vs 31,78% e MCI>24 células =55,28% vs 34,88%, respectivamente) e excelentes (MCI≥36=51,47% vs 26,67%, respectivamente) independente do meio de MIV. Entretanto, o sistema a 5% de O₂ produziu BIs com mais células apoptóticas na MCI em comparação a 20% de O₂ (8,13% vs 6,04%, respectivamente), independente do meio MIV. Concluiu-se que: a estimulação da síntese de GSH durante a MIV e os sistemas de CIV não interferiram nas taxas de clivagem e produção de Bl; independente do meio de MIV utilizado, o sistema de cultivo com 5% de O₂ produziu embriões com melhor qualidade proporcional MCI:TF, mas com maior quantidade de células em apoptose na região da MCI; há necessidade de se avaliar a capacidade dos embriões PIV nestas condições em promover gestação *in vivo*.

* Suporte financeiro: FAPESP (processo nº 01/00597-0) - São Paulo, Brasil.

A INFLUÊNCIA DE BLOQUEADORES DE CANAIS DE ÍONS CÁLCIO VOLTAGEM-DEPENDENTES SOBRE A FERTILIDADE *IN VIVO* E *IN VITRO* DE OÓCITOS DE MAMÍFEROS*

Gabaldi, S.H.¹; Esper, C.R.²; Tedesco, A.C.³; Wolf, A.⁴; Oliveira, J.A.⁵

¹ Dep. de Reprod. An. - FMVZ-USP, São Paulo, shgabaldi@hotmail.com. ² Dep. de Med. Vet. Prev. e Reprod. An. - FCAV-UNESP, Jaboticabal. ³ Dep. de Química - FFCLRP-USP, Ribeirão Preto, Brasil. ⁴ Dep. de Reprod. An. e Radiol. Vet. - FMVZ-UNESP, Botucatu, Brasil

⁵ Dep. de Ciências Exatas - FCAV-UNESP, Jaboticabal, Brasil

Não há relatos na literatura sobre a influência da terapia anti-hipertensiva com bloqueadores de canais de íons cálcio voltagem-dependentes do tipo-L sobre a fertilidade feminina. Este experimento teve como objetivo verificar a influência dos bloqueadores de canais de íons cálcio, verapamil, nifedipina e diltiazem, sobre a fertilidade *in vivo* e *in vitro* de oócitos de hamsters. Fêmeas hamsters foram utilizadas em testes *in vivo* e superovuladas para as avaliações *in vitro*. No Experimento I, oócitos (n=4007) foram incubados por 30 min com verapamil (10µM, 100µM, 2mM ou 4mM), nifedipina (10µM, 100µM, 500µM ou 1mM), diltiazem (10µM, 100µM, 2mM ou 4mM), ou com meio livre de fármacos (controle) e, em seguida, fecundados com espermatozóides livres dos fármacos. A fecundação (n=2850) e o comportamento dos grânulos corticais (n=1157) foram avaliados após 6 horas pela coloração com Hoechst 33342 e isotiocianato de fluoresceína (*Lens cullinaris*), por microscopia de epifluorescência. No Experimento II, a administração dos fármacos às fêmeas (n=152) foi realizada duas vezes ao dia por 30 dias pelas vias oral (vo) ou intraperitoneal (ip), com verapamil (vo: 40mg/kg/d e ip: 5mg/kg/d), nifedipina (vo: 50mg/kg/d e ip: 10mg/kg/d) ou diltiazem (vo: 40mg/kg/d e ip: 10mg/kg/d) e posteriormente, analisadas quanto à fertilidade *in vivo* (prenhez), fecundação *in vitro*, exocitose dos grânulos corticais e ultraestrutura (microscopia eletrônica de transmissão) dos oócitos fertilizados *in vitro*. No Experimento III, a concentração intracelular de cálcio foi mensurada em oócitos (n=800) na presença de 50µM dos bloqueadores de cálcio, pela intensidade de fluorescência do Fluo-3AM por 720 seg. No experimento I e II, os resultados foram avaliados pelo teste do Qui-Quadrado (p<0,05) e no Experimento III por ANOVA (p<0,05). Como resultados, no Experimento I os fármacos atuaram de forma dose-dependente, os oócitos tratados mostraram menor taxa de fertilização *in vitro* em relação ao controle e, nos grupos verapamil e diltiazem, ocorreu exocitose parcial dos grânulos corticais e ativação não completa dos oócitos. No Experimento II ficou demonstrado que a fecundação *in vivo* das fêmeas tratadas não variou entre os grupos, porém, a taxa de fertilização *in vitro* dos oócitos de fêmeas tratadas *in vivo* com os antagonistas foi menor em relação ao controle. Tanto a exocitose dos grânulos corticais, quanto a análise ultraestrutural, não revelaram diferenças entre os grupos. As ninhadas de fêmeas que receberam a terapia no início da gestação apresentaram menor peso ao nascimento e maior taxa de mortalidade. No Experimento III, notou-se que os fármacos causaram um bloqueio do influxo de cálcio extracelular nos oócitos (grupo controle = 108,34nM; verapamil = 19,45nM; nifedipina = 32,51nM, diltiazem = 66,36nM). Concluiu-se que os oócitos possuem, em sua membrana plasmática, canais de íons cálcio sensíveis aos bloqueadores de canais de cálcio voltagem-dependentes do tipo-L. Nos tratamentos *in vitro*, estes fármacos atuaram negativamente na capacidade de fecundação dos oócitos e, no caso do verapamil e diltiazem, não ocorreu a ativação completa no oócito fertilizado. A terapia com os bloqueadores de canais de cálcio não reduziu a fertilidade das fêmeas hamsters, mas sua administração no início da gestação causou efeitos teratogênicos.

Suporte financeiro: FAPESP - São Paulo, Brasil.

ANGIOTENSINA II E SUA ASSOCIAÇÃO COM FATOR-I DE CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA, INSULINA E CÉLULAS FOLICULARES NA MATURAÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS E CONSEQÜENTE DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

Stefanello, J.R.; Arruda, J.N.T.; Zamberlam, G.O.; Oliveira, J.F.C.; Gonçalves, P.B.D.

Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Clínica de Grandes Animais Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal - BioRep, Santa Maria, RS, Brasil. bayard@biorep.ufsm.br

O objetivo deste trabalho foi verificar a associação entre a angiotensina II (Ang II), fator-I de crescimento semelhante à insulina (IGF-I), insulina (Ins) e células foliculares na maturação de oócitos bovinos e subsequente desenvolvimento embrionário precoce. Os complexos cumulus-oócitos (CCOs) foram aspirados de ovários bovinos obtidos em frigorífico. O meio de maturação utilizado foi TCM-199 com sais de Earle e L-glutamina, suplementado com 25 mM de Hepes, 0,2 mM de ácido pirúvico, 2,2 mg/ml de bicarbonato de sódio, 10% de Soro Fetal Bovino, 5 µg/ml de LH, 0,5 µg/ml de FSH, 100 UI/ml de penicilina e 50 µg/ml de estreptomina. Os CCOs foram maturados em uma temperatura de 39 °C e atmosfera de 5% de CO₂ em ar e umidade saturada, contendo oito metades foliculares (folículos de 2-5 mm) em 200 µl de meio na presença de Ang II (10⁻¹¹ M); Ang II + IGF-I (10 ng/ml); Ang II + Ins (5 µg/ml) e dois grupos controles, sem Ang II, IGF-I e Ins, na presença (controle com células) e ausência (controle sem células) de células foliculares por 1 h (1+23 h), 12 h (12+12 h) ou 24 h na presença de células foliculares e seus respectivos tratamentos + o período para completar 24 h de maturação. Após as 24 h de maturação os oócitos foram submetidos à FIV e subsequente desenvolvimento embrionário em meio SOF a uma temperatura de 39 °C e atmosfera de 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂ em ar em umidade saturada por nove dias. Após submeter os dados a uma transformação por arco seno, a análise estatística foi realizada por ANOVA, através de um modelo em blocos casualizados, utilizando o PROC GLM e os tratamentos comparados por contraste no programa estatístico SAS. Em 1 + 23 h, não houve diferença nos resultados de clivagem, blastocistos e eclosão entre os cinco grupos. No sistema 12 + 12 h, os oócitos no grupo Ang II + IGF-I atingiram índices de blastocistos/total de oócitos (43,8±0,6) e eclosão/blastocistos (39,3±3,2) superiores aos demais tratamentos (P<0,05). Em 24 h, os oócitos do grupo Ang II + IGF-I alcançaram uma taxa de blastocisto similar aos do grupo controle sem células (P<0,05). Somente nesse grupo (Ang II + IGF-I), foram obtidos blastocistos eclodidos após 24 h na presença de células foliculares. Em conclusão, a insulina e, principalmente, o IGF-I potencializam a ação da Ang II resultando em uma melhor maturação citoplasmática dos oócitos refletindo em uma maior percentagem de desenvolvimento embrionário. No entanto, a capacitação oocitária, medida pelo desenvolvimento embrionário, é superior quando a Ang II e IGF-I estão presentes em meios contendo células foliculares em cultivos de 12 + 12 horas.

Trabalho realizado com apoio do CNPq e FAPERGS.

CONTROLE DO OXIGÊNIO NA MIV E FIV DE OÓCITOS BOVINOS: EFEITO SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E TAXA DE PREENHEZ

Leivas, F.G.^{1,3}; Brum, D.S.³; Saliba, W.P.³; Alvim, M.T.T.³; dos Santos, M.V.¹; Bernardi, M.L.²; Rubin, M.I.B.¹; Silva, C.A.M.¹

¹Embryolab- Laboratório de Embriologia Animal – DCGA, HCV, CCR, Universidade Federal de Santa Maria. 97.105-900, Santa Maria-RS. ²Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS.

³Nova Índia-Cenatte Embriões, Cx.Postal 570, 38.001-970, Uberaba-MG.
fabioleivas@yahoo.com.br

Manter a concentração de oxigênio durante a maturação (MIV) e fecundação *in vitro* (FIV) de oócitos bovinos, em níveis próximos aos encontrados no trato reprodutivo da vaca, pode ser uma alternativa para a melhoria do sistema de PIV. Com isso, seria possível minimizar o estresse oxidativo e melhorar a qualidade embrionária. Com objetivo de avaliar o efeito concentração de 5% de oxigênio na MIV e FIV, 11 sessões de OPU/PIV foram conduzidas em 48 animais com a recuperação de 1092 oócitos viáveis. Os oócitos foram distribuídos em grupos de 10 a 20, homogeneamente quanto à qualidade. A maturação foi conduzida em gotas de 100µL de TCM-199 acrescido de FSH, LH e 10 % de SFB, sob óleo mineral, em estufa por 24h, a 39°C, umidade saturada e atmosfera de 5% de CO₂ em ar (grupo 20% de O₂) ou 5% de CO₂, 5% O₂, 90% N₂ (grupo 5% de O₂). O sêmen de dois touros *Bos indicus* foram selecionados por gradientes de Percoll na dose de 2 x 10⁶ espermatozoides/mL. A FIV foi conduzida em gotas de 100µL de Fert-TALP com heparina e PHE por 18 a 24h, a 39°C, umidade saturada e atmosfera gasosa de 5% de CO₂ em ar ou 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂. O cultivo foi conduzido em gotas de 100µL de SOFaaci (Holm *et al.*, 1999), por 6 a 8 dias em estufa a 39°C, umidade saturada e atmosfera gasosa com 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% N₂. Os embriões obtidos de 5 rotinas foram avaliados *in vitro* até a eclosão dos blastocistos em D9 (D0=dia da fecundação). Noutras 6 rotinas, após a avaliação em D7 efetuou-se a transferência dos embriões para receptoras. Os percentuais de clivagem e de blastocistos foram submetidos à ANOVA pelo procedimento GLM (SAS, 1989). As taxas de eclosão, de blastocistos grau I e de prenhez foram comparadas por Qui-quadrado com significância de 5%. Não houve diferença na taxa de clivagem (69,6 e 70,4%), no desenvolvimento embrionário (37,3 e 38,4%) e em blastocistos grau I em D7 (78,9 e 74,7%) entre 5% de O₂ e 20% de O₂, respectivamente. A eclosão em D9 sob os oócitos MIV foi superior no grupo 5% de O₂ (21,3 vs 10,8%). No entanto, a taxa de prenhez foi similar: 25,8% (34/132) e 33,6% (49/146) entre os grupos MIV e FIV com 5% e 20% de O₂, respectivamente. Não houve comprometimento da produção de blastocistos e a sua qualidade, bem como na taxa de prenhez quando a maturação e fecundação *in vitro* foram conduzidas com 5% de oxigênio.

AR PULMONAR NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OVÓCITOS BOVINOS DURANTE O TRANSPORTE

Mezzalira, A.¹; Mezzalira, J.C.¹; Bunn, S.¹; Werlich, D.E.¹; Paulini, F.¹; Wentz, K.C.¹

Laboratório de Reprodução Animal Prof. Roberto Assis de Bem - Centro de Ciências
Agroveterinárias - CAV - Universidade do Estado de Santa Catarina UDESC - Lages SC
mezzalira@cav.udesc.br

A produção *in vitro* de embriões é uma tecnologia já incorporada à bovinocultura, embora sua metodologia ainda não seja definitiva. Entraves, como a distância até o laboratório, muitas vezes dificultam a execução da técnica ou exigem equipamentos adicionais como estufas e ou gases especiais, onerando o processo. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do ar pulmonar como atmosfera sobre a maturação de ovócitos bovinos. Inicialmente avaliou-se a capacidade estabilizante do ar pulmonar obtido após 15 segundos de apnéia, num experimento conduzido em 10 repetições. Após o (um) período de estabilização (mínimo 2 horas), o meio TCM 199 tamponado com bicarbonato, mantido no interior de uma bolsa, hermeticamente fechada e inflada com ar pulmonar, apresentou (um) pH médio de $7,54 \pm 0,22$, enquanto o meio (aquele) estabilizado em estufa de cultivo celular com 5% CO₂ apresentou $7,43 \pm 0,06$. No experimento seguinte, conduzido em 7 repetições, 232 ovócitos foram submetidos a 24 h de maturação, em placas Nunc contendo TCM 199 tamponado com bicarbonato, previamente estabilizado e mantido em atmosfera de ar pulmonar (Tratamento 1). Outros 206 ovócitos foram mantidos em tubos (tipo) eppendorf de 1,5mL (Tratamento 2), simulando o seu transporte. Os ovócitos do grupo controle (n=250) foram maturados em estufa de cultivo celular com 5% de CO₂. Os procedimentos de fecundação e cultivo dos embriões foram realizados estufa de cultivo celular com 5% de CO₂ em ar com umidade saturada, de forma semelhante nos tratamentos e grupo controle. Obteve-se 77,8% de clivagem e 33,2% de blastocistos no Tratamento 1 (ar pulmonar / placas), 83,7% de clivagem e 34,9% de blastocistos no tratamento 2 (ar pulmonar / eppendorf) e 68,0% de clivagem e 40,3% de blastocistos no grupo controle. Os dados foram submetidos à análise de variância com nível de significância de 5%, no programa estatístico Biostat, não sendo verificadas diferenças estatísticas entre os grupos. A maturação de ovócitos bovinos durante o transporte, empregando ar pulmonar obtido após 15 segundos de apnéia, possibilita alta taxa de produção de embriões, é de fácil execução e baixo custo.

Agradecemos Frigoríficos Verdi e Pamplona.

AValiação DO BLOQUEIO DA MaturaçãO E DO CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES SUÍNOS NOS MEIOS PZM3 E NCSU23

Marques, M.G.; Nascimento, A.B.; Oliveira, V.P.; Coutinho, A.R.S.; Caetano, H.V.A.; Assumpção, M.E.O.A.; Visintin, J.A.

Departamento de Reprodução Animal – FMVZ-USP, São Paulo-SP, Brasil - mgroke@usp.br

O objetivo deste estudo foi avaliar os meios PZM3 e NCSU23 no cultivo de embriões suínos pós-fecundação *in vitro* (FIV) de oócitos com e sem bloqueio da maturação. Oócitos provenientes de ovários de matadouro foram divididos em dois grupos: maturados por 44 horas (Grupo 1) ou bloqueados por 10 horas com 5µM Ciclohexemide e posterior maturação por 40 horas (Grupo 2). Os oócitos foram maturados no meio TCM199 suplementado com 3,05mM glicose, 0,91mM piruvato de sódio, 10% fluido folicular suíno, 0,57mM cisteína, 10ng EGF/ml, 10UI eCG/ml e 10UI hCG/ml por 22 horas, seguido de incubação por 22 ou 18 horas (grupos 1 e 2, respectivamente) em meio sem hormônios. Para fecundação *in vitro* foi utilizado sêmen fresco capacitado durante a fecundação. Após a maturação *in vitro*, os oócitos tiveram as células do cumulus removidas mecanicamente e fecundados por 6 horas. Os presumíveis zigotos foram distribuídos nos meios de cultivo PZM3 (Grupos 1A e 2A) ou NCSU23 (Grupos 1B e 2B). Ao comparar os índices de embriões clivados no terceiro dia de cultivo, nos grupos com bloqueio, o PZM3 (Grupo 2A - 68,4%) apresentou melhor resultado em comparação ao grupo NCSU23 (Grupo 2B - 44,4%) e nos grupos sem bloqueio não houve diferença significativa entre o PZM3 (Grupo 1A - 50,6%) e o NCSU23 (Grupo 1B - 52,5%). Na análise dos índices de blastocistos no sétimo dia de cultivo, o Grupo 1A (13,4%) apresentou melhor resultado em comparação ao Grupo 1B (5,6%) e não houve diferença significativa entre os grupos 2A (6,3%) e 2B (9,8%). Concluiu-se que o meio PZM3 foi mais eficiente no cultivo de embriões em relação ao NCSU23. Infere-se ainda que o uso do bloqueio da maturação não melhorou os índices de blastocistos de embriões produzidos por fecundação *in vitro*.

Suporte financeiro FAPESP 02/10747-1

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE GH, IGF-1 E INSULINA NAS TAXAS DE MATURAÇÃO OOCITÁRIA E DE BLASTOCISTOS *IN VITRO*

Ponchirolli, C.B., Freitas, C.P., Landim-Alvarenga, F.C.

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária- FMVZ/UNESP, Botucatu-SP, 18618-000, Brasil. carlaponchi@yahoo.com.br

O desenvolvimento embrionário *in vitro* é potencialmente afetado por diversos fatores, incluindo a qualidade do processo de maturação *in vitro*. O GH (hormônio de crescimento), o IGF-1 (*insulin like growth factor*) e a insulina podem potencialmente melhorar a maturação ovocitária, quando adicionados ao meio de maturação *in vitro*. O objetivo desse experimento foi verificar a influência da adição de GH, IGF-1 e insulina ao meio de maturação *in vitro* (MIV) de ovócitos bovinos, em relação à taxa de produção de blastocistos. Ovários bovinos provenientes de abatedouro tiveram seus folículos com 2 a 8 mm de diâmetro puncionados para a obtenção de ovócitos. Os ovócitos foram selecionados, divididos em 5 grupos e maturados em estufa a 38° C, com 5% de CO₂ em ar e 100% de umidade por 22-24h. Grupo controle: meio TCM 199 suplementado com 10% de sor^o fetal bovino (SFB), 2,2 mg/ml piruvato de sódio, 1 mg/ml estradiol 17 β , 50 μ g/ml LH, 5 μ g/ml FSH e 75 μ g/ml gentamicina (meio controle); Grupo GH: meio controle + 100 ng/ml de GH; Grupo IGF-1: meio controle + 10 ng/ml IGF-1; Grupo insulina: meio controle + 1 μ g/ml insulina; Grupo GH + IGF-1 + insulina: meio controle + 100 ng/ml de GH, 10 ng/ml IGF-1, 1 μ g/ml insulina. Após a MIV, os ovócitos foram fertilizados em meio Fert Talp por 12h, sob as mesmas condições da maturação e decorrido o tempo de fertilização, foram cultivados em meio HTF (*Human Tubal Fluid*, HTF[®], Irvine) e BME (*Basal Medium Eagle*, BME[®], Sigma), na relação 1:1, acrescido de 10% SFB, 0,01% myo-inusitol e 75 μ g/ml gentamicina. O cultivo foi realizado em gotas de 90 μ l, na presença de células da granulosa (co-cultivo). Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA). Controle: 154 blastocistos/ 532 ovócitos -29%; GH: 151/539-28%; IGF-1: 154/535 -28%; insulina: 141/539-26%; GH+IGF-1+insulina: 1445/527- 27%. Neste estudo, a adição de GH, IGF-1, insulina ou todos ao meio de maturação ovocitária *in vitro* não aumentou as taxas de produção de blastocistos. A explicação para tal fato deve-se provavelmente à presença de SFB no meio de MIV, rico em fatores de crescimento, mascarando a ação daqueles que foram adicionados nos diferentes tratamentos.

Apoio financeiro: FAPESP e CAPES.

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE ANTIOXIDANTES E DAS CÉLULAS DO *CUMULUS* DURANTE A MATURAÇÃO OOCITÁRIA *IN VITRO* NA ESPÉCIE BOVINA

Gotardi, F.P.¹; Barretto, L.S.S.²; Gonçalves, F.S.²; Perri, S.H.V.¹; Mingoti, G.Z.¹

¹Medicina Veterinária, UNESP, Araçatuba-SP, CEP 16050-680, Brasil. ²Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal-SP, CEP 14884-900, Brasil. gmingoti@fmva.unesp.br.

Apoio Financeiro: FAPESP

A glutatona (GSH) exerce importante papel de proteção celular, ao atuar na redução dos radicais livres. Na maturação *in vitro* (MIV), a síntese de GSH pode ser estimulada por antioxidantes, e já foi demonstrado que as células do *cumulus* exercem importante papel na síntese de GSH intracelular. Este trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos da suplementação do meio de MIV com antioxidante (cisteamina), na presença ou ausência das células do *cumulus*. Oócitos (N=555) aspirados a partir de ovários obtidos em matadouro foram maturados durante 24 horas em estufa a 38,5°C e atmosfera de 5% CO₂ em ar. O meio de maturação foi o TCM-199 suplementado com 0,6% BSA, 0,5 µg FSH, 100 UI hCG e 1 µg estradiol/ml (*Contr*), adicionado de 50 µM de cisteamina (*Cist*). Os oócitos foram maturados inclusos nas células do *cumulus* (COC), ou desnudos das células do *cumulus* (DO), ou ainda foram desnudados e co-cultivados com as células do *cumulus* previamente removidas (DO+CC). Após a maturação, os oócitos foram corados com Hoescht 33342 para avaliação dos estádios da meiose, sendo classificados como fase de vesícula germinativa (GV -imaturos), fase de metáfase I (maturação incompleta) e fase de metáfase II (MII - maturação completa). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido pelo teste de Duncan ($P<0,05$). Imediatamente após remoção do folículo, 100% dos oócitos apresentaram-se em fase de GV. Após 24 horas de maturação, oócitos do grupo *Contr* apresentaram-se em MII em 69,81%^a (COC), 62,86%^{ab} (DO) e 57,26%^b (DO+CC). No grupo *Cist*, observou-se MII em 86,32%^a (COC), 78,39%^{ab} (DO) e 67,39%^b (DO+CC). Os dados demonstram o efeito benéfico da presença das células do *cumulus* durante a MIV, além da importância da integridade da conexão entre oócito e células do *cumulus*. Adicionalmente, foi realizada análise de contrastes ortogonais pré-estabelecidos, que demonstrou maior porcentagem de maturação nuclear ($P<0,05$) quando oócitos foram maturados na presença de cisteamina, demonstrando o efeito benéfico de antioxidantes sobre a maturação nuclear.

EFEITOS DE INIBIDORES DA MATURAÇÃO NUCLEAR E DE ANTIOXIDANTES SOBRE A MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS

Barretto, L.S.S.¹; Gonçalves, F.S.¹; Perri, S.H.V.²; Mingoti, G.Z.²

¹ DMVPRA, FCAV-UNESP, Jaboticabal-SP, Brasil. ² DAPSA, FMVA-UNESP, Araçatuba-SP, Brasil.
leticiabarretto@ig.com.br

Os inibidores de maturação nuclear butirolactona I e roscovitina mantêm os oócitos bovinos no estágio de vesícula germinativa de maneira reversível. Os antioxidantes (cisteamina e β -mercaptoetanol) protegem as células do estresse oxidativo nos meios de cultivo. Objetivamos avaliar os efeitos da butirolactona I, roscovitina, cisteamina e β -mercaptoetanol na maturação nuclear *in vitro* de oócitos bovinos. Oócitos (n=489) foram maturados a 38,7°C em atmosfera de 5% CO₂ em ar em meio TCM-199 suplementado com 0,6% BSA, 0,5 μ g FSH, 100 UI hCG e 1 μ g estradiol/ml (controle - C), adicionado de 50 μ M de cisteamina (CC) ou 50 μ M de β -mercaptoetanol (CM). O grupo padrão do laboratório (S) foi suplementado com 10% de SFB como fonte protéica. Os oócitos em meio suplementado com butirolactona I e roscovitina foram pré-maturados por 24 horas em meio TCM-199 suplementado com 0,3% BSA, antibiótico e piruvato, e depois transferidos para gotas com meio controle para maturação de acordo com os grupos: 100 μ M de butirolactona I (B), 100 μ M de butirolactona I + 50 μ M de cisteamina (BC), 100 μ M de butirolactona I + 50 μ M de β -mercaptoetanol (BM), 25 μ M de roscovitina (R), 25 μ M de roscovitina + 50 μ M de cisteamina (RC) e 25 μ M de roscovitina + 50 μ M de β -mercaptoetanol (RM). Após 24 horas do início de maturação, os oócitos foram corados com Hoescht 33342 para avaliação da maturação nuclear. Os dados foram analisados por ANOVA (P<0,05). Com 24 horas de maturação, os oócitos apresentaram-se em metáfase II em 66,32% (S), 65,85% (C), 66,67% (CC), 64,61% (CM), 70,37% (B), 56,22% (BC), 55% (BM), 57,90% (R), 60,80% (RC) e 59,20% (RM), não observando diferença significativa (P>0,05) entre os grupos. Verificou-se a reversão do bloqueio da progressão da meiose após a remoção dos meios com butirolactona I e roscovitina.

Apoio Financeiro: FAPESP

INFLUÊNCIA DE PRECURSORES DE GLUTATIONA DURANTE A MATURAÇÃO *IN VITRO* (MIV) DE OÓCITOS BOVINOS NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

Saraiva, N.Z.¹; Tetzner, T.A.D.¹; Borges, J.C.¹; Wolf, A.¹; Ferreira, C.R.¹; Percin, F.¹,
Méo, S.C.²; Vantini, R.¹; Garcia J. M.¹

¹DMVPRA FCAV-UNESP, 14884-900, Jaboticabal-SP, Brasil, ²CPDGRA-IZ, APTA/SAA, Nova Odessa-SP, 13460-000, Brasil. naiaravet@yahoo.com.br

A glutationa (GSH) é formada pelos aminoácidos glutamato, glicina e cisteína e sua função principal é proteger a membrana celular inativando radicais livres. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do uso de precursores da GSH, no meio de maturação, no desenvolvimento embrionário inicial em bovinos. Oócitos obtidos de ovários de vacas de abatedouro, apresentando citoplasma homogêneo e *cumulus* compacto, foram selecionados e transferidos em grupos de 25 para gotas de 100µL, sob óleo mineral, com meio de maturação específico para cada tratamento e mantidos à temperatura de 38,5°C em atmosfera gasosa de 5% de CO₂ em ar, durante 24 horas. O meio padrão para a maturação foi o TCM 199 com sais de Earle (GibcoBRL) e bicarbonato de sódio (2,2mg/mL), suplementado com 1µg/mL FSH, 100UI/mL hCG, 1µg/mL estradiol, 0,25mM piruvato de sódio e 75µg/mL amicacina. Para cada um dos 5 tratamentos estabelecidos, o meio padrão foi suplementado com: grupo controle (C) – 10% SFB (n=221), grupo controle BSA (B) – 0,5% BSA (n=235), grupo BSA+Cisteína (BC1) – meio B, adicionado de 825µM de L-cisteína (n=227), grupo BSA+Cisteamina (BC2) – meio B, adicionado de 100µM de cisteamina (n=245) e grupo BSA+Cisteína+Cisteamina (BCC) – meio B adicionado de 825µM de L-cisteína e 100µM de cisteamina (n=231). Após 24 horas de MIV, os oócitos foram fecundados em meio TALP-FIV por 20 horas e cultivados em SOFaa suplementado com 2,5% SFB e 0,5% BSA. As taxas de clivagem e produção de blastocistos foram avaliadas respectivamente, 48 horas e 7 dias após a FIV. Foram realizadas 4 repetições, os resultados foram submetidos à ANOVA e as médias testadas pelo teste de Duncan (P<0,05). Quanto à clivagem, o grupo BC1 (73,98%) foi superior aos grupos BC2 (63,28%) e BCC (60,60%) e similar aos grupos C (64,97%) e B (71,79%). O grupo B foi superior ao grupo BCC para clivagem. No entanto, na produção de blastocistos, o grupo BC2 (59,95%) foi superior aos demais grupos (C = 49,86%; BCC = 44,79%; B = 43,68%; BC1 = 37,71%). O grupo C produziu mais blastocistos do que o grupo BC1 e os grupos BCC e B foram similares aos grupos C e BC1. Embora o grupo BC1 tenha apresentado maior taxa de clivagem, o grupo BC2 permitiu maior produção de blastocistos. Nossos resultados estão de acordo com dados observados na espécie ovina (DE MATOS et al., Theriogenology, v.57, p.1443-51, 2002), onde apenas o tratamento com cisteamina favoreceu o desenvolvimento de blastocistos. Não foi alcançado o aumento esperado na produção de blastocistos nos grupos suplementados com cisteína (BC1 e BCC). Uma das hipóteses é que o excesso de tiois no meio poderia causar desequilíbrio celular e interferir no desenvolvimento embrionário.

Apoio Financeiro: FAPESP proc.03/12351-0 e CNPq.

DISTRIBUIÇÃO DE MITOCÔNDRIAS EM OVÓCITOS BOVINOS MATURADOS *IN VITRO* APÓS O BLOQUEIO MEIÓTICO

Pires, P.R.L.^{1,3}; Adona, P.R.^{2,3}; Quetglas, M.D.³; Leal, C.L.V.³

¹UNIARARAS, Araras-SP, ²Setor de Reprodução Animal – LMGA/CCTA/UENF – Campos dos Goytacazes-RJ, ³Departamento de Ciências Básicas – FZEA/USP – Pirassununga-SP, paulo_adona@yahoo.com.br

A distribuição das mitocôndrias no citoplasma do ovócito bovino é importante para a maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário. Uma das principais funções exercidas pelas mitocôndrias é gerar energia para a manutenção e divisão celular. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do bloqueio meiótico na distribuição das mitocôndrias em ovócitos bovinos submetidos à maturação *in vitro* (MIV). Ovários foram coletados em abatedouro e os folículos de 2-6mm de diâmetro foram aspirados para obtenção dos ovócitos. A progressão da meiose dos ovócitos foi bloqueada por 24h em três diferentes tratamentos em quatro réplicas: a) BL10 – 10 μ M de butirolactona I (BL, n=127); b) BL100 – 100 μ M de BL mais 3mg/ml de BSA (n=118) e c) RB - 6,25 μ M de BL e 12,5 μ M de roscovitina (R, n=119). Todos os tratamentos foram diluídos em TCM199. Após o bloqueio os ovócitos foram maturados por 24 horas em TCM199 com 10% de SFB, 0,5 μ g/ml de FSH e 5,0 μ g/ml de LH. No grupo controle (controle 24h, n=59) os ovócitos foram maturados sem ser submetidos ao bloqueio meiótico prévio. Os ovócitos foram avaliados após o bloqueio e após a MIV. Um grupo foi ainda avaliado imediatamente após a aspiração (controle 0h, n=63). Para avaliar a distribuição das mitocôndrias os ovócitos foram desnudados, corados com 0,5 μ M mito-tracker (vermelho) em PBS com 0,1% de PVA por 20 minutos; corados com 10 μ g/ml de hoechst 33342 em PBS com 0,1% de PVA por 10 minutos; lavados por três vezes em PBS com 0,1% de PVA e montados entre lâmina/lamínula para a avaliação sob microscópio de epifluorescência. Os dados foram avaliados utilizando o método GLM - PROC GENMOD do SAS. Nos ovócitos não maturados, independente do tratamento, 92 a 100% dos mesmos estavam em vesícula germinativa (P>0,05). As mitocôndrias encontravam-se distribuídas principalmente na região periférica do citoplasma tanto no controle 0h (100%) quanto após o bloqueio de 24h para BL10 (82%), BL100 (87%) e RB (74%) (P>0,05). Após a MIV (96 a 100% dos ovócitos estavam em metáfase II, P>0,05), porém, as mitocôndrias estavam distribuídas por todo o citoplasma, tanto no grupo controle 24h (83 %) quanto nos ovócitos maturados após o bloqueio (96, 98 e 100% para BL10, BL100 e RB, respectivamente) sendo que nestes a migração foi superior ao controle (P<0,05). Conclui-se que o bloqueio da meiose também inibe a migração das mitocôndrias, mas que após a MIV essa migração pode ser estimulada.

Apoio financeiro Fapesp 03/01479-6 (AR) e 04/14166-9 (IC de PRLP) e Capes (DR de PRA).

EFEITO DO BLOQUEIO MEIÓTICO NA MIGRAÇÃO DOS GRÂNULOS CORTICAIS EM OVÓCITOS BOVINOS MATURADOS *IN VITRO*

Adona, P.R.^{1,2}; Pires, P.R.L.^{2,3}; Quetglas, M.D.²; Leal, C.L.V.²

¹Laboratório de Reprodução Animal – LMGA/CCTA/UENF – Campos dos Goytacazes-RJ,

²Departamento de Ciências Básicas – FZEA/USP – Pirassununga-SP, ³UNIARARAS, Araras-SP,
paulo_adona@yahoo.com.br

Os grânulos corticais (GC) são organelas produzidas a partir do complexo de Golgi e estão presentes apenas nos gametas femininos. Sua principal função é de modificar a zona pelúcida para impedir a polispermia. Os GC são formados nos ovócitos em crescimento, mas a reorganização de sua distribuição ocorre no período da maturação. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do bloqueio meiótico na migração dos GC em ovócitos bovinos submetidos posteriormente à maturação *in vitro* (MIV). Ovários foram coletados em frigorífico logo após o abate e os folículos com diâmetro de 2-6 mm foram aspirados para obtenção dos ovócitos. O bloqueio da meiose dos ovócitos foi induzido pelo cultivo por 24h na presença dos seguintes tratamentos em quatro réplicas: a) BL10 - 10 μ M de butirolactona I (BL, n=116); b) BL100 – 100 μ M de BL mais 3mg/ml de BSA (n=116) e c) RB - 6,25 μ M de BL e 12,5 μ M de roscovitina (R, n=115). Todos os tratamentos foram diluídos em TCM199. Após o bloqueio os ovócitos foram maturados *in vitro* (24h) em TCM199 com 10% de SFB, 0,5 μ g/ml de FSH e 5 μ g/ml de LH. Como controles um grupo foi maturado sem bloqueio prévio (controle 24h, n=59) e outro grupo foi avaliado imediatamente após a aspiração (controle 0h, n=56). As análises dos ovócitos foram feitas após o bloqueio e a MIV. Para tal, os ovócitos foram desnudados e a zona pelúcida removida com 0,5% pronase em PBS por \pm 5min e em seguida fixados em 3,7% de paraformaldeído em PBS mais 0,1% de PVA por 30min; incubados em SB (PBS com 0,1% de BSA, 0,75% de glicina e 0,2% de azida sódica) por 2h; permeabilizados com 0,1% Triton X-100 em SB por 5min; lavados por três vezes em SB; corados com 1 μ g/ml de *Lens culinaris* conjugado com FITC mais 10 μ g/ml de iodeto de propídio em SB por 15min; lavados por três vezes em SB e montados entre lâmina/lamínula para a avaliação sob microscópio de epifluorescência. Os dados foram avaliados utilizando o método GLM - PROC GENMOD do SAS. Em 100% dos ovócitos não maturados, tanto após a aspiração (controle 0h), quanto nos bloqueados antes da maturação, os GC apresentavam-se dispersos pelo citoplasma da célula (P>0,05). Estes ovócitos encontravam-se imaturos (96-100% em estágio de vesícula germinativa, P>0,05). No entanto, após a MIV, 96 a 98% (P>0,05) dos ovócitos tratados e do controle 24h apresentavam seus GC na periferia do ovócito, abaixo da membrana plasmática. Pode-se concluir que o bloqueio da meiose também impede a migração dos GC, mas que após a remoção do estímulo inibitório os GC migram normalmente durante a MIV.

Apoio financeiro Fapesp 03/01479-6 (AR) e 04/14166-9 (IC de PRLP) e Capes (DR de PRA).

EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BUTIROLACTONA-I E DA PRESENÇA DE ALBUMINA SÉRICA BOVINA NO BLOQUEIO MEIÓTICO DE OVÓCITOS BOVINOS

Adona, P.R.^{1,3}; de Bem, T.H.C.^{2,3}; Leal, C.L.V.³

¹Setor de Reprodução Animal – LMGA/CCTA/UENF – Campos dos Goytacazes-RJ,
²UNIARARAS, Araras-SP, ³Departamento de Ciências Básicas – FZEA/USP – Pirassununga-SP,
paulo_adona@yahoo.com.br

Vários estudos estão sendo realizados com a finalidade de promover a melhoria da competência de ovócitos maturados *in vitro*. Uma possível alternativa é o bloqueio meiótico dos ovócitos antes de submetê-los à maturação *in vitro* (MIV). Inibidores específicos do fator promotor da maturação (MPF), tais como a butirolactona I (BL), vêm sendo utilizados para este fim. O objetivo do presente estudo foi de avaliar o efeito de diferentes concentrações de BL na presença ou não de BSA no bloqueio meiótico de ovócitos bovinos. Ovários foram coletados em frigorífico logo após o abate e folículos com diâmetro de 2-6 mm foram aspirados para obtenção dos ovócitos. Os ovócitos foram distribuídos entre os tratamentos em três réplicas. No experimento 1 a BL foi diluída em meio TCM199 puro nas concentrações de 0 (controle, n=73) 10 (n=78), 15 (n=72), 20 (n=76) e 25µM (n=76). No experimento 2, os ovócitos foram cultivados com 0 (controle, n=77), 25 (n=83), 50 (n=77) e 100µM (n=78) de BL em TCM199 na presença de 3mg/mL de BSA. Nos dois experimentos, após o período de bloqueio (24h) os ovócitos foram desnudados, fixados em etanol/ácido acético (3:1) e corados com 1% de lacmóide para determinação do estágio da meiose. Os dados foram avaliados utilizando o método GLM - PROC GENMOD do SAS. No experimento 1, 95 a 97% (P>0,05) dos ovócitos permaneceram bloqueados em vesícula germinativa (VG) nos grupos tratados com BL, enquanto que no controle (sem BL) apenas 14% dos ovócitos (P<0,05) permaneceram nesse estágio, sugerindo que na ausência de BSA, baixas concentrações de BL são eficazes para bloquear a meiose. No experimento 2, à medida que se aumentou a concentração de BL na presença de BSA, aumentou a taxa de bloqueio (65, 84 e 98% de VG para 25, 50 e 100µM de BL, respectivamente, P<0,05). No controle, nenhum ovócito permaneceu em VG. Estes dados denotam que na presença de BSA, concentrações maiores de BL são requeridas para induzir o bloqueio meiótico. Pode-se concluir que a eficiência do bloqueio meiótico com BL tem uma relação com a concentração do inibidor e com a suplementação do meio de cultivo.

Apoio financeiro FAPESP 03/01479-6 (AR) e CAPES (DR de PRA).

EXPRESSÃO GÊNICA EM OVÓCITOS E CÉLULAS DO CUMULUS DE BOVINOS ANTES E APÓS A MATURAÇÃO *IN VITRO* COM E SEM LH – DADOS PRELIMINARES

Mundim, T.C.D.; Franco, M.M.; Brandão, D.O.; Ávila, F.F.; Melo, E.O.; Rumpf, R.

Laboratório de Reprodução Animal, EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil. Avenida W/5 Norte Final, PqEB, Prédio Biotecnologia, Sala 7B, 70770-900.
mfranco@cenargen.embrapa.br

Inúmeras biotécnicas ligadas à reprodução têm sido desenvolvidas com o objetivo de otimizar a produção animal. Condições de maturação, fertilização e cultivo *in vitro* vêm sendo estudadas, estimulando a busca de novos protocolos que aperfeiçoem as técnicas e reduzam o custo. Além dos parâmetros hoje avaliados, como uniformidade de citoplasma, expansão e número de camadas de células do cumulus, a biologia molecular, na tentativa de identificar marcadores moleculares e mecanismos envolvidos na expressão diferencial de genes surge como potencial ferramenta de monitoramento e avaliação de sistemas de produção *in vitro* (PIV) de embriões. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi detectar a expressão dos genes, IGF2, IGF2r, GRB10 e GDF9, envolvidos na maturação de ovócitos. Foram utilizados complexos cumulus-oócitos imaturos e maturados com e sem LH, obtidos de ovários de abatedouro. Os folículos foram puncionados, e os ovócitos selecionados e maturados com LH (controle) e sem LH, de acordo com protocolos utilizados no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. RNA total de ovócitos imaturos e maturados com e sem LH e de suas respectivas células do cumulus foi isolado e utilizado numa reação de RT-PCR, sendo os produtos obtidos visualizados em gel de agarose corado com brometo de etídeo. Obteve-se claramente uma expressão diferencial do gene IGF2 entre células do cumulus maturadas e não maturadas e do GRB10 com uma maior expressão em ovócitos maturados sem LH. Apesar dos resultados serem preliminares, o trabalho ressalta o potencial do uso de marcadores moleculares no monitoramento e avaliação de sistemas de produção *in vitro* (PIV) de embriões.

DISPOSIÇÃO DOS MICROFILAMENTOS DURANTE A MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OVÓCITOS BOVINOS APÓS BLOQUEIO MEIÓTICO

Adona, P.R.^{1,2}; Valério, J.²; Leal, C.L.V.²

¹Setor de Reprodução Animal – LMGA/CCTA/UENF – Campos dos Goytacazes-RJ,

²Departamento de Ciências Básicas – FZEA/USP – Pirassununga-SP, paulo_adona@yahoo.com.br

Os microfilamentos fazem parte do citoesqueleto da célula e são formados por filamentos de actina. Na maturação são responsáveis por alterar a disposição dos grânulos corticais. O presente estudo objetivou avaliar a disposição dos microfilamentos durante a maturação *in vitro* (MIV) de ovócitos bovinos submetidos primeiramente ao bloqueio meiótico. Os ovócitos foram obtidos de ovários de abatedouro sendo aspirados de folículos de 2-6mm de diâmetro. Os ovócitos foram bloqueados por 24 horas em meio TCM199 com diferentes tratamentos: a) BL10 – 10 μ M de butirolactona I (BL); b) BL100 – 100 μ M de BL mais 3mg/ml de BSA e c) RB - 6,25 μ M de BL e 12,5 μ M de roscovitina (R). Após o bloqueio os ovócitos foram submetidos à MIV (TCM199 com 10% de SFB, 0,5 μ g/ml de FSH, 5 μ g/ml de LH) e avaliados às 0, 6, 12, 18 e 24h de maturação pós-bloqueio. Um grupo controle foi apenas maturado e avaliado nos mesmos horários. Para avaliação os ovócitos foram desnudados e fixados em 3,7% de paraformaldeído e 0,6% Triton X-100 em PP (PBS com 0,1% de PVA) por 30 minutos; corados com 1 μ g/ml faloidina conjugada com FITC e 10 μ g/ml de iodeto de propídio em PP por 30 minutos; lavados por três vezes em PP e montados entre lâmina/lamínula para a avaliação sob microscópio de epifluorescência. Os dados (estádios da meiose) foram avaliados utilizando o método GLM - PROC GENMOD do SAS e a disposição dos microfilamentos teve uma avaliação descritiva. No início do cultivo (0h) os oócitos encontravam-se em vesícula germinativa (92-100% VG, P>0,05). Após 6h de MIV reduziu-se a proporção de oócitos em VG nos grupos tratados (55-66%, P>0,05) em relação ao controle (83% de VG, P<0,05), indicando que os grupos tratados retomaram mais cedo a meiose. Às 12h de MIV a maioria (87-96%, P>0,05) dos ovócitos de todos os grupos encontrava-se em fases intermediárias da meiose (metáfase I a telófase I). Após 18 e 24h de MIV, a maioria dos ovócitos já havia atingido o estágio de MII (68-72% e 90-98%, respectivamente, P>0,05). Os microfilamentos foram observados por todo o citoplasma dos ovócitos em todos grupos e horários avaliados. Nos horários de 18 e 24h de MIV, para todos os grupos, foi observada uma marcação mais intensa dos microfilamentos na região onde o corpúsculo polar foi liberado. Não foi observada nenhuma diferença ou alteração no arranjo dos microfilamentos no citoplasma dos ovócitos avaliados. Pode-se concluir que o bloqueio meiótico nas condições estudadas induz uma aceleração na retomada da meiose, mas que a velocidade da progressão meiótica se normaliza ao longo da MIV. Os microfilamentos não são afetados pelos tratamentos.

Apoio financeiro FAPESP 03/01479-6 (AR) e CAPES (DR de PRA).

BLOQUEIO MEIÓTICO DE OVÓCITOS BOVINOS E ORGANIZAÇÃO DOS MICROTÚBULOS DURANTE A MATURAÇÃO *IN VITRO*

Pires, P.R.P.^{1,3}; Adona, P.R.^{2,3}; Leal, C.L.V.³

¹UNIARARAS, Araras-SP, ²Setor de Reprodução Animal – LMGA/CCTA/UENF – Campos dos Goytacazes-RJ, ³Departamento de Ciências Básicas – FZEA/USP – Pirassununga-SP, paulo_adona@yahoo.com.br

Os microtúbulos são estruturas citoplasmáticas do citoesqueleto celular. São os principais constituintes do fuso meiótico, fornecendo estrutura para a divisão celular, além de estarem envolvidos no transporte e na organização de organelas e de partículas no interior do citoplasma. O objetivo deste estudo foi de avaliar a organização do microtúbulos durante a maturação *in vitro* (MIV) de ovócitos bovinos submetidos ao bloqueio meiótico. Ovários foram coletados em frigorífico logo após o abate e folículos de 2-6 mm foram aspirados. Os ovócitos foram submetidos ao bloqueio meiótico por 24 horas em meio TCM199 com os tratamentos: a) BL10 – 10 μ M de butirolactona I (BL); b) BL100 - 100 μ M de BL mais 3mg/ml de BSA e c) RB - 6,25 μ M de BL e 12,5 μ M de roscovitina (R). Após o bloqueio, os ovócitos foram maturados *in vitro* (MIV) em TCM-199 com 10% de SFB, 0,5 μ g/ml de FSH, 5,0 μ g/ml de LH e avaliados às 0, 6, 12, 18 e 24h de MIV pós-bloqueio. Um grupo controle foi apenas maturado e avaliado nos mesmos horários. Para avaliação, os ovócitos foram desnudados e fixados em 3,7% de paraformaldeído e 0,6% Triton X-100 em PP (PBS com 0,1% de PVA) por 30 min; bloqueados com 3% de soro de cabra em PP por 45 min; corados com anti- α tubulina conjugada com FITC (1:100) em PP por 1h; corados com 10 μ g/ml de iodeto de propídio em PP por 15 min e avaliados sob microscópio de epifluorescência. Os dados (estádios da meiose) foram avaliados pelo método GLM - PROC GENMOD do SAS e a disposição dos microtúbulos teve uma avaliação descritiva. No início da MIV (0h), a maioria dos ovócitos (87-100%, $P>0,05$) encontrava-se em vesícula germinativa (VG). Após 6h de MIV, porém, os grupos tratados apresentaram menos ovócitos em VG (~35%, $P>0,05$) comparados ao controle (64%, $P<0,05$), indicando uma aceleração na retomada da meiose. Às 12h, a maioria dos ovócitos (73-78%, $P>0,05$) encontrava-se em estádios intermediários da meiose. Às 18 e 24h, a maioria dos ovócitos havia completado a meiose (72-82% e 90-93% de MII, respectivamente, $P>0,05$). Os microtúbulos apresentaram marcação positiva por todo o citoplasma em todos os oócitos avaliados. No entanto, uma marcação mais intensa foi observada no fuso meiótico a partir das 6h de MIV (mais freqüente nos grupos bloqueados) e que se intensificou às 12 e 18h. Às 24h, reduziu-se a marcação dos microtúbulos. Não foram observadas alterações no fuso meiótico quanto à organização e formação da placa metafásica nos diferentes grupos e horários avaliados. Em conclusão, o bloqueio da meiose com os tratamentos utilizados acelera etapas iniciais da MIV que posteriormente se conclui normalmente. Os tratamentos afetaram negativamente os microtúbulos.

Apoio financeiro Fapesp 03/01479-6 (AR) e 04/14166-9 (IC de PRLP) e Capes (DR de PRA).

BLOQUEIO DA MEIOSE EM OVÓCITOS BOVINOS *IN VITRO* COM BUTIROLACTONA I NÃO INFLUENCIA NA QUANTIDADE DE DNA MITOCONDRIAL

Biase, F.H.¹; Adona, P.R.^{1,2}; Miranda, M.S.¹; Leal, C.L.V.¹; Meirelles, F.V.¹

¹Departamento de Ciências Básicas – FZEA/USP, Pirassununga-SP, ²Setor de Reprodução Animal – LMGA/CCTA/UENF, Campos dos Goytacazes-RJ

As mitocôndrias são centrais bioenergéticas com função essencial na determinação da competência funcional dos ovócitos. São organelas especializadas responsáveis pela produção da maior parte da energia celular em forma de ATP. Durante a mitose, as mitocôndrias são distribuídas aleatoriamente entre as células filhas e no decorrer da ovogênese ocorre um aumento substancial de seu número, com uma variação expressiva entre ovócitos do mesmo estágio de desenvolvimento. Há uma similar correlação entre o potencial para o desenvolvimento, índice de ATP e função mitocondrial tanto nos ovócitos quanto nos embriões de bovinos. O objetivo deste estudo foi identificar a variação na quantidade de DNA mitocondrial entre ovócitos bovinos cultivados *in vitro* na presença ou ausência de butirolactona I (BL). Ovários foram obtidos em frigorífico logo após o abate e os folículos com diâmetro de 2-8 mm foram aspirados para obtenção de oócitos. Os oócitos foram avaliados para a quantidade de DNA mitocondrial através de PCR em tempo real após serem submetidos a 3 tratamentos (T): T1 – bloqueados por 24h em meio TCM199 + 10 μ M de BL, T2 – bloqueados (24h) e maturados pós-bloqueio por 24h (TCM-199 + 10% de SFB, 0,5 μ g/mL de FSH, 5,0 μ g/mL de LH e 10 μ g/mL gentamicina) e T3 – apenas maturados (controle) sem bloqueio. Um grupo de ovócitos foi coletado para avaliação logo após a aspiração (0h). Os ovócitos de todos os tratamentos foram desnudados e congelados individualmente em 1 μ L de PBS a -80°C. Doze ovócitos de cada tratamento foram, individualmente, submetidos à PCR. A amplificação do DNA mitocondrial foi realizada por PCR em tempo real com primers específicos e a leitura da fluorescência foi detectada por SYBR Green. O dado Cycle Threshold (Ct) de cada amplificação foi considerado como variável para a comparação da quantidade de DNA mitocondrial em cada ovócito. A análise estatística foi realizada por análise de variância de dados não paramétricos. As médias de Cts dos grupos 0h, T1, T2 e T3 foram 26,33, 26,26, 26,73 e 24,96, respectivamente. Não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os Cts de cada grupo analisado. O resultado sugere que o cultivo *in vitro* de ovócitos bovinos na presença de butirolactona I não interfere na quantidade de DNA mitocondrial.

IMPACTO DO BROMETO DE ETÍDEO NA MATURAÇÃO NUCLEAR E CITOPLASMÁTICA *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS

Ferreira, C.R.¹; Meirelles, F.V.²; Perecin, F.¹; Méo, S.C.³; Tetzner, T.A.D.¹; Saraiva, N.Z.¹; Yamazaki, W.¹; Vantini, R.¹; Garcia, J.M.¹

¹DMVPRA FCAV-UNESP, 14884-900, Jaboticabal-SP, Brasil, ²FZEA-USP, ZAB, Pirassununga-SP, Brasil, ³CPDGRA – IZ, APTA/SAA, Nova Odessa-SP, 13460-000, Brasil.
chrisferreira13@yahoo.com.br

A herança do DNA mitocondrial (mtDNA) tem despertado grande interesse na pesquisa em biotecnologias da reprodução, como transferência nuclear, ICSI e transferência de citoplasma. O controle da herança citoplasmática pode ser útil na seleção o haplótipo de mtDNA de interesse a ser transmitido para a progênie. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do brometo de etídeo (EB) na maturação nuclear e citoplasmática *in vitro* e oócitos bovinos. O EB pode ser utilizado em modelos biológicos envolvendo estratégias de prejuízo da replicação de um haplótipo de mtDNA para permitir que um segundo haplótipo se multiplique. Oócitos obtidos de ovários de vacas abatidas (n=803), com *cumulus* compacto e citoplasma uniforme, foram divididos em 1 grupo controle e 7 tratamentos (média de 33 oócitos/grupo, 3 repetições) com concentrações crescentes de 0,5; 1,5; 2,5; 3,5; 4,5; 5,5 e 7,0µg/mL de EB (Sigma, St. Louis, USA). A MIV foi realizada em meio TCM-199 suplementado com 10% de SFB, FSH (1µg/mL), hCG (50µg/mL), estradiol (1µg/mL), piruvato de sódio (0,20mM), amicacina (83,4µg/mL) e 50ng/mL de uridina 5'-trifosfato em 5% CO₂ em ar a 38,5°C. Cada tratamento foi isolado em poços de uma placa de 24 poços. Depois de 24h de MIV, os oócitos foram corados de acordo com Cherr *et al.* (Journal of Experimental Zoology 246, 81-93, 1988) e avaliados em microscopia de epifluorescência (isotiocianato de fluorosceína, comprimentos de onda 490/520nm), quanto à migração de grânulos corticais (GC), indicativo de maturação citoplasmática; e quanto à progressão para a fase de metáfase II (Hoechst 33342, comprimentos de onda 355/465nm), indicativa de maturação nuclear. Os resultados foram analisados pelo teste de Duncan (SAS System). O prejuízo da migração de GC foi significativo ($P<0,05$) em concentrações superiores a 2,5µg/mL EB, com aumento da ausência de migração (0 e 9,87% no controle e tratamento, respectivamente) e diminuição da migração completa de GC (50,75 e 13,58% no controle e tratamento, respectivamente). A migração parcial de GC foi diferente do controle (49,25%) nos grupos 2,5, 4,5 e 7µg/mL EB (76,34, 77,96 e 76,86%, respectivamente). Não foi observado efeito deletério significativo da droga até 1.5µg/mL EB. A presença de metáfase II, indicativa de maturação nuclear, foi prejudicada de maneira proporcional à concentração a partir de 2,5µg/mL EB (58,87 e 22,22% no controle de 2,5µg/mL EB, respectivamente, $P<0,0001$). Durante a maturação oocitária, as células da granulosa apresentam metabolismo elevado e fornecem energia ao oócito. O tratamento com EB deve prejudicar o metabolismo destas células, refletindo na maturação oocitária citoplasmática e nuclear. De acordo com estes resultados, concentrações até 1.5µg/mL de EB por 24h não prejudicaram a maturação nuclear e citoplasmática oocitária. Necessita-se, entretanto, avaliar se esta faixa de concentrações será suficiente para garantir o prejuízo da replicação mitocondrial do zigoto receptor após a transferência de citoplasto.

FAPESP proc.02/05054-7.

DINÂMICA DA CONCENTRAÇÃO INTRACELULAR DE GLUTATIONA EM OÓCITOS BOVINOS MATURADOS *IN VITRO* EM MEIOS SUPLEMENTADOS COM PRECURSORES DE GLUTATIONA

Tetzner, T.A.D.¹; Saraiva, N.Z.¹; Wolf, A.¹; Ferreira, C.R.¹; Perecin, F.¹; Borges, J.C.¹; Méo, S.C.²; Vantini, R.¹; Garcia J.M.¹

¹DMVPRA FCAV-UNESP, 14884-900, Jaboticabal-SP, Brazil, ²CPDGRA-IZ, APTA/SAA, Nova Odessa-SP, 13460-000, Brazil. tatiane_tetzner@yahoo.com.br

A glutathione (GSH) é um tripeptídeo fundamental para a proteção da célula contra o estresse oxidativo e participa nos processos de maturação oocitária. Sua síntese em oócitos é indicativo confiável de maturação citoplasmática. O objetivo desse experimento foi avaliar a concentração intracelular de GSH em oócitos imaturos (0 hora), e no decorrer do processo de MIV (8, 16 e 24h), em meio contendo componentes de thiol ou não. Oócitos (n=1050) obtidos a partir de ovários de vacas de abatedouro e apresentando citoplasma homogêneo e *cumulus* compacto, foram distribuídos em sete grupos experimentais em cinco repetições. Foram coletados oócitos imaturos (0h) e o restante foi distribuído aleatoriamente nos dois grupos experimentais, controle (CON): TCM-199 Bicarbonato base, suplementado com SFB (10%) e hormônios; e BSA + Cisteína + Cisteamina (BCC): TCM-199 Bicarbonato base, suplementado com BSA (0,5%) e hormônios, adicionado de L-cisteína (825µM) e de cisteamina (100µM), para cultivo em estufa úmida a 38,5°C e 5% de CO₂ em ar, durante 8 (8HCON e 8HBCC), 16 (16HCON e 16HBCC) ou 24h (24HCON e 24HBCC). A concentração de GSH foi mensurada pelo protocolo de Browne e Armstrong (Methods in molecular biology, v. 108, p.347-353, 1998) com adaptações. Para cada horário de coleta, 30 oócitos CON e BCC tiveram as células do *cumulus* removidas com hialuronidase (0,2%) e foram depositados em microtubo, contendo 100 µL de solução de extração de ácido meta-fosfórico (SEAM). O conteúdo foi homogeneizado com agulha (29G ½) para a lise e estocado a -20oC até a leitura. As amostras foram centrifugadas (1500RPM) e o sobrenadante (100 µL) transferido para um tubo de ensaio, contendo 2mL de solução tampão de glutathione (TG), ao qual foi adicionado 100 µL do reagente o-phthaldialdehyde (OPT). A leitura foi realizada, após incubação por 15min no escuro, em espectrofluorímetro (Hitachi – F-2500, Tóquio, Japão) ajustado para emissão em 420 nm e excitação em 350nm. Os resultados foram analisados por ANOVA e as médias pelo teste de Tukey. Não houve diferença estatística quando os tratamentos CON e BCC foram comparados nos mesmos horários. Oócitos maturados *in vitro* por 24h (5,96µmol BCC; 4,82 µmol CON), 16h (4,67µmol BCC; 3,67 µmol CON) e por 8 horas (4,24µmol BCC); apresentam concentração de GSH significativamente superior aos oócitos imaturos (2,08 µmol) sem adição de tióis até 8h de MIV (3,56µmol 8HCON). Estes resultados demonstram que a dinâmica das concentrações de GSH foi similar com (BCC) ou sem (CON) adição de tióis, exceto às 8h de MIV. Resta saber se a suplementação com tióis no meio de MIV tem impacto nos resultados de desenvolvimento *in vitro* de embriões.

Apoio Financeiro: FAPESP proc. 04/12248-8

PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BUBALINOS – RESULTADOS PRELIMINARES

Ferraz, M.L.¹; Watanabe, Y.F.^{1,2}; Joaquim, D.C.¹; Watanabe, M.R.¹; Accorsi, M.F.¹;
Meirelles, F.V.²; Sá Filho M.F.³; Baruselli, P.S.³

¹Vitrogen® Pesquisa e Desenvolvimento em Biotecnologia da Reprodução, Cravinhos–SP, Brasil.
²Depto. de Ciências Básicas da FZEA-USP, Pirassununga–SP, Brasil. ³Depto. de Reprodução Animal da FMVZ-USP, São Paulo–SP, Brasil. marcio@vitrogen.com.br

A criação de búfalos no Brasil tem adquirido proporções consideráveis em função de sua dupla aptidão produtiva (carne e leite), figurando-se como alternativa eficiente para fonte de proteína animal. No entanto, a superovulação (SOV) para transferência de embriões (TE) apresenta resultados pouco animadores, obtendo-se reduzido número de estruturas recuperadas por búfala. Assim, a associação das técnicas de aspiração folicular e fecundação *in vitro* (OPU-FIV) desponta como uma ferramenta alternativa para aumentar a produção embrionária na espécie. O objetivo deste trabalho foi padronizar e tornar aplicável a produção de embriões de búfalos por OPU-FIV, além de avaliar a eficiência do processo conforme o emprego de dois diferentes touros. Os oócitos foram obtidos por aspiração folicular guiada por ultra-som (Aloka SSD 500, Japão) e transdutor vaginal (Aloka 9111-5, Japão) com sistema de agulha 18G (Handel Cook, Austrália) e selecionados segundo morfologia. Estas estruturas foram maturadas por 24 horas em meio TCM199 + FSH/LH/Estradiol + 10% SFB a 38,8°C em 5% de CO₂ em ar. Os oócitos maturados foram colocados em gotas de meio FIV (TALP + BSA, PHE e 10µg/ml heparina) com 1x10⁶ espermatozóides móveis/ml, preparados em gradiente Percoll (45 e 90%). Após 20 a 22 horas, os zigotos foram cultivados em microgotas de meio CR2 + 10% SFB em co-cultura com células da granulosa até o dia 07. Foram aspiradas 14 búfalas, das quais se obteve 131 oócitos viáveis (9,35 ± 3,55 oócitos/doadora). Para teste do sêmen foi feito um pool de oócitos, dividido entre 2 reprodutores (A e B), que produziram 24 embriões totais (1,7 ± embriões/búfala; 18,6% de taxa de produção embrionária), sendo 18 embriões do reprodutor A e 6 embriões do reprodutor B (27,3% e 9,5% de taxa de produção embrionária, respectivamente), valor significativamente superior para o teste de Qui-quadrado (p<0,0032). Foi feita também a avaliação da eclosão embrionária, sendo que 23 dos 24 embriões haviam eclodido no dia 08 (96% de taxa de eclosão). Tais resultados demonstram a viabilidade da produção *in vitro* (PIV) de embriões bubalinos, além da grande variação produtiva entre os dois touros utilizados, sendo, no entanto, necessário incrementar os estudos com melhorias nos processos de MIV/FIV/CIV, viabilizando o emprego dessas técnicas.

AVALIAÇÃO DE UM SISTEMA DE MULTIPLEX-PCR COM O USO DE UM CONTROLE INTERNO DA REAÇÃO PARA A IDENTIFICAÇÃO DO SEXO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*

Rufino, F.A.¹; Wosiacki, S.R.¹; Féres, F.C.²; Lisboa, L.A.²; Seneda, M.M.²; Alfieri, A.A.¹

¹ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva; Laboratório de Virologia Animal; ² Departamento de Clínicas Veterinárias; Laboratório de Reprodução Animal - UEL, Londrina-PR, Brasil. mseneda@uel.br

Os protocolos realizados comercialmente para a determinação do sexo de embriões envolvem a utilização de uma seqüência Y-específica em co-amplificação com uma seqüência autossômica bovina. O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um sistema de multiplex-PCR com controle interno da reação e avaliação da eficiência na identificação do sexo de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Embriões inteiros, no estágio de blastocisto eclodido (n=29) foram transferidos individualmente para tubos de polipropileno com água ultrapura (MilliQ[®]) estéril. Para posterior realização da técnica, os tubos foram incubados com proteinase K (Invitrogen[™] Life Technologies, EUA) por 30min/65°C e, posteriormente, por 10 min/95°C, visando a extração do DNA das células embrionárias. A multiplex-PCR foi realizada utilizando o DNA extraído e PCR-mix constituído por 1x PCR buffer 10x (200 mM tris Hcl, pH 8,4; 500 mM KCl); 2,5 mM de cloreto de Magnésio; 0,1 mM de dNTP; 2,5 unidades de *Platinum Taq DNA polimerase* e água ultrapura (milliQ[®]) estéril. Foram utilizados 0,8 pmol de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) Y-específicos amplificando um produto de 300 pares de bases (pb). Para o controle interno da reação foram utilizados *primers* específicos para a amplificação parcial do gene NDR5 do DNA mitocondrial de *Bos taurus* e *Bos indicus* (0,1 pmol), amplificando um produto de 626pb. A amplificação dos produtos foi realizada com as seguintes condições de tempo e temperatura: 5min/95°C seguido por 20 ciclos de 1min/95°C, 90seg/63°C (anelamento dos *primers* Y-específicos), 1min/72°C e 20 ciclos de 1min/95°C, 90seg/63°C, 30seg/55°C (anelamento dos *primers* do DNA mitocondrial) e 1min/72°C e um ciclo de extensão final de 7min/72°C. Do total de 29 embriões submetidos à multiplex-PCR, 28 embriões (96,55%) tiveram o sexo identificado. A presença de 2 bandas (300 e 626pb) encontrada em 20 embriões (71,42%) identificou os machos. A presença apenas da seqüência mitocondrial em 8 embriões (28,57%) caracterizou os embriões do sexo feminino. A utilização da amplificação do DNA mitocondrial concomitante evitou resultados falsos-fêmeas em 1 amostra (3,44%) indicando ausência de DNA na amostra. A quantidade de *primers* do DNA mitocondrial foi reduzida em comparação com os *primers* Y-específicos devido a quantidade muito superior de DNA mitocondrial contido nos embriões. O número de ciclos foi otimizado, consistindo na amplificação apenas do DNA Y-específico nos primeiros 20 ciclos e, posteriormente, foi realizada a amplificação do DNA Y-específico e do DNA mitocondrial (20 ciclos finais). O uso de *primers* bovino-específicos para o controle interno das reações foi de extrema importância considerando que os resultados das amplificações são mais confiáveis quando tal procedimento é adotado, excluindo a possibilidade de resultados errôneos como falsas fêmeas ou ausência de produtos amplificados.

OTIMIZAÇÃO DE UMA TÉCNICA DE MULTIPLEX-PCR PARA A IDENTIFICAÇÃO DO SEXO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*

Rufino, F.A.¹; Wosiacki, S.R.¹; Lisboa, L.A.; Seneda, M.M.²; Alfieri, A.A.¹

¹ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva; Laboratório de Virologia Animal; ² Departamento de Clínicas Veterinárias; Laboratório de Reprodução Animal - UEL, Londrina-PR, Brasil. mseneda@uel.br

No sistema de produção *in vitro* de embriões (PIVE) tem sido observado um desvio na proporção macho:fêmea, com a porcentagem de embriões do sexo masculino superior à proporção teoricamente esperada de 50% para cada um dos sexos. A falta de receptoras em número e qualidade suficientes, aliada à não congelabilidade dos embriões produzidos *in vitro*, torna a desproporção entre os sexos ainda mais grave. Esse fato abre perspectivas para a instalação de um sistema efetivo de determinação do sexo de embriões bovinos produzidos *in vitro*. O presente trabalho teve como objetivo a otimização de um protocolo de multiplex-PCR destinado à identificação do sexo de embriões produzidos *in vitro*. Sessenta e três embriões inteiros nos estádios de blastocistos a blastocistos eclodidos foram transferidos individualmente para tubos de polipropileno contendo 10 µL de água ultrapura (MilliQ®) estéril. Em cada tubo foi adicionada 0,8 µg de proteinase K por tubo (Invitrogen™ Life Technologies, EUA) e incubados por 30min/65°C e, posteriormente, por 10min/95°C para a lise das células embrionárias. A técnica de multiplex-PCR foi realizada com 5 µL de DNA e água ultrapura (MilliQ®) estéril simulando um hemi-embrião e 45 µL de PCR-mix constituído por 1x PCR buffer 10x (200 mM tris Hcl, pH 8,4; 500 mM KCl) (Invitrogen™ Life Technologies, EUA); 2,5 mM de cloreto de Magnésio (Invitrogen™ Life Technologies, EUA); 0,1 mM de dNTP (Invitrogen™ Life Technologies, EUA); 2,5 unidades de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen™ Life Technologies, EUA); 0,8 pmol de oligonucleotídeos iniciadores (primers) específicos para o cromossomo Y bovino, amplificando um produto de 300 pares de bases (pb) e 0,1 pmol de primers específicos para o DNA mitocondrial bovino como controle interno do sistema, amplificando um produto de 626 pb (Invitrogen™ Life Technologies, EUA); água ultrapura (MilliQ®) estéril. A amplificação do produto foi realizada com as seguintes condições de tempo e temperatura: 5min/95°C seguido por 20 ciclos de 1min/95°C, 90seg/63°C (anelamento dos *primers* Y-específicos), 1min/72°C e 20 ciclos posteriores de 1min/95°C, 90seg/63°C, 30seg/55°C (anelamento dos *primers* autossômicos) e 1min/72°C completando 40 ciclos totais e um ciclo de extensão final de 7min/72°C. A eficiência da técnica foi de 90,47% (57/63). A presença de duas bandas, 626pb e 300pb, demonstradas em 38 embriões (60,31%), determinou um embrião macho. Quando se evidenciou a presença apenas da seqüência autossômica (626pb), 19 embriões (30,15%) foram considerados fêmeas. Os resultados apresentam o desenvolvimento de um protocolo prático e rápido por meio da multiplex-PCR para identificação do sexo de embriões PIVE.

INTERAÇÃO CUMULUS-OÓCITO BOVINO NO PROCESSO DE MORTE CELULAR PROGRAMADA

Emanuelli, I.P.¹; Carambula, S.F.¹; Ripamonte, P.¹; Mesquita, L.G.¹; Biase, F.¹; Perna Junior, F.¹; Leal, C.L.V.¹; Santos, W.K.F.¹; Merighe, G.K.F.¹; Meirelles, F.V.¹

¹Departamento de Ciências Básicas – Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento, FZEA/USP, Pirassununga-SP, 13635-970 – Brasil. isabele@cesumar.br

A aquisição da competência para o desenvolvimento do oócito depende de alterações morfológicas, bioquímicas e moleculares. Essas alterações ocorrem tanto nos oócitos como nas células do cumulus. Sabe-se que o sistema de produção de embriões *in vitro* é influenciado por diversos fatores, entre eles, a qualidade morfológica dos complexos cumulus-oócito (COCs). Tendo em vista a heterogeneidade dos COCs recuperados dos ovários coletados em abatedouro (Guinther; Animal Reprod. Scin., 2000), a interação entre oócito e cumulus (Peres; Hum. Reprod., 1997) e a constatação de morte celular programada nas CC (Tilly; Rev. Reprod., 1996); no presente trabalho verificou-se a interação das células do cumulus e oócito no processo de morte celular programada em COCs de diferentes classificações morfológicas em bovinos. A interação cumulus e oócito no processo de morte celular programada em COCs bovinos com morfologia distinta. Os COCs foram puncionados de ovários de abatedouro, selecionados e classificados em 3 qualidades morfológicas quanto as camadas de células: A: cumulus completo; B: cumulus parcial; C: cumulus expandido (todos com ooplasma homogêneo). Os COCs foram utilizados para avaliação quantitativa e qualitativa da fragmentação do DNA das células do cumulus (CC) antes e após a maturação *in vitro* pelas técnicas de Ensaio Cometa e TUNEL, respectivamente. A avaliação dos genes BAX e BCL-2 nas CC foi realizada em 0h e 24h pela presença de proteínas e dos transcritos. A maioria das CC dos COC-A apresentava dano mínimo ou inexistente no DNA. Ao contrário, os COCs B e C após a retirada do folículo apresentavam-se em estágio mais avançado de fragmentação do DNA (A: 0,0%; B: 5,98%; C: 7,78%; p<0,001). Após a maturação dos COCs houve um aumento significativo dos núcleos fragmentados nos grupos C e principalmente no B (A:4,06%; B: 39,45%; C: 13,44%; p<0,001). A expressão da proteína BCL-2 nos COCs não diferiu entre as diferentes morfologias de COCs. No entanto, a razão entre as proteínas BCL-2/BAX foi maior nos grupos com o cumulus completo e no grupo com o cumulus expandido. O grupo de COC-B foi o que apresentou maior quantidade da proteína BAX e menor relação entre as proteínas BCL-2/BAX. Com base nestes resultados, conclui-se que a morfologia COCs está relacionada com o status do DNA das CC e que baixa razão das proteínas BCL-2/BAX está relacionada com o aumento de fragmentação nuclear nas CC. No entanto, essa relação não ocorre com transcritos dos genes BCL-2 e BAX.

Apoio financeiro: FAPESP.

COMPETÊNCIA CINÉTICA DE COCs DURANTE O CULTIVO *IN VITRO* ATÉ O ESTÁDIO DE BLASTOCISTO

Emanuelli, I.P.¹; Carambula, S.F.¹; Ripamonte, P.¹; Mesquita, L.G.¹; Perna Junior, F.¹; Cortezzi, S.S.¹; De Bem, T.H.C.¹; Merighe, G.K.F.¹; Leal, C.L.V.¹; Meirelles, F.V.¹

¹Departamento de Ciências Básicas, Universidade de São Paulo, Pirassununga, São Paulo, Brasil, 13635-900. isabele@cesumar.br

Cerca de 40% dos oócitos bovinos fecundados não completam o desenvolvimento da fase de pré-implantação. Sabe-se que o sistema de produção de embriões *in vitro* é influenciado por diversos fatores, entre eles, a qualidade morfológica dos complexos de *cumulus* oócito (COCs). Estes fatores podem provocar alterações na maturação dos oócitos e nas taxas de desenvolvimento. Com base nestas evidências, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da morfologia dos COCs sobre a cinética do desenvolvimento embrionário. Os COCs foram puncionados de ovários de vacas abatidas, selecionados (n=650) e classificados em 3 qualidades morfológicas: A: *cumulus* completo; B: *cumulus* parcial; C: *cumulus* expandido (todos com ooplasma homogêneo). Os COCs foram maturados em meio TCM 199 suplementado com SFB por 24h. Após a maturação, os oócitos foram submetidos à ativação partenogenética (ionomicina à 5µM + 6-DMAP à 2mM) e cultivados em SOF à 38°C em 5%CO₂ e 5%O₂. As taxas de clivagem, a *competência do desenvolvimento e a qualidade dos embriões partenogenéticos foram estimadas até o 9º dia pós-ativação*. O grupo COC-A atingiu o 4º ciclo celular mais rapidamente em comparação aos grupos COC-B e COC-C, além disso, os oócitos oriundos de COCs de qualidade A obtiveram maior competência para atingir o estágio embrionário de oito células (COC-A - 41,7%; COC-B - 27,5% e COC-C - 33,3%; p<0,05). A utilização de COC-A para produção de embriões *in vitro* foi positiva para taxa de clivagem, bem como nas taxas de blastocistos e eclosão no 9º dia de cultivo. Os COCs dos grupos B e C tiveram taxas inferiores em todos os parâmetros avaliados em comparação aos COC-A, exceto no percentual de blastocistos sobre os embriões que ultrapassaram o estágio de oito células (A- 41,1%; B- 30,5%; C- 32,6%; p>0,05). Na avaliação da qualidade dos embriões pela contagem de núcleos da massa celular interna e do trofotoderma não foi observada diferença entre os grupos. Com base nestes resultados podemos concluir que a morfologia dos COCs interfere na cinética e no potencial do desenvolvimento embrionário bovino *in vitro*, não alterando a qualidade do blastocisto e sim a quantidade de oócitos que conseguem ultrapassar o bloqueio embrionário e desenvolver a blastocisto.

Apoio Financeiro: FAPESP-Brasil.

PRODUÇÃO COMERCIAL DE EMBRIÕES OVINOS *IN VITRO*.

Watanabe, M.R.¹; Joaquim, D.C.¹; Meirelles, F.D.P.²; Meirelles, F.V.²; Watanabe, Y.F.^{1,2}

¹Vitrogen® Pesquisa e Desenvolvimento em Biotecnologia da Reprodução, Cravinhos–SP, Brasil.

²Depto de Ciências Básicas da FZEA-USP, Pirassununga-SP, Brasil.

michele@vitrogen.com.br

Nos últimos anos, a ovinocultura brasileira tem apresentado um grande interesse em desenvolver novas técnicas reprodutivas visando a disseminação rápida de animais com grande potencial genético. Desde o nascimento de vários cordeiros há 15 anos, recentes avanços têm sido verificados nas diferentes etapas de produção *in vitro* de embriões, desde a maturação dos oócitos às condições de cultivo dos embriões. Embora os resultados da FIV em ovinos no Brasil ainda são iniciais, é importante dominar estas técnicas de produção *in vitro* de embriões, principalmente no que diz respeito à recuperação dos oócitos e a capacitação espermática. O objetivo deste trabalho foi avaliar a variação na produção de embriões quando diferentes carneiros foram utilizados em trabalhos comerciais. Para tanto, os oócitos foram obtidos por aspiração folicular via laparoscopia (LOPU), selecionados segundo sua morfologia e, posteriormente, maturados *in vitro* em TCM199 acrescido de hormônios (FSH/LH/Estradiol) e 10% SFB por 24 horas a 38,7°C e 5 % de CO₂ em ar. Os espermatozoides móveis foram obtidos por centrifugação em diferentes gradientes de Percoll (45 e 90%) e fecundados em meio TALP acrescido de 10µg heparina/ml numa concentração de 1X10⁶ spz/ml. Após 24 horas de incubação, os zigotos foram transferidos para cultivo *in vitro* em meio CR2 + 10% SFB. A partir de 7 dias de cultivo, os embriões foram avaliados e classificados de acordo com o seu estágio de desenvolvimento para posterior transferência em receptoras sincronizadas. Os dados foram analisados por ANOVA e comparados aplicando o teste de TUKEY-KRAMER HSD. Foram avaliados 3 carneiros acasalados com 11 doadoras em 13 sessões de LOPU, onde se obteve 107 oócitos viáveis, 32 embriões (30%), dos quais 7 foram transferidos resultando em 1 gestação aos 30 dias (14%). Foram transferidos mais 15 embriões dos quais aguarda-se diagnóstico de gestação. De acordo com os resultados observamos uma variação significativa (P<0,05), entre os carneiros quanto à taxa de desenvolvimento à blastocisto (C1: 15,9±8,0%, C2: 57,5±10,3% e C3: 25,1 ± 8,0%). O carneiro C1 acasalado com 5 doadoras obteve uma variação na produção de embriões de 10 a 22%, o C2 com 2 doadoras obteve 53 e 67% de embriões e o C3 com 4 doadoras obteve de 0 a 64% de produção de embriões. Concluímos assim, que existe uma variação individual entre os carneiros quanto à produção de embriões (mórula e blastocisto). É todavia importante testar o efeito dos acasalamentos sobre o desenvolvimento embrionário.

O presente trabalho teve a colaboração da equipe Genoma Animal e Biomax na recuperação de oócitos via LOPU.

EFEITO DA HEPARINA NO MEIO DE CULTIVO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO* E A PROPORÇÃO SEXUAL

Pegoraro, L.M.C.¹; Rheingantz, M.G.T.²; Bredbacka, P.³; Coscioni, A.⁴; Rambo, G.⁵; Abrahão, M.⁶; Meirelles, M.⁶; Saalfeld, M.H.⁷; Agnonni, L.¹

1-Embrapa Clima Temperado Br 392 km 78 Pelotas 96001-970 RS, Brasil; 2-Inst. Biologia, UFPel; 3-Finenzymes, Finlândia; 4-PPGZ-FAEM UFPel; 5-Bolsista IC UFPel; 6-Estagiários Laboratório de Reprodução Animal Embrapa Clima Temperado 7-Emater-RS. ligia@cpact.embrapa.br

O desvio da proporção sexual no sistema de produção *in vitro* de embriões bovinos é relatado em vários experimentos. Diversos fatores podem estar envolvidos neste processo, incluindo os componentes do meio de cultivo. O objetivo do experimento foi avaliar o efeito da heparina em diferentes concentrações (0, 5, 10 e 20 µg/mL) no cultivo de embriões bovinos PIV sobre as taxas de desenvolvimento embrionário e a proporção macho:fêmea obtida. Ovários de bovinos provenientes de abatedouros foram transportados ao laboratório em solução fisiológica à 25°C, adicionada de antibióticos. Complexos de ovócitos e células do *cumulus oophorus* (COCs) foram maturados, durante 24 h, em meio TCM 199 adicionado de piruvato, FSH/LH e antibióticos, em estufa de CO₂ a 38,5°C. Após o período de maturação, os COCs foram transferidos para o meio de fecundação IVF-TALP e inseminados com espermatozoides preparados pelo método de *swim-up*. Seguindo-se 18 h, os ovócitos foram submetidos ao vórtex para separação das células do *cumulus*. Os presumíveis zigotos foram cultivados em meio SOFaa, suplementado com 5% SFB, piruvato, gentamicina e diferentes concentrações de heparina, em estufa de CO₂ à 38,5°C, durante 7 dias. Foram estabelecidos 4 grupos: G1 (controle: sem heparina, n = 178), G2 (5 µg/mL heparina, n = 189), G3 (10 µg/mL heparina, n = 182) e G4 (20 µg/mL heparina, n = 193). O desenvolvimento embrionário nos diferentes grupos foi avaliado no dia 7 de cultivo, considerando o número de blastocistos viáveis obtidos. A determinação do sexo dos blastocistos foi efetuada através de PCR. Os resultados do experimento foram analisados pelo teste do Qui-quadrado. As percentagens de desenvolvimento (% blastocistos/clivados) em D-7 foram superiores no grupo controle em relação aos demais tratamentos (51,2 *versus*; 29,7; 25,6; 23,3; P<0,001). A porcentagem de machos observada no grupo controle diferiu da 50% esperada (66,15%, P<0,05). Foi observada tendência (P<0,1) para desvio da proporção sexual em favor das fêmeas quando o meio de cultivo foi adicionado de heparina na concentração de 20 µg/mL (48,72% de machos). Estes resultados demonstraram o efeito tóxico da heparina sobre o desenvolvimento embrionário no sistema de cultivo utilizado. O desvio na proporção sexual observado sugere que as fêmeas sejam mais tolerantes ao efeito nocivo da heparina.

INFLUÊNCIA DE PROTOCOLOS DE SUPERESTIMUAÇÃO E PRIVAÇÃO HORMONAL NA PRODUÇÃO *in vitro* DE EMBRIÕES NELORE (*Bos taurus indicus*)

Satrapa, R.A.¹; Ferreira, M.M.G.²; Ederhardt, B.G.²; Monteiro, F.M.²; Melo, D.S.²; Potiens, J.R.³; Barros, C.M.²

¹Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ/UNESP. ²Depto. de Farmacologia, IB-UNESP, Botucatu. ³Central Bela Vista, Pardinho- SP. rsatrapa@yahoo.com.br

Existem indicações na literatura de que o prolongamento do período entre a estimulação ovariana e a aspiração folicular guiada por ultra-som (OPU), induziria uma condição de atresia folicular, que poderia ser benéfica ao desenvolvimento dos oócitos. Blondin et al. (Biol Reprod 66:38-43, 2002) superestimularam (FSH) novilhas da raça Holandesa e atrasaram a OPU por 48 h, isto é, induziram atresia nestes folículos privados de FSH por 48 h. Além disso, 6 h antes da OPU, foi administrado LH para acelerar a maturação folicular. Este protocolo originou uma taxa de blastocisto surpreendentemente elevada (80,4±9,4%). No presente trabalho, o protocolo de Blondin foi comparado simultaneamente a outros protocolos utilizados para OPU e PIV, em animais da raça Nelore. Vacas Nelore (n=18) foram distribuídas aleatoriamente em 3 grupos experimentais: Grupo 1 (apenas OPU), Grupo 2 (superestimulação e OPU) e Grupo 3 (superestimulação ovariana associada a privação de FSH e OPU). Foram realizadas 3 OPU e a cada OPU os animais mudavam de grupo, de tal forma que ao final do experimento todas as vacas haviam passado pelos 3 protocolos. Em dia aleatório do ciclo estral (denominado D-2), folículos =6 mm foram aspirados para induzir uma nova onda de crescimento folicular 2 dias mais tarde (D0). Nos animais do Grupo 1 a OPU foi realizada no D2 e, a seguir, os oócitos encaminhados para a PIV. No Grupo 2, a partir do D0, as vacas foram superestimadas com pFSH (Folltropin®, 2 aplicações diárias de 30 mg, via IM, durante 3 dias consecutivos) e 6 h após a última dose de FSH receberam LH exógeno (12,5 mg, via IM, Lutropin®, D3). A OPU foi realizada 6 h após a aplicação de LH, ou seja, 12 h após a última dose de FSH. Os animais do Grupo 3 receberam tratamento idêntico aos do Grupo 2 exceto que a administração de LH ocorreu 42 h após a última dose de FSH e a OPU ocorreu 6 h mais tarde. Portanto, neste grupo os folículos foram privados de FSH por um período de 48 h. Tanto as taxas de clivagem como de blastocisto foram semelhantes ($p>0,05$, Regressão Logística) entre os oócitos provenientes dos Grupos 1, 2 e 3, respectivamente: 77,4% (144/185) e 42,70% (79/185), 75,54% (105/139) e 31,65% (44/139), 63,52% (101/159) e 33,33% (53/159). Entretanto, as taxas de blastocisto eclodidos foram mais elevadas ($p<0,01$) no Grupo 1: 30,27% (56/185) quando comparado ao Grupo 2: 11,51% (16/139) ou Grupo 3: 15,72% (25/159). Conclui-se que, ao contrário do reportado para raças européias, a superestimulação ovariana associada à privação de FSH e OPU (Grupo 3) não aumenta a PIV de embriões da raça Nelore. Além disso, as maiores taxas de blastocisto eclodido foram observadas em oócitos provenientes de vacas que não foram superestimuladas (Grupo 1).

PROGESTERONA E OU ESTRADIOL AUMENTAM O NÚMERO DE CÉLULAS DE BLASTOCISTOS BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*

Reis, A.N.¹; Miranda, M.S.²; Silva, A.O.A.¹; Sousa, A.J.O.¹; Silva, L.K.X.¹;
Sousa, J.S.¹; Ohashi, O.M.²

¹Central de Biotecnologia de Reprodução Animal – UFPa, Castanhal-Pa;

²Laboratório Fertilização In Vitro – UFPa, Belém-Pa. areis@ufpa.br

O objetivo deste trabalho foi avaliar o número de células existente nos embriões bovinos no estágio de blastocisto (8º dia), expostos ou não ao estradiol e a progesterona (P_4) durante o cultivo *in vitro*. Os ovários foram coletados em abatedouros e transportados até o laboratório para seleção dos ovócitos. A MIV foi realizada em meio TCM-199 com Bicarbonato acrescido de hormônios, soro e antibióticos, em estufa de CO_2 a 5%, 38,5°C e alta umidade, acrescidas ou não de estradiol (1 µg/ml), onde permaneceram por 24 horas. O sêmen descongelado foi centrifugado em colunas de Percoll (45 e 90%) durante 30 minutos a 200 G, e lavados em meio TALP-Sêmen por 10 minutos a 200 G. A concentração espermática final foi de 10^6 espermatozoides /ml no meio de FIV (TALP-Stock acrescido de PHE, Heparina e BSA). Após 24 horas as CEOBs foram lavadas e adicionadas nos diferentes grupos em meio CR_2 : G1 ($CR_2 + P_4$ -100 µg/ml e CEOBs + Estradiol, n= 324); G2 (semelhante ao G1, sem P_4 , n= 315); G3 ($CR_2 + P_4$ -100 µg/ml, e CEOBs sem exposição ao estradiol, n= 325) e G4 ($CR_2 +$ CEOBs n=322). Os dados foram submetidos a análise de variância ($P<0,05$) e o teste de Tukey. A avaliação da qualidade embrionária foi determinada pelo número total de células dos blastocistos, sendo observados 20 blastocistos de cada grupo, realizada através do HOECHST 33342. -se que quando as CEOBs estavam associadas ao estradiol e ou progesterona (G1, G2 e G3) a quantidade de células dos blastocistos aumentou significativamente (125,9; 128,4 e 123,4 células, respectivamente) ($P<0,05$) quando comparada com o grupo G4 que continha somente as CEOBs (112,5 células) sem a associação com os hormônios. A adição de estradiol e progesterona, isoladamente ou em combinação, ao co-cultivo de CEOB em meio CR_2 demonstrou aumentar significativamente o número de células dos blastocistos quando comparado ao grupo que continha somente células do oviduto.

CONTAMINAÇÃO BACTERIANA EM BOTIJÕES DE NITROGÊNIO LÍQUIDO.

Rubin, M.I.B.¹; Silva, C.A.M.¹; Oliveira, R.A.¹; Pessoa, G.A.¹;
Navarro, R.B.¹; Pretto, A.N.²; Vargas A.C.².

¹Embryolab – Laboratório de Embriologia Animal Departamento de Clínica de Grandes Animais
Prédio 97 Bloco 4 Ala Sul - Hospital Veterinário - Centro de Ciências Rurais

²LABAC - Laboratório de Bacteriologia – Depto. de Medicina Veterinária Preventiva Prédio 44 Ala
Norte; Universidade Federal de Santa Maria. - 97.105-900 Santa Maria/RS -
mararubin@smail.ufsm.br

A conservação de material genético em botijões de Nitrogênio (N₂) líquido, caso do sêmen e de embriões, é utilizada como forma de armazenagem de genes para o melhoramento do rebanho. A inadequada manipulação dos botijões, sem cuidados de higiene na manipulação do N₂ líquido pode servir como um fator potencial para a transmissão de patógenos no momento da inseminação artificial ou da transferência de embriões. São escassas as informações sobre agentes bacterianos presentes em botijões de N₂ líquido, principalmente naqueles provenientes de estabelecimentos rurais após o encerramento de trabalhos de inseminação artificial ou TE. Neste estudo, efetuou-se a coleta de swabs de dois canisters, ainda submersos em N₂ líquido e do fundo do respectivo botijão (n=8), utilizados na estocagem de sêmen e embriões na região central do Estado do Rio Grande do Sul. As amostras, previamente identificadas, foram encaminhadas resfriadas em meio de Stuart modificado ao Laboratório de Bacteriologia da Universidade Federal de Santa Maria (LABAC) onde foram submetidas a pesquisa bacteriológica em condições de aerobiose. Imediatamente, procedeu-se a lavagem dos botijões e canisters com Extran Neutro® (Merck), enxágüe e desinfecção com Glutaraldeído 2% (Glutaron II® - Rioquímica) e etanol 70%. Após secagem à temperatura ambiente, outra amostra foi coletada de cada botijão e dos canisters. O *Bacillus cereus* foi identificado nos oito containers, tanto nas amostras do fundo, como nos canisters. Em dois botijões foi ainda isolado bacilo Gram-Negativo oxidase negativa. Após a lavagem e desinfecção dos botijões a maioria dos mesmos não evidenciou contaminação bacteriana, indicando a relevância do procedimento de desinfecção periódica como método de controle sanitário do material genético armazenado em botijões de N₂ líquido destinado à conservação de sêmen e embriões.

ANÁLISE DE TRANSCRITOS ASSOCIADOS À DE NOVO METILAÇÃO DO DNA E ESTRUTURA DA CROMATINA EM BLASTOCISTOS BOVINOS

Camargo, L.S.A.¹; Powell, A.M.²; Vale Filho, V.R.³; Wall, R.J.²

¹Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brasil. 36038-330. ²Biotechnology and Germplasm Laboratory, BARC, USDA, Maryland, EUA. 20705. ³Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil. 30123-970 -.camargo@cnppl.embrapa.br

Metilação do DNA e a estrutura da cromatina possuem papel essencial na regulação da expressão gênica, e são importantes para a manutenção do *imprinting*. Durante o desenvolvimento embrionário inicial, o DNA sofre uma extensa demetilação, seguido de *de novo* metilação após estágio de mórula. Modificações no padrão normal de metilação do DNA e/ou na acetilação de histonas em embriões cultivados *in vitro* ou produzidos por transferência nuclear podem provocar alterações epigenéticas que contribuam para a baixa eficiência dessas técnicas. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a expressão de genes que codificam proteínas associadas à *de novo* metilação do DNA (DNA metiltransferase-3A e -3B), e acetilação (histona acetiltransferase 1 e GCN5) e deacetilação de histonas (histona deacetilase 1) em blastocistos bovinos produzidos *in vivo*, *in vitro* (FIV) e por transferência de núcleos de células somáticas (TNCS). Embriões produzidos *in vivo* foram coletados de vacas superovuladas, sete dias após inseminação artificial. Embriões TNCS foram produzidos com células somáticas obtidas de músculo de fetos com três meses de gestação. Zigotos FIV e embriões TNCS foram cultivados em meio G1.1 na ausência de soro, por 72h a 38,5°C em 5% CO₂, 5% O₂ e 90% N₂. Blastocistos FIV e TNCS foram obtidos com 180-186 h após fecundação *in vitro* ou ativação, respectivamente. Embriões foram congelados e armazenados até extração do RNA. O mRNA extraído foi amplificado e todos os genes foram analisados em embriões individuais. Avaliou-se a expressão em dez blastocistos produzidos *in vivo*, 14 de FIV e 14 de TNCS. A quantificação foi realizada utilizando-se PCR em tempo real e normalizada com a expressão do gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), usado como gene de referência endógeno. Os resultados foram analisados por ANOVA. Blastocistos produzidos *in vivo* apresentaram maior expressão relativa (P<0,01) para todos os genes analisados. Não houve diferença (P>0,05) na expressão relativa dos genes entre blastocistos FIV e TNCS. Esses resultados sugerem que os componentes necessários para o remodelamento da cromatina estão reduzidos em embriões cultivados *in vitro* (blastocistos FIV e TNCS). O ambiente em que o embrião desenvolve pode ter maiores efeitos na expressão de genes do que o método pelo qual foi produzido.

EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO* CULTIVADOS EM MEIO CR2 SUPLEMENTADO COM KNOCKOUT™ SR

Serapião, R.V.^{1,4}; Ramos, A.A.²; Polisseni, J.¹; Folhadella, I.M.^{1,3}; Jasmin.¹; Camargo, L.S.A.¹; Viana, J.H.M.¹; Ferreira, A.M.¹; Sá, W.F.¹; Fonseca, F.A.⁴

¹Embrapa Gado de Leite - Juiz de Fora - MG; ²Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais - Epamig - Belo Horizonte - MG; ³Escola de Veterinária - UFMG - Belo Horizonte - MG;

⁴Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF - Campos dos Goytacazes - RJ
rserapis@yahoo.com.br

O Knockout™ SR (KSR; Gibco Labs., Grand Island, NY) é um suplemento utilizado como substituto do soro para otimizar o cultivo *in vitro* de células tronco embrionárias. Uma vez que o soro fetal bovino (SFB) tem sido associado a várias alterações em embriões bovinos gerados *in vitro*, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do KSR no desenvolvimento de embriões bovinos fertilizados *in vitro*. Oócitos obtidos a partir de ovários coletados em matadouro foram maturados *in vitro* em meio TCM 199 (Gibco Labs., Grand Island, NY) acrescido de 10% de Soro de Vaca em Cio (SVC) e 20µg/ml de FSH, por 24 horas. Após a maturação, os oócitos foram fertilizados *in vitro* com sêmen congelado de um touro previamente selecionado. Espermatozóides viáveis foram obtidos pelo método de *swim up*. A fertilização foi realizada com 2,0 x 10⁶ espermatozóides/ml, em meio Fert TALP acrescido de heparina por um período de 22 horas. Posteriormente, os possíveis zigotos foram divididos aleatoriamente em três tratamentos, sendo T1 (n=389): CR_{2aa} suplementado com 10% SFB; T2 (n=426): CR_{2aa} suplementado com 10% KSR, e T3 (n=424): CR_{2aa} suplementado com 3mg/ml de PVA. Nos três grupos, os embriões foram co-cultivados com suas próprias células do *cumulus*, em gotas de 50µl cobertas com óleo mineral. Todas as etapas foram realizadas em estufa incubadora a 38,5 °C, 95% de umidade e 5% de CO₂ em ar. A taxa de clivagem foi determinada 72 horas pós-fertilização (hpf) e a taxa de blastocistos no sétimo dia pós-fertilização. O número total de células embrionárias foi determinado no oitavo dia pós-fertilização. As taxas de clivagem e blastocistos foram analisadas pelo teste Qui-quadrado e o número total de células por análise de variância, adotando-se como co-variável o estágio de desenvolvimento embrionário. Não houve diferença (P>0,05) entre T1, T2 e T3 em relação à taxa de clivagem (68,9%, 71,4% e 67,2% respectivamente). No entanto, a taxa de blastocistos no T2 (12,4%) foi inferior à observada no T1 (19,2%) e superior a do T3 (5,2%). Quanto ao número total de células, o T1 (109,4±6,1) e o T2 (105,9±5,9) apresentaram resultados semelhantes (P>0,05), sendo os dois superiores ao T3 (79,6±8,4) (P<0,01). A suplementação com KSR em meio de cultivo embrionário produziu uma menor taxa de blastocisto comparado ao SFB, embora o número total de células não tenha sido afetado. Contudo, o KSR proporcionou maior taxa de desenvolvimento de blastocisto que o PVA. Conclui-se que o KSR pode sustentar o desenvolvimento de embriões bovinos fertilizados *in vitro* quando meios de cultivo livres de soro forem recomendados.

CULTIVO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO* EM ÁLCOOL POLIVINÍLICO (PVA)

Silva, D.S.¹; Pozzobon, S.E.¹; Navarro, R.B.¹; Melo, L.C.¹; Silva, C.A.M.¹; Rubin, M.I.B.¹

¹Embryolab – Laboratório de Embriologia Animal - Depto. de Clínica de Grandes Animais
Prédio 97 Bloco 4 Ala Sul - Hospital Veterinário - Centro de Ciências Rurais - Universidade Federal
de Santa Maria. 97.105-900 Santa Maria/RS - sepozzobon@yahoo.com.br

Necessita-se de protocolos eficientes para a produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos que, além de favorecer a sanidade do rebanho, ofereçam resultados satisfatórios, taxas constantes de produção embrionária e produtos saudáveis. Para se avaliar o efeito do álcool polivinílico (PVA) sobre a produção *in vitro* de embriões, complexos *cumulus*-oócitos (CCO) bovinos foram maturados *in vitro* por 24 horas, em placas Nunc de 4 poços em meio TCM-199 suplementado com 10% de soro de égua em estro (SEE), 0,025mg/mL de piruvato de sódio 2,2mg/mL de NaHCO₃, 0,01UI de rFSH-h/mL, 0,5µg/mL de LHb, em atmosfera com 5% de CO₂ em ar, a 39°C. Para a fecundação (D0) o sêmen foi selecionado em gradiente de Percoll, capacitado com heparina, hiperativado com PHE e a concentração final ajustada para 1x10⁶ spz/mL. Os CCO foram fecundados por 18-20 horas em 400µL de meio Fert-Talp com 5% de CO₂ em ar, a 39°C. O cultivo dos zigotos (D1) foi conduzido em 400µL SOFaaci com 0,1% de PVA ou 5% de SEE (controle) sob óleo mineral, em placas Nunc- 4 poços, gaseificadas em bolsas plásticas com 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂. A clivagem, avaliada 48h (D2) após a fecundação foi de 89,1% (93/217) com PVA e de 91,6% (196/214) com o uso de SEE. A produção de blastocistos no D7 e a taxa de eclosão em D9 foram semelhantes, respectivamente, com PVA (28,5% e 22,1%) ou com SEE (29,9% e 24,2%). A reposição do SEE pelo PVA no meio de cultivo oferece resultados similares de produção *in vitro*.

Palavras chave: embrião, PIV, meio definido, PVA.

AVALIAÇÃO DA FRAGMENTAÇÃO DE DNA EM EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS APÓS FECUNDAÇÃO DE OÓCITOS MATURADOS *IN VITRO* EM MEIO SUPLEMENTADO COM DIFERENTES FONTES DE MACROMOLÉCULA

Lo Turco, E.G.¹; Barretto, L.S.S.¹; Perecin, F.¹; Soria, G.F.¹; Bertolla, R.P.², Mingoti, G.Z.³

¹Departamento de Reprodução Animal, FCAV – UNESP, Jaboticabal; ²Setor de Reprodução Humana Hospital São Paulo, UNIFESP, São Paulo; ³Departamento de Produção e Saúde Animal, FMVA – UNESP, Araçatuba

O número de células apresentando fragmentação de DNA dupla fita é indicativo de perda de qualidade embrionária, a avaliação da fragmentação de DNA fita dupla tem se mostrado satisfatória para medir a qualidade de embriões bovinos em diversos estádios de desenvolvimento. O objetivo do presente trabalho foi analisar a integridade da fita dupla de DNA de embriões produzidos após fecundação *in vitro* de oócitos maturados em meio suplementado com 3 diferentes tipos de macromolécula: soro fetal bovino (SFB) ou albumina sérica bovina (BSA), sendo estes meios quimicamente indefinidos, ou ainda uma macromolécula quimicamente definida, o álcool polivinílico (PVA). O oócitos foram colhidos de ovários provenientes de abatedouro e maturados por 24 horas em meio de cultivo de maturação (TCM-199, 0,2 mM de piruvato, 25 mM de bicarbonato de sódio, 75 µg/ml de Kanamicina, 1 µg de 17β estradiol/ml, 0,5 µg de FSH/ml, 100 UI de hCG/ml), acrescidos de 1% de PVA, ou 1% de BSA ou 10% de SFB (dependendo do grupo experimental), em atmosfera de 5% de CO₂ em ar. Após a fertilização, os zigotos foram cultivados, todos em mesmo meio, até o estágio de blastocisto (144 horas após fecundação) e submetidos a técnica do TUNEL (“Terminal Transferase Assay”). Os blastocistos do grupo SFB apresentaram fragmentação de (2,15% ±0,468^a) não diferindo dos grupos BSA e PVA (P<0,05), respectivamente 1,75% ± 0,199^a e 1,80% ± 0,470^a de fragmentação (P>0,05). A macromolécula adicionada ao meio de maturação parece não ter influencia na fragmentação de DNA fita dupla de embriões bovinos cultivados até o estágio de blastocisto, todavia, ainda existem muitos mecanismos a serem investigados sobre a influência da macromolécula nos oócitos durante a maturação.

Apoio financeiro FAPESP

AValiação DA APOPTOSE EM EMBRIÕES SUÍNOS PRODUZIDOS *IN VITRO* (RESULTADOS PARCIAIS)

Coutinho, A.R.S.; Simões, R.; Marques, M.G.; Nascimento, A.B.; Oliveira, V.P.; Tavares, M.N.;
Visintin, J.A.; Assumpção, M.E.O.A.

Departamento de Reprodução Animal – FMVZ-USP, São Paulo-SP, Brasil - nanicout@usp.br

A apoptose é um evento fisiológico envolvido na morte e replicação tecidual, desempenhando papel fundamental na remodelagem dos tecidos durante a embriogênese. Ocorre durante a fase de pré implantação em embriões *in vivo* e *in vitro*, estando presente em maior intensidade em embriões produzidos *in vitro*. A atividade transcripcional em embriões suínos ocorre no estágio de 4 células, caracterizado pelo ciclo celular de maior duração no período de pré implantação. Este estágio pode ser marcado pelo bloqueio do desenvolvimento embrionário, onde grande número de embriões interrompem o desenvolvimento, contribuindo para diminuição do número de embriões transferíveis. O objetivo deste estudo foi avaliar a relação do mecanismo de apoptose com a fase de bloqueio em embriões suínos produzidos *in vitro*. Os embriões foram produzidos a partir de oócitos imaturos após MIV/ FIV e CIV em meio PZM-3, enriquecido com 3mgBSA/ml a 38,5°C, 5%CO₂ em ar e umidade de 95%. O desenvolvimento embrionário foi analisado às 48hs após início do cultivo para verificar os índices de clivagem, de bloqueio (4 células), de não bloqueio (>8células) e de embriões degenerados. Dos 625 oócitos GI, GII e GIII destinados à PIV, 0,7±0,05 (430/625) clivaram; 0,27±0,1 (166/625) bloquearam; 0,43±0,1 (264/625) não bloquearam e 0,29±0,05 (195/625) degeneraram. Embriões bloqueados e não bloqueados foram avaliados quanto à presença de apoptose. Para detecção de apoptose foi adotada a análise qualitativa de fluorescência das células embrionárias, utilizando o marcador de DNA YOPRO-1, que é permeável à membrana plasmática de células apoptóticas em estágio inicial. Os embriões foram tratados com 1mM de YOPRO-1/500µl de PBS, incubados 15 minutos em estufa a 38,5°C, 5%CO₂ em ar e umidade de 95% e avaliados imediatamente em microscopia confocal. Embriões bloqueados apresentaram marcação positiva para apoptose quando comparados aos embriões não bloqueados. Conclui-se que embriões bloqueados sofrem apoptose, porém é importante ressaltar que ensaios moleculares específicos para apoptose precisam ser realizados para confirmação deste resultado.

Suporte financeiro FAPESP 04/01252-4

ANOMALIAS CROMOSSÔMICAS NO INÍCIO DE DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES ZEBUÍDOS PRODUZIDOS *IN VITRO**

Pires, R.M.L.¹; Alvarez, R.H.¹; Ligori, A.C.¹; Coelho, L.A.^{1,2}; Martinez, A.C.¹

¹Centro de P&D Genética e Reprodução Animal, Instituto de Zootecnia, Rua Heitor Pentead, 56, Centro, Nova Odessa, SP, CEP 13460-000; ²Fac. de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, USP, Av. Duque de Caxias Norte, 225, CEP 13635-900, Pirassununga, SP. pires@iz.sp.gov.br

Embriões bovinos produzidos *in vitro* (FIV) apresentam uma alta incidência de anomalias cromossômicas. Porém, ainda não é conhecido se esse quadro acontece em embriões zebuínos. O presente trabalho objetivou avaliar a frequência de alterações cromossômicas de embriões FIV, de origem zebuína. Foram utilizados embriões FIV nos estágios de 2, 4, 8 e 16 células e mórulas, produzidos a partir de oócitos coletados de ovários de vacas Nelore abatidas. Como controle foram utilizadas mórulas recuperadas de vacas Nelore superovuladas (PIV). A leitura do cariótipo foi realizada em microscópio ótico após preparo das amostras pelo método de coloração convencional (Giemsa) e as diferenças foram estabelecidas pelo teste de χ^2 . Foram encontradas anomalias cromossômicas em 29,9% (32/107) dos embriões FIV e 13% (3/23) dos embriões PIV analisados ($P>0,05$). Igualmente, a incidência de anomalias cromossômicas não foi influenciada pelo estágio de desenvolvimento dos embriões. As alterações cromossômicas encontradas, tanto nos embriões FIV como nos PIV, foram mixoploidias e poliploidias. Dos embriões FIV que apresentaram anomalias cromossômicas, 59,4% eram do sexo feminino e 40,6% do masculino ($P>0,05$). Concluiu-se que uma elevada proporção de embriões zebuínos FIV apresentaram anomalias cromossômicas e sua incidência não está associada a um estágio de desenvolvimento embrionário específico.

EFEITO DO CR2aa, KSOMaa E SOFaa NO CULTIVO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*

Tavares, L.M.T.; Feitosa, W.B.; Mello, M.R.B.; Lima, A.S.; Assumpção, M.E.O.A.; Visintin, J.A.

Departamento de Reprodução Animal – FMVZ-USP, São Paulo-SP, Brasil - visintin@usp.br

O objetivo deste estudo foi avaliar os meios quimicamente semi-definidos CR2, KSOM e SOF suplementados com aminoácidos (aa) e 0,3mgBSA/ml no desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro* até o estágio de blastocisto. Oócitos aspirados de ovários provenientes de matadouro foram maturados *in vitro* em meio TCM199 + 10%SFB + HCG + FSH + 17 β estradiol em estufa a 38,7°C e 5%CO₂ em ar durante 24 horas. Para a FIV (D0), utilizou-se dose inseminante de 1x10⁶ espermatozoides/ml. Os gametas foram cultivados no meio sp-TALP + PHE + heparina, em estufa a 38,7°C, umidade saturada, atmosfera com 5%CO₂ em ar durante 18 horas. Os presumíveis zigotos foram cultivados em 500 μ l dos meios quimicamente semi-definidos (CR2aa, KSOMaa ou SOFaa) em estufa a 38,7°C, atmosfera úmida e 5%CO₂ em ar, durante 10 dias consecutivos. Os índices de clivagem, de mórula/blastocisto e de blastocisto expandido foram avaliados nos dias 3, 7 e 10 de cultivo, respectivamente. Os dados foram analisados pelo Qui-Quadrado (X²) com diferença significativa para (P<0,05). Não houve diferença (P>0,05) quanto aos índices de clivagem entre os meios CR2aa (73,3%; n= 307), KSOMaa (78,5%; n= 279) ou SOFaa (71,8%; n= 241). Em relação aos índices de mórula, houve diferença significativa entre o meio SOFaa e os meios CR2aa e KSOMaa (2,9%^b x 5,3%^b; 7,3%^b). Quanto aos blastocistos inicial (Bi) e expandido (Bl), houve diferença significativa entre o meio SOFaa e os meios CR2aa e KSOMaa (Bi = 0,6%^a x 3,1%^b; 3,2%^b e Bl = 2,9%^a x 4,6%^b; 6,2%^b). Em relação aos índices de eclosão, o meio CR2aa (58,7%^a) mostrou diferença significativa em relação ao SOFaa (73,7%^b), mas não diferiu do KSOMaa (65,2%^{ab}). Concluiu-se que os meios CR2aa e KSOMaa apresentaram melhores condições para o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto.

CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS EM MEIOS SEMI-DEFINIDOS OU EM CO-CULTIVOS COM CÉLULAS PRIMÁRIAS

Tavares, L.M.T., Feitosa, W.B., Magnusson, V.; Goissis, M.D.;
Assumpção, M.E.O.A., Visintin, J.A.

Departamento de Reprodução Animal – FMVZ-USP, São Paulo-SP, Brasil - visintin@usp.br

Os índices de prenhez com embriões produzidos *in vitro* são variáveis. Esta variação está relacionada com a qualidade embrionária que é influenciada por diferentes sistemas de cultivo. O objetivo deste trabalho foi avaliar o desenvolvimento de embriões bovinos fecundados *in vitro* e cultivados nos meios semi-definidos CR2, KSOM e SOF suplementados com aminoácidos (aa) e 10% SFB ou co-cultivados no meio TCM199 com células da granulosa (CG) ou de oviduto (CO) suplementados com 10% SFB. Oócitos aspirados de folículos de ovários de matadouro foram maturados por 24 horas no meio TCM199 + 10% SFB + HCG + FSH + 17 β estradiol. Para a FIV, o sêmen foi separado em gradiente Percoll (45/90%) e ressuspensionado na concentração de 1x10⁶ spzt/ml. Os oócitos foram fecundados (D0) no meio FIV (sp-TALP + PHE + heparina) em estufa a 38,7°C, atmosfera úmida e 5% CO₂ em ar, durante 18 horas. Os presumíveis zigotos foram cultivados em 500 μ l dos meios quimicamente semi-definidos CR2aa (N= 307), KSOMaa (N= 304) e SOFaa (N= 302) ou co-cultivados no TCM199 com CG (N= 901) ou CO (N= 653) em estufa a 38,7°C, atmosfera úmida e 5% CO₂ em ar, durante 10 dias consecutivos. Foram avaliados os índices de clivagem no D3, os de mórulas e blastocistos no D7 e os de eclosão no D10. Para a análise estatística aplicou-se ANOVA, utilizando o SAS. Não houve diferença significativa (p>0,05) nos índices de clivagem entre os cultivos com CR2aa (67,1%), KSOMaa (77,6%) SOFaa (80,5%), CG (64,6%) ou CO (67,7%). Foi observada diferença (p<0,05) nos índices de mórula entre os cultivos com CR2aa (7,3^{ab}), KSOMaa (3,8%^a), SOFaa (4,9%^{ab}), CG (7,2^b) ou CO (7,6%^{ab}). Quanto aos índices de blastocistos (BL) e de Eclosão (ECL) não houve diferença significativa entre os cultivos com CR2aa, KSOMaa, SOFaa, CG e CO (BL = 46,6%; 34,7%; 31,3%; 26,1%; 24,7% e ECL = 69,8%; 85,8%; 86,8%, 76,9%; 80,7%, respectivamente). Concluiu-se que os meios semi-definidos e as co-culturas com células primárias sob as mesmas condições de cultivo apresentaram índices semelhantes de desenvolvimento embrionário.

CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS EM MEIOS SEMI-DEFINIDOS OU EM CO-CULTIVOS COM CÉLULAS DE LINHAGENS CONTÍNUAS

Tavares, L.M.T.; Feitosa, W.B.; Caetano, H.V.A.; Assumpção, M.E.O.A.; Visintin, J.A.

Departamento de Reprodução Animal – FMVZ-USP, São Paulo-SP, Brasil - visintin@usp.br

Na produção *in vitro* de embriões, o sistema de cultivo pode influenciar o desenvolvimento, o metabolismo embrionário e os índices de clivagem, blastocisto e prenhez. O objetivo deste trabalho foi avaliar o desenvolvimento de embriões bovinos fecundados *in vitro* e cultivados nos meios semi-definidos CR2, KSOM e SOF suplementados com aminoácidos (aa) e 5% SFB ou co-cultivados no meio TCM199 com células de linhagem contínua BRL ou VERO suplementados com 5% SFB. Oócitos aspirados de ovários provenientes de matadouro foram maturados por 24 horas no TCM199 + 10% SFB + HCG + FSH + 17 β estradiol. O sêmen foi separado em gradiente Percoll (45/90%) e diluído na concentração de 1x10⁶ spz/ml. Para a FIV (D0), oócitos, foram fecundados no meio FIV (sp-TALP + PHE + heparina) em estufa a 38,7°C, atmosfera úmida e 5% CO₂ em ar, durante 18 horas. Os presumíveis zigotos foram cultivados em 500 μ l dos meios quimicamente semi-definidos CR2aa (N= 427), KSOMaa (N= 422) e SOFaa (N= 421) ou co-cultivados com BRL (N= 360) e VERO (N= 364) em estufa a 38,7°C, atmosfera úmida e 5% de CO₂ em ar, durante 10 dias consecutivos. Os índices de clivagem foram avaliados no D3, de mórulas e blastocistos no dia 7 e de eclosão no dia 10. Para a análise estatística aplicou-se ANOVA, utilizando o SAS. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) para clivagem e mórula, respectivamente, entre CR2aa (83,4% e 3,2%), KSOMaa (73% e 0%), SOFaa (83,4% e 4%), BRL (76,1% e 9,5%) e VERO (71,4% e 3,1%). Foi observada diferença ($p < 0,05$) nos índices de blastocisto entre CR2aa (46,2%^{ab}), KSOMaa (55,8%^b), SOFaa (65%^{ab}), BRL (33,6%^a) e VERO (40%^{ab}). Quanto aos índices de eclosão, não houve diferença significativa entre CR2aa, KSOMaa, SOFaa, BRL e VERO (82,9%; 84,3%; 79,4%; 69,6% e 67,3%, respectivamente). Conclui-se que o cultivo embrionário no meio KSOMaa foi melhor que no co-cultivo com células BRL, não havendo diferença entre estes e os outros sistemas de cultivo.

EFFEITO DO ETILENOGLICOL E DO GLICEROL SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*

Nicacio, A.C.; Yamada, C.; Simões, R.; Mendes, C.M.; Caetano, H.V.A.;
Assumpção, M.E.O.A.; Visintin, J.A.

Departamento de Reprodução Animal – FMVZ-USP, São Paulo-SP, Brasil - anicacio@usp.br

O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade *in vitro* de embriões bovinos produzidos *in vitro* e expostos à diferentes soluções crioprotetoras. Ovários de matadouro foram aspirados e os oócitos maturados, fecundados e cultivados *in vitro*. O cultivo *in vitro* foi feito em meio SOF acrescido de aminoácidos e em monocamada de células da granulosa. Ao atingirem o estágio de blastocisto expandido entre o sétimo e o nono dias de cultivo (DO=FIV), os embriões foram expostos a dois tratamentos: Grupo EG (10% Etileno Glicol por 10 minutos) ou Grupo EG/Gly (10% EG por 10 minutos seguidos de exposição à solução de 20% EG e 20% Glicerol por 30 segundos. Após a exposição, os embriões foram rehidratados em solução de Sacarose (PBS + 0,2% BSA + 0,3M Sacarose) e em solução de PBS (PBS + 0,2% BSA) por 3 minutos cada e cultivados para avaliar o desenvolvimento até a eclosão. Como controle, embriões sem exposição aos crioprotetores foram cultivados até a eclosão. Os índices de eclosão foram de 62,12% (41/66) para o grupo controle; 67,02% (63/94) para o grupo EG e 68,82% (64/93) para o grupo EG/Gly. Os resultados foram analisados pelo Teste de Qui-Quadrado. Não foram observadas diferenças entre os grupos controle e EG assim como entre os grupos EG e EG/Gly ($p > 0,5$). Mas foram observadas diferenças entre os grupos controle e EG/Gly ($p < 0,5$). Concluiu-se que os crioprotetores não foram prejudiciais ao desenvolvimento embrionário *in vitro* até a eclosão, mas são necessários outros estudos para avaliar os efeitos conjuntos dos crioprotetores e da criopreservação.

Suporte financeiro FAPESP 04/05335-1

BLOQUEIO DA RESPIRAÇÃO EM EMBRIÕES BOVINOS *IN VITRO*

Mesquita, L.G.¹; Cortezzi, S.S.¹; Ripamonte, P.¹; Chiaratti, M.R.¹; Emanuelli, I.P.¹; De Bem, T.H.C.¹; Miranda, M.¹; Porciuncula, P.M.¹; Merighe, G.K.F.¹; Leal, C.L.V.¹; Meirelles, F.V.¹

¹Departamento de Ciências Básicas, Universidade de São Paulo, Pirassununga, São Paulo, Brasil, 13635-900. ligiagmesquita@yahoo.com.br

A mitocôndria é uma fonte de vida (energia) sob condições aeróbicas, no entanto, contém fatores sinalizadores da morte celular programada. Dentro do processo de respiração celular, existem agentes que bloqueiam a transferência de elétrons ao longo dos complexos respiratórios. O cianeto de potássio age no 4º complexo respiratório ou citocromo oxidase bloqueando a transferência de elétrons da redução de citocromo c para oxigênio, inibindo o deslocamento de prótons para membrana interna e produção de ATP. O potencial de membrana mitocondrial (Ψ_{mm}) é um indicador de viabilidade celular, consequência do bombeamento de íons para a membrana interna durante o processo de fosforilação oxidativa (OXPHOS). Embriões bovinos inicialmente são independentes de OXPHOS passando a aumentar a demanda de energia durante os processos de clivagem e utilizá-la como fonte primária de produção de energia para o desenvolvimento. Estudos realizados em embriões bovinos submetidos a estresse oxidativo e inibição parcial de transportadores mostraram que a produção de ATP via OXPHOS não é essencial para desenvolvimento embrionário. O presente trabalho objetivou estudar a relação do Ψ_{mm} com o desenvolvimento de embriões bovinos submetidos ao tratamento com o bloqueador da cadeia respiratória, cianeto de potássio. Oócitos foram coletados de ovários de vacas abatidas e submetidos a maturação em meio TCM 199 suplementado com sais de Earles com 10% SFB, piruvato, FSH, LH e 17 β estradiol por 22h. Após a maturação, os oócitos foram fertilizados em meio TALP suplementado com heparina, piruvato, BSA e solução de PHE por 18 horas e cultivados em meio SOF suplementado com 10% SFB à 20% de O₂. Decorridas 48 horas pós inseminação (hpi), foi realizado o feeding dos embriões com cianeto de potássio nas concentrações de 500 η M, 1 μ M e na ausência de KCN (grupo controle). Após 80hpi, os embriões com 8 células de cada tratamento foram submetidos a coloração de JC-1 (1mg/ml) durante 50 minutos, afim de avaliar o Ψ_{mm} utilizando microscópio de fluorescência. Embriões com 168 hpi foram avaliados quanto a taxa de blastocistos nos diferentes tratamentos. Observou-se que apesar de haver diferença de Ψ_{mm} (embriões que apresentaram-se positivos para coloração de JC-1) entre os grupos de 1 μ M de KCN e controle em relação ao grupo de 500 η M de KCN (64, 70 e 80%, respectivamente), não houve diferença significativa no desenvolvimento de blastocistos entre os grupos respectivos (15, 17 e 12%; $p < 0,05$), pelo teste de Chi-quadrado segundo procedimento GENMOD do programa *Statistical Analysis System*. Estes resultados sugerem que o desenvolvimento embrionário pode ser independente de respiração ou que parte dos embriões pode ser resistente à dose de cianeto de potássio, por exemplo, embriões com Ψ_{mm} às 48 hpi.

Apoio Financeiro: FAPESP-Brasil.

AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO MACHO : FÊMEA NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

Stranieri, P.¹; Accorsi, M.F.¹; Bishop, W.¹; Santos, R.G.¹; Watanabe, M.R.¹; Meirelles, F.D.P.²; Meirelles, F.V.²; Watanabe, Y.F.^{1,2}

¹Vitrogen® Pesquisa e Desenvolvimento em Biotecnologia da Reprodução, Cravinhos–SP, Brasil.

²Depto de Ciências Básicas da FZEA-USP, Pirassununga-SP, Brasil. - patriciacg@vitrogenbr.com

A demanda por animais de alto mérito genético tem sido intensa na pecuária bovina, principalmente após o advento de técnicas aplicadas à reprodução animal, como a transferência de embriões, aspiração folicular e fecundação *in vitro*. A difusão da fecundação *in vitro*, especialmente em zebuínos favoreceu o mercado de doadoras de alto mérito genético e, conseqüentemente de receptoras gestantes de embriões do sexo feminino. O objetivo deste trabalho foi verificar se existe variação na relação macho e fêmea a partir de embriões produzidos *in vitro* na sexagem aos 60 dias de gestação, e se o fator reprodutor é responsável por parte desta variação. Os embriões foram produzidos *in vitro* de acordo com o protocolo descrito por Watanabe *et al* (Theriogenology, v.51 p.438, 1999). Os oócitos foram obtidos por aspiração folicular transvaginal de várias doadoras, os quais foram maturados, fecundados e cultivados *in vitro*. Após 7 dias de cultivo, os embriões foram transferidos para receptoras previamente sincronizadas. A detecção da prenhez foi realizada mediante ultra-sonografia entre 30 e 35 dias após a transferência, considerando a visualização do conceito e constatação de viabilidade através dos batimentos cardíacos. As receptoras diagnosticadas como prenhes foram mantidas em piquete de gestação, até serem submetidas ao segundo exame ultra-sonográfico para confirmação de prenhez e determinação do sexo dos fetos entre os dias 70 e 80. A presença do tubérculo genital próximo ao cordão umbilical do feto levou ao diagnóstico de gestação de macho. Os dados foram analisados por ANOVA e as médias comparadas pelo teste de TUKEY-KRAMER HSD. Foram avaliados 60 touros num período de 13 meses, que produziram 3252 prenhez aos 30 dias (39%), sendo que destes 3011 resultaram em prenhez confirmadas aos 60 dias (36%) onde 1286 eram fêmeas (42,7%). Apesar de não haver diferença estatística ($P>0,2$) na frequência de conceitos fêmea entre touros, a porcentagem de gestações diagnosticadas fêmeas descendentes dos touros avaliados variou de $12,5 \pm 11,7\%$ até $84,0 \pm 14,8\%$ para os diferentes touros analisados. Quando analisado a média de fêmeas obtida no presente trabalho (42,7%) com a média esperada de fêmeas (50%), esta apresentou uma diferença altamente significativa ($P=0,00000004$) para o diagnóstico realizado aos 60 dias de gestação. As causas deste desvio ainda não estão esclarecidas, e evidenciam a necessidade de trabalhos nesta área com intuito de desenvolver métodos que não altere tal relação para aplicações comerciais.

PRODUÇÃO DE BLASTOCISTOS BOVINOS EM SISTEMA DE CULTIVO QUIMICAMENTE DEFINIDO OU ORGÂNICO¹

Soria, G.F.^{2,3}; Perecin, F.²; Landim Jr., L.P.²; Resende, M.V.²; Méo, S.²; Basso, A.²; Paz, C.C.P.⁴; Vantini, R.²; Garcia, J.M.²; Esper, C.R.²

²Departamento de Reprodução Animal, FCAV/UNESP, Jaboticabal - SP, 14870-060, Brasil.

³Bolsista CNPq – Mestrando em Reprodução Animal, FCAV/UNESP. ⁴Agência Paulista de Tecnologias dos Agronegócios, Ribeirão Preto - SP, Brasil. gabrielferreirasoria@yahoo.com.br

Objetivou-se avaliar os efeitos dos sistemas de cultivo *in vitro* suplementados ou não com diferentes fontes protéicas sobre o desenvolvimento de embriões bovinos. O sistema quimicamente definido foi constituído por meio SOFaaci adicionado de 0,3% polivinilalcool e 10mM de Hepes (SPH; n=1959) e os grupos orgânicos foram três: 0,5% BSA (SB; n=1472), 5% SFB (SF; n=1384) e 2,5% SFB + 0,5% BSA (SF+SB; n=1263). Folículos de 2 a 8 mm de diâmetro foram aspirados de ovários provenientes de matadouro e os oócitos maturados e fecundados em ar, por 24 e 18 horas, respectivamente. Os possíveis zigotos foram desnudados e distribuídos ao acaso nos tratamentos e cultivados a 38,5°C, umidade saturada e atmosfera de 5% O₂, 5% CO₂ e 90% N₂. O grupo controle (CT; n=943), idêntico ao SF+SB, foi mantido em ar e nas mesmas condições de temperatura e umidade. No terceiro e sétimo dia de cultivo embrionário foram verificadas em 18 repetições, respectivamente, as taxas de clivagem e de blastocistos em função do número de zigotos. As médias das taxas (média ± erro padrão) foram avaliadas por análise de variância e a diferença (P<0,05) entre médias comparadas pelo teste de Tukey. Em relação à taxa de clivagem, os sistemas de cultivos SPH (68,5±2,8%), SB (73,8±2,5%), SF (68,8±1,8%), SF+SB (72,8±2,7%) e CT (70,2±1,8%) não apresentaram diferenças. Porém, a taxa de blastocistos no grupo SPH (6,2±2,0%) apresentou diferença (P=0,0062) em relação ao CT (17,6±2,0%), mas não entre SB (10,8±1,9%), SF (12,2±2,4%) e SF+SB (10,7±3,1%), enquanto os tratamentos SB, SF e SF+SB e CT não apresentaram diferenças. É possível cultivar blastocistos bovinos, em vista dos resultados, sob baixa tensão de oxigênio na presença ou ausência de fontes protéicas.

¹Projeto FAPESP 2003/07596-4.

QUALIDADE DE BLASTOCISTOS BOVINOS PRODUZIDOS NA PRESENÇA OU NÃO DE FONTES PROTÉICAS¹

Soria, G.F.^{2,3}; Landim Jr., L.P.²; Resende, M.V.²; Perecin, F.²; Ferreira, C.R.²; Basso, A.²; Paz, C.C.P.⁴; Vantini, R.²; Garcia, J.M.²; Esper, C.R.²

²Departamento de Reprodução Animal, FCAV/UNESP, Jaboticabal - SP, 14870-060, Brasil.

³Bolsista CNPq – Mestrando em Reprodução Animal. ⁴Agência Paulista de Tecnologias dos Agronegócios, Ribeirão Preto - SP, Brasil. gabrielferreirasoria@yahoo.com.br

O sistema de cultivo influencia a qualidade embrionária (Rizos, Biology of Reproduction, 68, 236-243), nesse sentido estudou-se a qualidade de blastocistos bovinos que cresceram em meio SOF contendo citrato, mioinositol, aminoácidos essenciais e não-essenciais (SOFaaci) e fontes protéicas ou macromoléculas sintéticas. Para avaliar a qualidade foi utilizada a taxa de eclosão como técnica não-invasiva (blastocistos eclodidos/blastocistos) (Van Soom, Reproduction of Domestic Animal, 36, 29-35). Os oócitos, obtidos de ovários colhidos em matadouro, foram maturados por 24 horas em TCM 199-Bicarbonato + 10% SFB, hormônios, piruvato e antibiótico. A fecundação ocorreu por 18 horas em meio TALP + 0,6% BSA, heparina, PHE, piruvato e antibiótico. Os zigotos foram desnudados e distribuídos nos sistemas de cultivos dos grupos: controle (CT; n=178) contendo 2,5% SFB + 0,5% BSA e atmosfera de 20% O₂; orgânicos constituídos por 0,5% BSA (SB; n=110), 5% SFB (SF; n=109) e 2,5% SFB + 0,5% BSA (SF+SB; n=106) e quimicamente definido formado por 0,3% polivinilalcool e 10mM de Hepes (SPH; n=72) foram mantidos a 5% O₂. Em 13 repetições foram verificadas as taxas de eclosões no dia nove para os grupos CT e orgânicos e no dia dez para o definido. As médias das taxas (média ± erro padrão) foram avaliadas por análise de variância e a diferença (P<0,05) entre médias comparadas pelo teste de Tukey (SAS). A taxa de embriões eclodidos em meio sintético (4,7±3,5%) foi menor em relação ao CT (49,6±7,3%) (P=0,0016) e ao SF (37,1±9,5%) (P=0,0421). Os grupos SB (29,8±9,8%) e SF+SB (22,2±8,0%) não diferiram e tampouco entre CT e SPH. Sistemas de cultivos *in vitro* suplementados com fontes protéicas otimizam a qualidade de blastocistos, independente da tensão de oxigênio. Blastocistos que foram cultivados em sistema quimicamente definido apresentam baixa viabilidade embrionária.

¹Projeto FAPESP 2003/07596-4.

DESENVOLVIMENTO DE BLASTOCISTOS BOVINOS EM MEIOS DE CULTIVOS QUIMICAMENTE DEFINIDOS¹

Soria, G.F.^{2,3}; Basso, A.²; Landim Jr., L.P.²; Resende, M.V.²; Saraiva, N.Z.²; Perecin, F.²; Paz, C.C.P.⁴; Vantini, R.²; Garcia, J.M.²; Esper, C.R.²

²Departamento de Reprodução Animal, FCAV/UNESP, Jaboticabal - SP, 14870-060, Brasil. ³ Bolsista CNPq – Mestrando em Reprodução Animal. ⁴Agência Paulista de Tecnologias dos Agronegócios, Ribeirão Preto - SP, Brasil. gabrielferreirasoria@yahoo.com.br

A produção de embriões bovinos em condições de cultivo quimicamente definidas diminui os riscos de veiculação de patógenos e são úteis para estudar os requerimentos nutricionais necessários para o desenvolvimento *in vitro* (Lonergan, *Reproduction of Domestic Animal*, 38, 259-267). Os meios de cultivos definidos que foram estudados utilizaram o SOFaaci o qual foi adicionado de 0,3% polivinilalcool + 10mM Hepes + insulina-transferrina-selênio (10 μ g/mL) (PHFC) ou 2,5% suplemento sintético livre de soro (“Knockout Serum Replacement”) (KOUT). Após MIV e FIV (Dia Zero), os zigotos desnudados foram distribuídos nos grupos tratamentos PHFC (n=860) e KOUT (n=793) e cultivados em atmosfera com mistura gasosa (5% O₂, 5% CO₂ e 90% N₂). O grupo controle (CONT; n=1037) foi mantido em ar e estava constituído por SOFaaci contendo 2,5% SFB e 0,5% BSA. No Dia 3 fez-se o “feeding” e avaliou-se a taxa de clivagem e no Dia 8 a produção de blastocistos e contagem de blastômeros. As médias das taxas e número de células (média \pm erro padrão) foram avaliadas por análise de variância e a diferença (P<0,05) entre médias comparadas pelo teste de Tukey. PHFC apresentou menor taxa de clivagem (71,2 \pm 2,2%) e não diferiu ao CONT (75,0 \pm 3,0%), mas diferiu (P=0,0318) ao KOUT (80,1 \pm 1,5%). A taxa de blastocistos nos grupos CONT (14,1 \pm 2,3%) e KOUT (10,5 \pm 1,4%) não diferiram. Entretanto, a produção de embriões em meio PHFC (2,4 \pm 1,0%) diferiu em relação ao CONT (P=0,0001) e KOUT (P=0,0055). Não foram observadas diferenças na contagem do número de células entre CONT (118,9 \pm 6,4) e KOUT (123,0 \pm 5,0) e bem como entre CONT e PHFC (98,5 \pm 6,4), porém KOUT diferiu ao PHFC. O suplemento sintético livre de soro mostrou ser uma alternativa para a produção *in vitro* de blastocistos bovinos em cultivo quimicamente definido.

¹Projeto FAPESP 2003/07596-4.

EFEITO DO ESTRADIOL E DA PROGESTERONA NO DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*

Reis, A.N.¹; Miranda, M.S.²; Silva, A.O.A.¹; Sousa, A.J.O.¹; Silva, L.K.X.¹;
Sousa, J.S.¹; Ohashi, O.M.²

¹Central de Biotecnologia de Reprodução Animal – UFFa, Castanhal-Pa, ²Laboratório Fertilização In Vitro – UFFa, Belém-Pa. areis@ufpa.br

Este trabalho teve como objetivo avaliar o desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro* até o estágio de blastocisto, co-cultivados com células epiteliais do oviduto bovino (CEOBs) expostas ou não ao estradiol e a progesterona (P_4). Os ovários foram obtidos de abatedouros e transportados até o laboratório. Ovócitos foram selecionados para a MIV, que foi feita em meio TCM-199 com Bicarbonato acrescido de hormônios, soro e antibióticos, em estufa de CO_2 a 5%, 38,5°C e alta umidade, onde permaneceram por 24 horas, para posterior FIV. As CEOBs foram cultivadas em meio TCM-199 com Bicarbonato acrescido ou não de estradiol (1 $\mu\text{g/ml}$) por 24 horas, nas mesmas condições para MIV. O sêmen descongelado foi centrifugado em gradientes de Percoll (45 e 90%) durante 30 minutos a 200 G, e posteriormente lavados em meio TALP-Sêmen por 10 minutos também a 200 G. A concentração espermática final foi de 10^6 spzts/ml no meio de FIV (TALP-Stock acrescido de PHE, Heparina e BSA). As CEOBs foram lavadas após 24 horas e adicionadas nos diferentes grupos em meio CR_2 , acrescido ou não de P_4 , de acordo com o grupo experimental: Grupo 1 ($CR_2 + P_4$ -100 $\mu\text{g/ml}$ e CEOBs + Estradiol; n=324); Grupo 2 (semelhante ao G1, sem P_4 ; n= 315); Grupo 3 ($CR_2 + P_4$ -100 $\mu\text{g/ml}$, e CEOBs sem exposição ao estradiol; n= 325) e Grupo 4 ($CR_2 + CEOBs$; n= 322). Como método estatístico foi utilizado a análise de variância ($P < 0,05$) e o teste de Tukey. As taxas de clivagem (3º dia) e de blastocistos (7º dia) foram inferiores ($P < 0,05$) no grupo G3 (34,54% e 16,36%, respectivamente) que continha somente P_4 sem exposição das CEOBs ao estradiol, em relação aos grupos G1 (53,49% e 29,26%), G2 (56,27% e 31,22%) e G4 (51,68% e 28,72%), provavelmente por um efeito inibidor da P_4 quando utilizada sozinha no meio. Concluí-se que a associação das CEOBs com o estradiol não aumentou significativamente as taxas de clivagem e de blastocisto, no entanto, quando estas células foram associadas a P_4 , diminuíram significativamente estas taxas.

USO DE MEIO DE CULTIVO SEQUENCIAL E COMERCIAL PARA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS: RESULTADOS PRELIMINARES

Zerbini, F.L.S¹, Fernandes, M.B.¹, Elias, F.P.¹, Vila, R.A.¹;Galerani, M.A.V.¹, Lôbo, R.B.¹

¹ Departamento de Genética-FMRP/USP- Ribeirão Preto-SP., Av. Bandeirantes, 3900, 14040-030, Brasil. chico_zerbini@yahoo.com.br

Embriões bovinos cultivados *in vitro* possuem requerimentos metabólicos que se diferenciam ao longo do desenvolvimento. Assim, são formulados meios adequados a cada estágio de desenvolvimento, ao invés de meio único (tradicional). As exigências nutricionais e o metabolismo do zigoto diferem do blastocisto (estágio ideal para transferência) (Gardner, Theriogenology, v. 49, p. 83–102). Dessa forma, dois ou mais meios de cultivo são comumente utilizados para toda a fase de crescimento *in vitro*, o que aumenta significativamente a viabilidade dos embriões quando comparados ao desenvolvimento em meio único. No presente trabalho foram usados dois meios sequenciais comerciais para o cultivo *in vitro* de embriões. Para tanto, 472 oócitos foram aspirados de ovários de 24 vacas por Punção Folicular guiada por Ultrassom (PFU). Depois de 24 horas de maturação, os oócitos foram fertilizados e após 15 horas da fecundação foram transferidos para placa de cultivo contendo meio Bovine Vitro Cleave (Cook Produtos Veterinários) + 10% de SFB, em co-cultivo com células do *cumulus*, mantidos em incubadora a 38,5°C, 5% CO₂ e máxima umidade. No quarto dia de cultivo, foi realizada a troca do meio Bovine Vitro Cleave pelo meio Bovine Vitro Blast (Cook Produtos Veterinários) +10% SFB. 163 horas após a fecundação, 180 Blastocistos (38,1%) foram selecionados para TE e resultaram em 81 prenhez a 60 dias (45%). Os índices demonstram que a utilização de meio de cultivo comercial e sequencial é viável para a produção *in vitro* de embriões e os resultados são compatíveis com os protocolos convencionais. Além disso, meios de cultivo comerciais diminuem a possível variação entre meios de cultivo produzidos em laboratórios convencionais.

Agradecimentos: PRONEX; FAEPA; CNPq; ANCP e HANDLECOOK Ribeirão Preto.

CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS NA PRESENÇA DE GH, IGF-1 E INSULINA.

Ponchirolli, C.B.; Freitas, C.P.; Landim-Alvarenga, F.C.

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária- FMVZ/UNESP, Botucatu-SP, 18618-000, Brasil. carlaponchi@yahoo.com.br

Para melhorar o desenvolvimento embrionário *in vitro*, vários fatores de crescimento têm sido adicionados aos meios de cultivo. O objetivo desse trabalho foi verificar a influência da adição de GH (hormônio de crescimento), IGF-1 (*insulin like growth factor*) e insulina ao meio de cultivo *in vitro* de embriões bovinos (CIV), em relação à taxa de produção de blastocistos. Ovários provenientes de abatedouro tiveram seus folículos com 2 a 8 mm de diâmetro puncionados para a obtenção de ovócitos. Foram realizadas 5 repetições do experimento. Os ovócitos foram selecionados e maturados em estufa a 38° C, com 5% de CO₂ em ar e 100% de umidade por 22-24h em meio de maturação *in vitro* TCM 199 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 2,2 mg/ml piruvato de sódio, 1 mg/ml estradiol 17β, 50 μg/ml LH, 5 μg/ml FSH e 75 μg/ml gentamicina. Após a MIV, os ovócitos foram fertilizados em meio Fert Talp por 12h, sob as mesmas condições da maturação e decorrido o tempo de fertilização, foram divididos em 5 grupos e cultivados em gotas de 90 μl, na presença de células da granulosa (co-cultivo). Grupo controle: meio HTF (*Human Tubal Fluid*, HTF®, Irvine) e BME (*Basal Medium Eagle*, BME®, Sigma), na relação 1:1, acrescido de 10% SFB, 0,01% myo-inositol e 75 μg/ml gentamicina (meio controle); Grupo GH: meio controle + 100 ng/ml GH; Grupo IGF-1: meio controle + 10 ng/ml IGF-1; Grupo insulina: meio controle + 1 μg/ml insulina; Grupo GH+IGF-1+Insulina: meio controle + 100 ng/ml GH, 10 ng/ml IGF-1 + 1 μg/ml insulina. Para análise estatística foi utilizada a análise de dados ANOVA. Controle: 111 blastocistos/ 323 ovócitos - 34%^{ab}; GH: 114/328- 35%^{ab}, IGF-1: 123/342- 36%^a; insulina: 113/329- 34%^{ab}; GH+IGF-1+insulina: 97/314- 30%^b. A produção de blastocistos foi significativamente superior quando se adicionou IGF-1, comparando com a produção do grupo que recebeu todos os fatores, indicando que a adição de um grande número de fatores estimulatórios não foi benéfica. Quanto aos grupos controle, GH e Insulina, não houve diferenças entre eles e nem em relação ao grupo IGF-1. Para melhor avaliação da influência desses fatores, testes de qualidade embrionária devem ser realizados.

Apoio: FAPESP e CAPES.

EFEITO DO TRANSPORTE NO DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES BOVINOS REAQUECIDOS APÓS VITRIFICAÇÃO

Polisseni, J.¹; Ramos, A.A.^{1,2}; Sá, W.F.¹; Ferreira, A.M.¹; Camargo, L.S.A.¹; Folhadella, D.S.³; Serapião, R.V.¹; Viana, J.H.M.¹; Nogueira, L.A.G.³

¹Embrapa Gado de Leite - Juiz de Fora – MG, Brasil. ²Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – MG, Brasil. ³Universidade Federal Fluminense – RJ, Brasil. jupol@powermail.com.br

Um dos fatores limitantes para a difusão da técnica de vitrificação é a ausência de uma adequada estrutura laboratorial nas fazendas, para realização do reaquecimento. Uma possibilidade de superar essa limitação seria reaquecer os embriões antes de transportá-los. Sendo assim, objetivou-se avaliar a viabilidade de embriões bovinos produzidos *in vitro* submetidos a diferentes períodos de transporte, após reaquecimento. Simulou-se o transporte por períodos de 6 e 12 horas. Oócitos, obtidos de folículos de ovários coletados em matadouro, foram maturados em meio TCM-199 (Gibco Labs, Grand Island, NY) acrescido de soro de vaca em cio (SVC) e FSH, em estufa a com 5% CO₂ a 38,5°C, por 24 horas. Após 18 horas de fecundação com 2,0 x 10⁶ espermatozoides/ml, os prováveis zigotos foram co-cultivados com células da granulosa em CR2aa acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB), por sete dias, nas mesmas condições de maturação. Os blastocistos com grau de qualidade I e II (segundo o manual da IETS) foram selecionados e vitrificados pela passagem em solução de PBS com 5% de SFB (HM), acrescida de 10% de etilenoglicol (EG) e 10% de dimetil sulfóxido (DMSO), por um minuto e, posteriormente, em solução de HM acrescida de 20% de EG e 20% DMSO, por vinte segundos. Os embriões foram envasados em OPS (open pulled straws), e imersos em nitrogênio líquido. O reaquecimento foi realizado a 39°C, pela passagem em soluções de HM com concentrações decrescentes de sacarose (0,25M - 0,15M), por cinco minutos em cada uma. Os embriões reaquecidos foram distribuídos em três grupos: GI: cultivados *in vitro* após o reaquecimento (n=25); GII: mantidos em palhetas de 0,25 ml com meio TCM-199 tamponado com Hapes, por 6 horas a 35°C, antes de serem cultivados (n=29); e GIII: mantidos em palhetas por 12 horas a 35°C, antes do cultivo (n=29). Os embriões foram co-cultivados com células da granulosa em microgotas de TCM 199 acrescido de SFB. Foram avaliadas as taxas de re-expansão e eclosão após 48 horas de cultivo. Foram realizadas cinco repetições para cada grupo, e os resultados analisados pelo teste do qui-quadrado. As taxas de re-expansão entre os grupos I, II e III não diferiram (p>0,05) entre si (68, 44,8 e 65,5%, respectivamente), assim como as taxas de eclosão (32, 24 e 27,6%). Conclui-se que é possível transportar embriões produzidos *in vitro* e vitrificados, por período de até 12 horas. Entretanto, com relação ao período de transporte, mais estudos devem ser realizados visando melhorar o desenvolvimento embrionário após desvitrificação.

EXPOSIÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO* AO ETILENOGLICOL E TREALOSE

Mozzaquatro, F.D.^{1,3}; Franco, V.C.L.^{1,3}; Bunn, S.²; Santos, M.V.³; Silva, D.S.^{1,3};
Pilla, L.F.C.^{1,3}; Rubin, M.I.B.³; Silva, C.A.M.³

¹Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária/UFSM, Santa Maria/RS. ²Centro de Ciências Agroveterinárias – CAV/UDESC, Lages-SC, 88.520-000, Brasil. ³Embryolab – Departamento de Clínica de Grandes Animais - CCR/UFSM, Santa Maria-RS, 97105-900, Brasil. - fmozzaquatro@yahoo.com.br

O objetivo deste estudo foi determinar a toxicidade da solução crioprotetora EmCare® (ICPbio Limited – Auckland/ New Zealand) com etilenoglicol (EG) e trealose (TREA) na sobrevivência e desenvolvimento dos embriões bovinos produzidos *in vitro* (PIV) para estabelecer um protocolo de criopreservação pela técnica ultra-rápida. Complexos *cumulus*-oócitos foram aspirados de ovários bovinos obtidos em frigorífico, maturados *in vitro* em TCM-199 suplementado com 10% de soro de vaca em estro, por 24h, em estufa de cultivo com 5% de CO₂ à 39°C e umidade saturada. A fecundação *in vitro* foi realizada em meio FERT-TALP, por 18h, em estufa de cultivo na mesma temperatura e atmosfera gasosa utilizada na maturação. Os zigotos foram cultivados por 8 dias em meio SOFaaci suplementado com 5% de soro de vaca em estro, em estufa de cultivo a 39°C sendo mantidos em bolsas gaseificadas com 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂. Blastocistos e blastocistos expandidos (n=90) com 7 e 8 dias de desenvolvimento (D0 = Dia da fecundação) foram expostos à solução de manutenção EmCare® com 3,0M de etilenoglicol, 3,0M EG + 0,1M, 0,3M ou 0,5M de trealose, por 2 minutos a 35°C. Imediatamente após, os embriões foram cultivados em 100µL de meio SOFaaci, sob óleo mineral, por 48h, em estufa a 39°C, com 5% de CO₂ e umidade saturada. As taxas de viabilidade dos embriões na solução EmCare® com 3,0M EG (13/18; 72,2%); 3,0M EG + 0,1M TREA (10/18; 55,5%); 3,0M EG + 0,3M TREA (10/18; 55,5%) e 3,0M EG + 0,5M TREA (12/18; 66,6%) foram similares (P>0,05) aos embriões não expostos ao crioprotetor (14/18; 77,7%). A solução de EmCare® + etilenoglicol 3,0M e trealose 0,1; 0,3 e 0,5M permitiram a rehidratação, re-expansão e a eclosão dos blastocistos indicando baixa toxicidade aos embriões bovinos produzidos *in vitro*.

Palavras-chave: PIV, bovino, etilenoglicol, trealose

EFICIÊNCIA DA VITRIFICAÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS IMATUROS

Yamada, C.; Nicacio, A.C.; Mendes, C.M.; Gonçalves, J.S.A.; Braga, F.A.;
Assumpção, M.E.O.A; Visintin, J.A.

Departamento de Reprodução Animal – FMVZ-USP, São Paulo-SP, Brasil - claudiay@usp.br

O objetivo deste trabalho foi comparar a eficiência da vitrificação de oócitos bovinos em diferentes soluções. No experimento I, realizou-se apenas a exposição dos oócitos aos crioprotetores em duas etapas: a primeira por 10 min na solução EG10 (PBS + 10% de etilenoglicol (EG) + 10% de soro fetal bovino (SFB) + 0,25 M de trealose) e a segunda por 30s ou 60s nas soluções EG+D40 (PBS + 10% SFB + 20% EG + 20% DMSO + 0,5M de trealose) ou EG+D50 (PBS + 10% SFB + 25% EG + 25% DMSO + 0,5 M de trealose) ou EG+GLY (PBS + 10% SFB + 25% EG + 25% Glicerol + 0,5 M de trealose). No experimento II, os oócitos foram expostos às soluções de congelamento por 30s, conforme experimento I, envasados em palhetas OPS, mergulhados e armazenados em N₂ líquido. Em ambos os experimentos, a remoção dos crioprotetores foi realizada em etapas nas soluções: 1) PBS + 10% SFB + 10% EG + 1,0M de trealose; 2) PBS + 10% SFB + 0,5 M de trealose; 3) PBS + 10% SFB por 3 minutos em cada etapa. Os oócitos foram maturados por 24 h em microgotas do meio MIV, desnudados, fixados em paraformaldeído e triton, corados com Hoechst 33342 e avaliados em microscópio de epifluorescência, considerando maduros os oócitos em metáfase II. Em todas as manipulações, um grupo controle de oócitos foi maturado, fixado, corado e avaliado quanto à maturação nuclear. Os resultados foram analisados pelo teste Tukey, com nível de significância de 1%. No experimento I, os índices médios de maturação não apresentaram diferença entre os grupos Controle (81,3%); EG+D40 com 30s (74,2%) e 60s (71,9%); EG+D50 com 30s (73,1%) e EG+GLY com 30s (74,5%), mas os grupos EG+D50 e EG+GLY com 60s apresentaram índices inferiores (56,2% e 54,3%). No experimento II, os índices de maturação dos grupos vitrificados foram menores que os do controle (75,9%), mas o grupo EG+D50 (29,2%) foi superior aos grupos EG+D40 e EG+GLY (11,7% e 4,3%). Concluiu-se que, neste estudo, o protocolo mais eficiente para vitrificação de oócitos bovinos imaturos foi o EG+D50 com 30s de exposição, porém ainda pode ser aprimorado.

Suporte financeiro FAPESP 03/08543-1

EFEITO DO TEMPO DE MATURAÇÃO NA VITRIFICAÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS

Magnusson, V.; Yamada, C.; Tavares, L.M.T.; Nicacio, A.C.; Assumpção, M.E.O.A; Visintin, J.A.

Departamento de Reprodução Animal – FMVZ-USP, São Paulo-SP, Brasil - visintin@usp.br

Este trabalho teve como objetivo comparar a eficiência da vitrificação de oócitos bovinos após 0, 12 ou 18 h de maturação. Oócitos (508) de ovários bovinos de abatedouro foram distribuídos entre os grupos: Controle (216 oócitos maturados por 22 horas), G-0 (98 oócitos vitrificados sem maturação), G-12 (98 oócitos maturados por 12 horas e vitrificados) e G-18 (96 oócitos maturados por 18 horas e vitrificados). Para a vitrificação, os oócitos foram expostos por 15 minutos à solução de TCM199/Hepes + 20% de soro fetal bovino (SFB) + 3% Etilenoglicol (EG) + 5µgCitocalasina D/ml e por 25 segundos à solução de vitrificação de TCM199/Hepes + 20%SFB + 40%EG + 5µgCitocalasina D/ml. Os oócitos foram envasados em palhetas OPS (*open pulled straws*), mergulhados e armazenados em nitrogênio líquido. Os oócitos dos grupos G-0, G-12 e G-18 foram reaquecidos, lavados duas vezes por 5 minutos no meio TCM199/Hepes + 20%SFB e uma vez no meio MIV e colocados em microgotas do meio MIV recobertas por óleo mineral por 22, 10 ou 4 horas, respectivamente G0, G12 e G18, para completar 22 horas de maturação. Após a maturação, os oócitos foram fecundados (DO) e os presumíveis zigotos co-cultivados em microgotas de TCM199 com monocamada de células da granulosa, a 39°C, 5% de CO₂ em ar e alta umidade. Foram avaliados os índices de clivagem, blastocisto e blastocisto eclodido após 3, 9 e 12 dias de cultivo, respectivamente. Os resultados foram analisados pelo teste Qui-quadrado, com nível de significância de 5%. Os índices de clivagem, blastocisto e blastocisto eclodido foram, respectivamente, Controle (79,2; 51,4 e 41,4 %); G-0 (26,5; 15,3 e 0 %); G-12 (15,3; 7,1 e 0 %) e G-18 (7,3; 4,2 e 0 %). Os grupos vitrificados apresentaram índices de clivagem, blastocisto e blastocisto eclodido inferiores ao controle. Os índices de clivagem e de blastocisto do grupo G-0 foram superiores aos do G-18, mas o grupo G-12 foi igual aos G-0 e G-18. Em conclusão, os grupos vitrificados apresentaram desenvolvimento embrionário inferior ao controle, contudo os oócitos não maturados parecem ser mais resistentes à vitrificação.

VIABILIDADE DE OVÓCITOS BOVINOS VITRIFICADOS COM TREALOSE

Hastenreiter, G.P.¹; Dias, A.J.B.¹; Matos, L.F.¹; Carvalho, C.S.P.¹

¹Laboratório de Melhoramento Genético Animal/LMGA/ CCTA/ UENF,
Campos dos Goytacazes-RJ, 28013-600, Brasil. hannatomodati@yahoo.com.br

A trealose tem sido usada em vários protocolos de criopreservação de tecidos, órgãos, gametas e embriões, com resultados promissores, reduzindo os efeitos da criopreservação. Devido ao seu alto peso molecular e características bioquímicas, esse dissacarídeo é incapaz de atravessar a membrana plasmática dos ovócitos. O objetivo desse trabalho foi avaliar a capacidade crioprotetora da trealose intracelular, sobre a viabilidade de ovócitos bovinos vitrificados. Ovócitos obtidos de ovários oriundos de matadouros foram maturados *in vitro* por 22h. Posteriormente 105 ovócitos foram distribuídos aleatoriamente entre os seguintes tratamentos: avaliados logo após a MIV (T1); ovócitos apenas perfurados pela pipeta de microinjeção (T2); ovócitos microinjetados com solução de trealose 0.8M (Sigma, T0167), até uma concentração intracelular de 0,15 M (Eroglu, *et. al*, 2002) (T3); ovócitos microinjetados como em T3, seguido do envase em OPS e vitrificação (T4); vitrificados em solução de DMSO e etilenoglicol (EG), segundo Vajta *et al.* (1998) (T5). A microinjeção de trealose foi realizada com auxílio do microinjetor Transjector 5246 (Eppendorf), acoplado a um microscópio invertido Axiovert (Zeiss). O descongelamento foi realizado imergindo as palhetas em solução contendo sucrose. Após as manipulações os ovócitos foram mantidos por quatro horas em condições de cultivo *in vitro*, seguido das avaliações de viabilidade. A viabilidade celular foi estimada pelo grau de re-expansão dos ovócitos ao seu volume isotônico, rompimento celular e marcação com iodeto de propídio (IP). Ovócitos marcados pelo IP foram considerados lesados. Ovócitos dos tratamentos T2 e T3 apresentaram 100% de re-expansão e nenhum rompimento celular foi observado. Quando submetidos à marcação com IP, ovócitos de ambos tratamentos apresentaram taxas de viabilidade celular de 80% e 60% respectivamente. Ovócitos de T4, apresentaram uma taxa de 63% de re-expansão e 29% de rompimento celular, porém apenas 23% dos ovócitos encontraram-se íntegros, não apresentando marcação pelo IP. Resultado superior foi obtido com ovócitos de T5. Neste tratamento 89% dos ovócitos re-expandiram, 10,5% romperam e apenas 22% marcaram com IP. Nossos resultados corroboram as informações já descritas na literatura sobre o potencial crioprotetor da trealose, no entanto há necessidade de se avaliar o efeito de diferentes concentrações e procedimentos mais eficientes para sua utilização no congelamento de ovócitos bovinos.

EFEITO DA ADIÇÃO DE SACAROSE AO MEIO DE VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES ZEBUÍNS PRODUZIDOS “IN VITRO”

Varago, F.C.¹; Lagares, M.A.¹; Alvim, M.T.T.²; Saliba, W.P.²; Vasconcelos, A.B.¹; Elias, N.Q.²,
Stahlberg, R.³; Oliveira, C.H.¹

¹ Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária - UFMG/Belo Horizonte - MG, ²Cenatte Embriões - Pedro Leopoldo - MG, ³ Faculdade de veterinária - PUC/Betim-MG, Brasil .
fafavarago@terra.com.br

A produção nacional “in vitro” de embriões bovinos apresenta posição de destaque no cenário mundial. Estes índices são devidos principalmente, à produção de embriões de raças zebuínas. No entanto, a criopreservação deste material genético não apresentou viabilidade satisfatória. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de adição da sacarose ao meio de vitrificação de embriões zebuínos produzidos “in vitro”. Oócitos foram obtidos por meio de punção ovariana de vacas zebuínas guiada por ultra-som e maturados por 24 horas em incubadora (5% de CO₂, em ar e umidade saturada). Para a fecundação (D0) dos oócitos foi utilizado sêmen de reprodutor da raça Nelore. No 7º dia de cultivo (5% de CO₂, 5% de O₂, 90% de N₂ e umidade saturada), 64 blastocistos de excelente qualidade foram selecionados, mensurados e vitrificados. A taxa de produção de blastocistos foi de 33%. Os embriões foram divididos em 2 tratamentos de vitrificação: T1) 25% de etilenoglicol + 25% de dimetilsulfóxido + 50% de meio de manutenção (n=30) e T2) 20% de etilenoglicol + 20% de dimetilsulfóxido + 10% de solução de sacarose + 50% de meio de manutenção (n=34), sendo que os crioprotetores foram adicionados em 4 etapas. Após 40 segundos de exposição às soluções de vitrificação, os embriões foram envasados em “Open Pulled Straw” (“OPS”), que foram imersas em nitrogênio líquido. Os embriões foram descongelados ao ar por 3 segundos, reidratados em soluções decrescentes de sacarose e cultivados por 48 horas. Após 24 horas de cultivo os embriões foram novamente mensurados e foi avaliada a taxa de re-expansão (30% e 44,1%), e após 48 horas, foi avaliada a taxa de eclosão (13,3% e 26,7%), nos tratamentos 1 e 2 respectivamente. A adição de sacarose ao meio de vitrificação não aumentou significativamente as taxas de re-expansão e eclosão embrionária pós-vitrificação comparada ao tratamento 1 (p) 0,05). No entanto, devido à escassa literatura sobre criopreservação de embriões zebuínos produzidos “in vitro”, os resultados são encorajadores, sendo necessários mais estudos para se aumentar a viabilidade de embriões zebuínos produzidos “in vitro”.

PRENHEZES DE EMBRIÕES BUBALINOS FRESCOS E VITRIFICADOS PRODUZIDOS *IN VITRO*

Sá Filho M.F.¹; Carvalho, N.A.T.¹; Gimenes, L.U.¹; Torres-Júnior, J.R.S.¹; Ferreira, C.R.²;
Perecin, F.²; Perini, A.P.²; Tetzner, T.A.D.²; Vantini, R.²; Soria, G.F.²; Garcia, J.M.²;
Tonhati, H.²; Gasparrini B.³; Baruselli, P.S.¹

¹Departamento de Reprodução. Animal, FMVZ-USP, São Paulo-SP, ²UNESP, Jaboticabal-SP, ³
Universtà degli Studi Federico II, Napoli, Itália. manoelsa@usp e barusell@usp.br

Na espécie bubalina programas de aspiração folicular guiada por ultra-sonografia (OPU) aliada a produção *in vitro* de embriões (PIV) vem apresentando dificuldades como os baixos número e qualidade dos oócitos recuperados por sessão e a baixa taxa de fertilização *in vitro*. Com o objetivo de melhorar a eficiência da OPU na espécie, foram utilizadas 10 fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*) selecionadas de acordo com a ciclicidade, o diâmetro ovariano (≥ 2 cm) e a população folicular (≥ 8 folículos/ovário). As fêmeas foram submetidas à 5 sessões de OPU (duas vezes/semana), utilizando ultra-som 100 Falco Vet (Pie Medical) munido de sonda micro-convexa e agulha 19G, à pressão negativa de 60-65 mmHg. Um total de 257 oócitos foram obtidos da aspiração de 419 folículos (61,3% taxa de recuperação). Os oócitos viáveis (n=247) foram maturados (TCM199 + 10% de soro fetal bovino (SFB) + hormônios + 0,3mM cistina + 50 μ M cisteamina), fertilizados (Talp-Fert) e cultivados (SOF-modificado + 5% SFB) *in vitro*. Obteve-se taxa de clivagem de 45,3% (112/247) e de produção embrionária de 23,1% (57/247). Os embriões obtidos nas primeiras quatro sessões foram vitrificados, enquanto os da última (n=7) foram destinados a transferência a fresco. Os embriões foram inovulados em tempo fixo (TETF) em fêmeas previamente sincronizadas (GnRH-7dias-PGF2 α -2dias-GnRH-7dias-TETF+GnRH). Obteve-se taxa de aproveitamento (aptas a TETF/sincronizadas) de 80% (32/40) e taxa de prenhez de 14,3% (1/7) para embriões frescos e de 8,0% (2/25) para vitrificados. A obtenção das primeiras prenhez de embriões bubalinos produzidos *in vitro* fresco e vitrificados nas Americas demonstra que é possível estabelecer um protocolo de OPU-PIV viável para a espécie. Próximos estudos deverão ser realizados para avaliar o intervalo ideal para a OPU e o desenvolvimento de estratégias para melhorar as taxas de FIV na espécie bubalina.

Agradecimentos: Fapesp(04/06096-0) e Nutricell[©]

EFEITO DO ETILINOGLICOL SOBRE O TEMPO DE DESCONGELAMENTO ATÉ A INOVULAÇÃO EM RECEPTORAS DE EMBRIÃO SINCRONIZADAS EM TEMPO FIXO

Peres, L.C.^{1,3}; Pincinato, D.^{1,3}; Borges, L.F.K.²; Maraña Peña, D.^{1,3};
Tribulo, R.³; Cutaia L.³; Bó G.A.^{1,3}

¹Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, ²Universidade Federal de Santa Maria, Brasil,
³Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC), Jerónimo Luis de Cabrera 106, X5000GVD,
Córdoba, Argentina. gabrielbo@iracbiogen.com.ar

O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do tempo (segundos) desde o descongelamento do embrião em etilenoglicol a 1,5 M até a transferência de embrião em receptoras sincronizadas em tempo fixo (TEFT) sobre a taxa de prenhez. As vacas utilizadas foram cruzas zebu secas cíclicas que foram sincronizadas com um protocolo de TEFT, múltiparas e com uma condição corporal de 3 a 4 (escala de 1 a 5). O tratamento de sincronização consistiu em um dispositivo auricular Crestar (Crestar, Intervet, Brasil) ou um dispositivo intravaginal DIB (Syntex, Argentina), mais 2 mg de benzoato de estradiol (EB; Syntex) no Dia 0 e 400 UI de eCG (Folligon 5000, Intervet ou Novormon, Syntex) mais 150 µg de D (+) cloprostenol i.m. (Preloban, Intervet ou Ciclase, Syntex) no Dia 5. No Dia 8, os Crestar e os DIB foram retirados e foi administrado 1 mg de EB (Syntex) 24 horas depois. No Dia 16, todas as vacas foram examinadas por ultrassonografia e aquelas com um CL >25,6 mm² foram inovuladas com embriões congelados por TETF no Dia 17. Foram utilizados 294 embriões Grau 1 (IETS). A variável tempo de transferência foi classificada em 3 grupos, medida em segundos. O primeiro grupo foi até 180 segundos (G1), o segundo foi entre 181 até 360 segundos (G2) e o último maior que 361 (G3), (Intervalo desde 361 até 805 segundos). O diagnóstico de prenhez foi realizado por ultrassonografia aos 23 dias depois da TEFT. Os dados foram analisados por regressão logística. Não houve diferença significativa na taxa prenhez/transferida (P=0,2) entre os 3 grupos (G1: 47/74 63,51%; G2: 115/204 56,37%; G3: 8/16 50%). Entretanto haveria que se realizar outros trabalhos para determinar se o tempo de transferência não está influenciando a taxa de prenhez em receptoras de embrião.

EFICIÊNCIA DO DESCONGELAMENTO DE EMBRIÕES OVINOS DA RAÇA DORPER

Andrade, J.C.O.¹; Sousa, B.P.A.¹; Guido, S.I.¹

¹ Av. Caxangá, 205, SI 605, Madalena, Recife-PE, 50.610-230, Brasil.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência do descongelamento de embriões ovinos da raça DORPER sobre a fertilidade. Os embriões (n=441), importados da África do Sul, criopreservados em EGLY a 1,5 M e acondicionados de um a quatro em palhetas de 0,25 mL, foram retirados do N₂ e expostos ao ar por 5" e em seguida imersos em banho-maria por 20" a uma temperatura variando de 28 a 37 °C. Os embriões foram submetidos a quatro diferentes protocolos de descongelamento compostos das seguintes soluções: A – BSA; B – sacarose a 0,5 M; C – EGLY a 0,75 M e D – composto de duas soluções: D₁- sacarose a 0,5 M + EGLY a 0,75 M e D₂- sacarose a 0,5 M, os embriões eram mantidos em cada solução por 5' e em seguida recebiam dois banhos em solução de BSA, sendo avaliados segundo o desenvolvimento (Mo, Bi, Bl e Bx) e a qualidade (Grau I, II, III e IV). Transferiu-se por semi-laparoscopia um embrião por receptora, sincronizada com protocolo para TETF. Procedeu-se a inovação no corno ipsilateral ao ovário que apresentava maior quantidade e/ou qualidade de CL. Os dados foram analisados pelo teste de χ^2 de Pearson. Observaram-se as seguintes taxas de gestação: 1- Com relação aos protocolos foram de 63,0% (63/100) no A, 47,1% (24/51) no B, 42,9% (27/63) no C e 51,1% (116/227) no D. 2- De acordo com a temperatura foram de 55,4% (31/56) no intervalo de 28 a 31 °C, 49,5% (96/194) de 31,1 a 34 °C e 53,9 (103/191) de 34,1 a 37 °C. 3- Conforme o estágio de desenvolvimento na origem foram de 51,9% (40/77) Mo, 60,3% (88/146) Bi, 46,9% (84/179) Bl e 46,2% (18/39) Bx. 4 – No que concerne ao estágio de desenvolvimento após descongelamento foram de 55,2% (181/328) Mo, 50,9% (27/53) Bi, 38,0% (19/50) Bl e 30,0% (3/10) Bx. 5 – No que diz respeito à qualidade do embrião foram de 55,9% (90/161) GI, 59,8% (116/194) GII, 29,2% (19/65) GIII e 23,8% (5/21) GIV. 6– Com relação à taxa de ovulação das receptoras foram de 48,5% (110/227) apresentando um CL, 56,1% (97/173) dois CL e 56,1% (23/41) três ou mais CL. Concluiu-se que a taxa de concepção de 52,2% (230/441) dentre as variáveis analisadas sofreu influencia (p<0,05) apenas quanto ao grau de qualidade do embrião no pós-descongelamento.

APLICAÇÃO DE SONDAS FLUORESCENTES NA AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DE FIBROBLASTOS DE EQUINO OBTIDOS A PARTIR DE FRAGMENTOS DE PELE

Lima Neto, J.F.; Fernandes, C.B.; Landim-Alvarenga, F.C.

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ/UNESP, Botucatu-SP,
18618-000, Brasil. joaoferreiralima@yahoo.com.br

A análise de células obtidas a partir do cultivo de tecidos é importante para a determinação da viabilidade *in situ*, bem como avaliação morfológica qualitativa e quantitativa destas. Sendo assim, neste trabalho foram utilizadas sondas fluorescentes com o intuito de analisar a viabilidade celular de fibroblastos de equinos em cultivo. Foram realizadas seis colheitas de fragmentos de pele de fêmeas equina, com aproximadamente 1 cm² de diâmetro. Os fragmentos foram divididos em pedaços de aproximadamente 1mm³ com auxílio de lâmina de bisturi. O material foi lavado 5 vezes em tubo de centrifuga, com solução de PBS livre de cálcio e magnésio e pH 7,4, desprezando-se o PBS após cada lavagem. O fundo de duas garrafas de cultivo 25cm² (Corning®) foi umedecido com 1ml SFB onde 10 fragmentos foram inseridos por garrafa. As garrafas foram então inclinadas na posição vertical e adicionado 5ml de meio DMEM (Gibco 11995-065) acrescido de 10% SFB, 100UI/ml Penicilina, 100 µg/ml Estreptomicina e 3,0 µg/ml Anfotericina B. Após 40 minutos em estufa com 5% CO₂ em ar, as garrafas foram viradas para a posição horizontal, fazendo com que o meio de cultivo entrasse em contato com os fragmentos teciduais. Todas as garrafas permaneceram por aproximadamente 7 dias em estufa com 5% CO₂ em ar até o início do crescimento celular. O meio de cultivo foi trocado semanalmente. Com 70% de confluência, foi realizada a tripsinização (ATV Vernese, Instituto Adolfo Lutz) e a primeira passagem. O mesmo procedimento foi repetido para a segunda passagem. Foram coletadas amostras para a coloração com sondas fluorescentes durante a suspensão de células para a segunda passagem e ao final desta. Uma alíquota de cada garrafa de cultivo foi ressuspendida e colocada em placa de petri 30mm (Corning®) pré-umedecida com 1ml SFB e cultivadas 24 horas em estufa com 5% CO₂ em ar. Após este período o meio de cultivo foi desprezado e as amostras coradas. Foi comparado o uso do Iodeto de Propídio (IP - Sigma P4170 – 50µg/mL) associado ao Hoescht 33342 (Sigma B2261 - 25 µg/mL) ou ao Laranja de Acridina (USB 10390 – 100µg/mL). Os corantes foram adicionadas ao fundo das placas de petri, um por vez, com tempo de incubação de 5 min, intercalados por lavagens com solução de PBS. A análise foi realizada em microscópio invertido com luz fluorescente (Leica DMIRB). Através da utilização do filtro para luz ultra-violeta (PB 350 – 450 nm) observou-se que os núcleos das células viáveis apareceram corados em azul pelo Hoescht 33342 e os das células mortas em rosa pelo IP. Utilizando o filtro Azul (PB 450 – 490 nm), observou-se núcleos normais corados em verde pelo Laranja de Acridina e núcleos alterados em vermelho pelo IP. No último grupo pode ser ainda analisada a conformação nuclear, sendo consideradas células em apoptose, aquelas com núcleos fragmentados. Concluiu-se que ambas as colorações foram eficientes para a estimativa da viabilidade celular, no entanto a dupla coloração com IP/Laranja de Acridina ofereceu um padrão mais claro de fluorescência, o que permitiu também a análise da morfologia nuclear dos fibroblastos de equinos.

Agradecimentos: FAPESP – processo 04/00822-1 e CNPq.

PADRONIZAÇÃO DO CULTIVO PRIMÁRIO DE FIBROBLASTOS EQUÍNO A PARTIR DE FRAGMENTOS DE PELE

Fernandes, C. B. ; Lima Neto, J. F.; Landim-Alvarenga, F.C.

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ/UNESP, Botucatu-SP, 18618-000, Brasil. - fernandescb@yahoo.com.br

O cultivo de células e tecidos, de fundamental importância em várias áreas da ciência, tem sido amplamente estudado nas últimas décadas. No entanto, para a espécie equina fatores especiais parecem influenciar o cultivo primário de fibroblastos a partir de fragmentos de pele. O objetivo deste estudo foi padronizar uma técnica eficaz para o cultivo primário de fibroblastos equino nas condições de nosso laboratório, visando o desenvolvimento de um banco de células equina que possibilite a utilização em pesquisas futuras. Foram realizadas seis colheitas de fragmentos de pele de fêmeas equina (propriedade do Departamento de Reprodução Animal FMVZ- UNESP, Botucatu-SP), com aproximadamente 1 cm² de diâmetro. Os fragmentos foram divididos e processados através de duas metodologias: desagregação em pequenas partes com auxílio de tesoura oftálmica curva, ou divisão em pedaços de aproximadamente 1mm³ com auxílio de lâmina de bisturi. O material dos dois grupos foi lavado 5 vezes em tubo de centrifuga, com solução de PBS livre de cálcio e magnésio pH 7,4, com auxílio de um agitador de tubos, desprezando o PBS a cada lavagem. Para o cultivo foram utilizadas duas metodologias. Para o grupo E1 foi adicionado ao material 10 ml de meio de cultivo DMEM (Gibco 11995-065) acrescido de 10% SFB, 100UI/ml Penicilina, 100µg/ml Estreptomicina e 3,0µg/ml Anfotericina B, homogeneizado e distribuído em duas garrafas de cultivo 25cm². Para o grupo E2 o fundo de duas garrafas de cultivo foi umedecido com 1ml SFB aonde os fragmentos foram inseridos, as garrafas foram então inclinadas na posição vertical e adicionado 5ml de meio completo DMEM/10% SFB, 100UI/ml Penicilina, 100 µg/ml Estreptomicina e 3,0 µg/ml Anfotericina B, após 40 minutos em estufa 5% CO₂ em ar as garrafas foram viradas para a posição horizontal, fazendo com que o meio de cultivo entrasse em contato com os tecidos. Ambos grupos permaneceram por aproximadamente 7 dias em estufa 5% CO₂ em ar até o início do crescimento celular. O meio de cultivo completo foi trocado semanalmente e com 70% de confluência foram realizadas a tripsinização (ATV Vernese, Instituto Adolfo Lutz) e a primeira passagem. Este procedimento foi repetido para a segunda passagem. A cada nova passagem o meio utilizado foi acrescido de 20% SFB. Duas passagens foram realizadas antes da congelação. Nas condições do nosso laboratório foi observado que a técnica de desagregação com lamina de bisturi resultou em menor incidência de contaminação bacteriana quando comparado ao uso da tesoura. Além disso a técnica de cultivo utilizada no grupo E2 apresentou um crescimento celular mais uniforme, comparada ao grupo E1. As células em crescimento apresentaram morfologia semelhante à de fibroblastos desde o início de seu cultivo e a proporção de crescimento celular para o grupo E2 não se alterou desde seu isolamento, indicando uma alta eficiência de clonagem.

Agradecimento: FAPESP – processo 04/00822-1 e CNPq.

ANÁLISE DO CICLO CELULAR DE CULTURAS DE CÉLULAS DA GRANULOSA DESTINADAS À REPROGRAMAÇÃO NUCLEAR

Caetano, H.V.A.; Schumacher, R.I.; Goissis M.D.; Oliveira, V.P.; Feitosa, W.B.; Nicacio, A.C.; Gonçalves, J.S.A.; Assumpção, M.E.O.A.; Visintin, J.A.

Departamento de Reprodução Animal – FMVZ-USP, São Paulo-SP, Brasil helocae@yahoo.com.br

Diferentes tipos celulares têm sido utilizados para a clonagem animal. Estas células doadoras de núcleo, antes de serem introduzidas no citoplasma de oócitos, são induzidas à fase G0 pela redução da concentração de soro no meio de cultivo. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o ciclo de células da granulosa oriundas de folículos aspirados de novilhas da raça Nelore com auxílio de ultra-som. As linhagens permaneceram em cultivo padrão acrescido de 10% de soro (controle) e após a semi – confluência foram colocadas por 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas em meio com 0,5% de soro. A análise do ciclo celular revelou que nos cultivos controle pode-se observar 84,7% de células na fase G0+G1; 2,3% na fase S; 7,3% na fase G2+M e 2,0% de células mortas. Quando estas linhagens são submetidas a 24h de carência de soro, pode-se observar 84,7% de células na fase G0+G1; 2,3% na fase S; 6,0% na fase G2+M e 4,6% de células mortas. Com 48h de carência, há 67,6% de células na fase G0+G1; 1,4% na fase S; 5,0% na fase G2+M e 21,5% de células mortas. Com 72h de carência, há 63,1% de células na fase G0+G1; 1,4% na fase S; 3,5% na fase G2+M e 25,9% de células mortas. Com 96h de carência, há 74,7% de células na fase G0+G1; 8,4% na fase S; 6,7% na fase G2+M e 7,5% de células mortas. Com 120h de carência, há 64,4% de células na fase G0+G1; 2,92% na fase S; 1,2% na fase G2+M e 28,7% de células mortas. E com 144h de carência, há 63,1% de células na fase G0+G1; 1,4% na fase S; 3,5% na fase G2+M e 25,9% de células mortas. As linhagens de células da granulosa apresentam alta porcentagem de células em G0+G1 em todos os períodos analisados. Há um aumento da porcentagem de células mortas nos cultivos que permaneceram 72 a 96h e 144h em carência. As células que sobreviveram aumentaram a porcentagem de células na fase G2-M nos cultivos de 120h de carência. As células da granulosa apresentaram alta porcentagem de células na fase G0+G1 tanto nos grupos controle quanto nos carenciados de soro e portanto podem ser utilizadas em qualquer período para a transferência nuclear.

Suporte Financeiro FAPESP 01/13944-0

ANÁLISE DO CICLO CELULAR DE CULTURAS FIBROBLASTOS ADULTOS E FETAIS COMO FONTES PARA A TRANSFERÊNCIA NUCLEAR EM NELORE.

Caetano, H.V.A.; Schumacher, R.I.; Marques, M.G.; Yamada, C.; Simões, R.; Mendes, C.M.; Assumpção, M.E.O.A.; Visintin, J.A.

Departamento Reprodução Animal – FMVZ-USP, São Paulo-SP, Brasil. helocae@yahoo.com.br

O sucesso da transferência de células somáticas depende da coordenação entre as fases do ciclo celular entre o núcleo doador e o citoplasma receptor. O objetivo deste trabalho foi estabelecer linhagens de fibroblastos originados de pele de bovino adulto e de bovino fetal. Foi analisado o ciclo celular com o uso do citometro de fluxo FACScalibur das linhagens em cultivos padrão (10% de SFB) e em cultivos que permaneceram por 24, 48, 72, 96, 120 e 144h em meio de cultivo carenciados de soro (0,5% SFB). A análise paramétrica foi feita por ANOVA e valores de $P < 0,05$ foram considerados significantes. As análises dos ciclos dos fibroblastos adultos e fetais que permaneceram em meio de cultivo padrão demonstraram que as células comportam-se de maneira semelhante. Das células do cultivo padrão analisadas 71,1% e 80,7% estavam na fase G0+G1; 2,7% e 3,9% na fase S e 18,8% e 10,8% na fase G2+M, respectivamente para fibroblastos adultos e fetais. As linhagens fetais que permaneceram por 24h e 120h em carência de soro apresentaram as porcentagens mais baixas de células na fase G0+G1 (2,5% às 24h e 1,54 às 120h). Também apresentaram nestes períodos as maiores porcentagens de células mortas (92,3% às 24h e 95,3% às 120h). Nos demais períodos a porcentagem de células na fase G0+G1 não apresentou aumento em relação ao controle; (58,4% às 48h; 77,5% às 72h; 69,6% às 96h; 82,5% às 144h). As linhagens adultas apresentaram nos cultivos de 48 e 72h de carência, uma porcentagem de células em G0+G1 menor que as apresentadas pelo grupo controle; (47,0% às 48h e 50,4% às 72h). Nos demais períodos de carência não foi observada diferença em relação ao controle; (78,2%; 78,9%; 71,4%; 76,4; respectivamente para 24, 96, 120 e 144h). Foi concluído que para essas linhagens celulares os períodos de carência não aumentaram a porcentagem de células em G0-G1.

Suporte Financeiro FAPESP 01/13944-0

ANÁLISE DO CICLO CELULAR DE FIBROBLASTOS ADULTOS DESTINADOS A REPROGRAMAÇÃO NUCLEAR EM EQUINOS

Caetano, H.V.A.; Schumacher, R.I.; Martins, L.F.; Nascimento, A.B.; Milazzotto, M.P.;
Coutinho, A.R.S.; Assumpção, M.E.O.A.; Visintin, J.A.

Departamento de Reprodução Animal – FMVZ-USP, São Paulo-SP, Brasil helocae@yahoo.com.br

O desenvolvimento normal de embriões clonados é dependente da transferência de núcleos na fase G0 ou G1 do ciclo celular. O objetivo deste trabalho foi avaliar o ciclo celular de fibroblastos eqüinos submetidos à carência de soro fetal bovino (0,5% SFB) pelos períodos de 24, 48, 72, 96, 120 ou 144 horas. Foi estabelecido o cultivo primário de fibroblastos oriundos da mucosa oral de eqüino adulto. O ciclo celular foi determinado por citometria de fluxo (FACS), utilizando iodeto de propídeo como marcador da quantidade de DNA. As análises demonstraram que os cultivos padrão (5% SFB) apresentaram 66,5% de células na fase G0+G1; 12,3% na fase S; 17,1% na fase G2+M e 1,4% de células mortas. Nos cultivos que permaneceram por 24h em meio carenciado de SFB, foi observado 17,8% de células na fase G0+G1; 1,4% na fase S; 0,4% na fase G2+M e 38,4% de células mortas. Com 48h de carência pôde-se observar 9,9% em G0+G1; 1,2% em S; 0,6% em G2+M e 38,7% de células mortas. Com 72 horas de carência foi observado 16,1% em G0+G1; 3,1% em S; 1,2% em G2+M e 20,8% de mortas. Com 96h de carência há 17,5% em G0+G1; 3,9% em S; 1,3% em G2+M e 15,4% mortas. Com 120h de carência 4,5% das células estavam em G0+G1; 1,0% em S; 0,2 em G2+M e 67,1% mortas. Com 144h de carência há 85,2% em G0+G1; 4,1% em S; 1,4% em G2+M e 6,2% de mortas. As porcentagens de células na fase S e G2+M permaneceram constantes nos períodos analisados, mas foi observado altas porcentagens de células mortas em todos os períodos que as culturas permaneceram em carência, exceto com 144h. Pode-se concluir que as linhagens de fibroblastos eqüinos são muito sensíveis à diminuição da concentração de SFB nos meios de cultivo. Os fibroblastos que conseguiram sobreviver à carência de soro e se duplicaram, apresentaram porcentagem alta de células em G2+M, observada às 120h de carência. Após 144h de carência, pôde-se observar o melhor período para a obtenção de células em G0+G1 e portanto o tempo ideal para a utilização dessas células na transferência nuclear. Suporte Financeiro FAPESP 01/13944-0

CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE DO CICLO CELULAR DE FIBROBLASTOS DE CÃO ADULTO (Dogue Alemão)

Caetano, H.V.A.; Schumacher, R.I.; Yamada, C.; Gonçalves, J.S.A.; Goissis M.D.; Assumpção, M.E.O.A.; Visintin, J.A.

Departamento de Reprodução Animal – FMVZ-USP, São Paulo-SP, Brasil helocae@yahoo.com.br

Fibroblastos de animais adultos podem ser utilizados como fonte doadora de núcleos na transferência nuclear e como modelos para estudos de ativação genômica, reprogramação nuclear, sincronização do ciclo celular e interações núcleo-citoplasma. Um fator importante para o sucesso da reprogramação nuclear em embriões clonados a partir de células somáticas é a coordenação das fases do ciclo celular. O objetivo deste trabalho foi estabelecer cultivo primário de fibroblasto de cães adultos. Ainda, realizou-se a análise da distribuição das fases do ciclo celular em cultivos padrão (5% SFB) ou que permaneceram por 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas em meio carenciados de soro fetal bovino (0,5% SFB). Fibroblastos de cães foram caracterizados morfológica e ultra-estruturalmente. As linhagens foram caracterizadas por imunofluorescência indireta, utilizando-se o anticorpo anti-vimentina que é um marcador de proteína de filamento intermediário. Após a terceira passagem, todas as células apresentaram marcação positiva. O ciclo celular foi determinado por citometria de fluxo (FACS), utilizando-se iodeto de propídeo como marcador da quantidade de DNA. As análises demonstraram que nos cultivos padrão, observou-se 48,5% das células na fase G0+G1; 1,2% na fase S; 40,4% na fase G2+M e 2,8% de células mortas. Nos cultivos que permaneceram por 24h em meio carenciado de soro 50,9% das células na fase G0+G1; 1,4% na fase S; 37,7% na fase G2+M e 3,2% de células mortas. Com 48h de carência pode-se observar 56,5% em G0+G1; 1,4% em S; 30,5% em G2+M e 4,2% de mortas. Com 72 horas de carência foi observado 56,5% em G0+G1; 1,4% em S; 31,4% em G2+M e 3,1% de mortas. Com 96h de carência há 1,2% em G0+G1; 0,6% em S; 0,4% em G2+M e 88,0% de mortas. Com 120h de carência há 56,7% em G0+G1; 1,2% em S; 34,4% em G2+M e 1,7% de mortas. Com 144h de carência há 48,2% em G0+G1; 2,0% em S; 25,5 em G2+M e 7,3% de células mortas. A análise dos dados revelou que a porcentagem de células na fase S permaneceu constante em todos os períodos analisados. Também não houve variação nas porcentagens de células na fase G0+G1 e G2+M. Exceto com na população celular que permaneceu por 96h em carência. Nesse período há uma grande porcentagem de células mortas e uma queda abrupta da porcentagem de células na fase G0+G1 e G2+M, sendo que esta proporção volta a subir com 120h de carência. Baseado nestes resultados pode-se concluir que 72h de carência é o melhor período para a utilização das células em G0+G1 na transferência nuclear.

Suporte Financeiro FAPESP 01/13944-0

EFEITOS DA CARÊNCIA DE SORO FETAL BOVINO OU DO TRATAMENTO COM CICLOHEXEMIDE EM FIBROBLASTOS FETAIS EM SUÍNOS

Goissis, M.D.; Caetano, H.V.A.; Marques, M.G.; Nascimento, A.B.; Oliveira, V.P.;
Assumpção, M.E.O.A.; Visintin, J.A.

Departamento de Reprodução Animal – FMVZ-USP, São Paulo-SP, Brasil mgoissis@yahoo.com.br

O sucesso da transferência nuclear depende de diversos fatores, como o ciclo celular da célula doadora de núcleo. É descrito que células doadoras em estágio G0 ou G1 permitem translocação de *loci* gênico, contribuindo para a reprogramação epigenética. Células nestes estágios são importantes para a manutenção da ploidia quando se utilizam oócitos não pré-ativados que têm altos níveis de MPF. Para aumentar a eficiência da transferência nuclear, a sincronização em G1/G0 das células doadoras é um fator importante. Vários métodos de sincronização estão descritos, incluindo protocolos com drogas ou carência de soro fetal bovino (SFB). O objetivo deste trabalho foi observar os efeitos da carência de SFB ou da adição do ciclohexemide (CHX) em fibroblastos oriundos de feto suíno. Os fibroblastos foram obtidos de feto de matadouro com aproximadamente 45 dias de idade e cultivados até a quinta passagem no meio DMEM contendo 10% de SFB, quando foram divididos em três grupos. Os tratamentos foram 10% de SFB como controle; 0,5% de SFB por 1 a 6 dias; 10µg/ml de CHX com 10% de SFB por 12, 24 e 48h. As células foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) para observação em microscópio de epifluorescência ou submetidas ao teste de viabilidade com trypan blue que evidencia células mortas. As células controle apresentaram citoplasma homogêneo, núcleo delimitado com nucléolos evidenciados, limites citoplasmáticos visíveis e prolongamentos citoplasmáticos. Células em carência de SFB por 1, 2 e 3 dias não mostraram nenhuma alteração em relação às células controle. Carência por 4 dias provocou poucas alterações de contorno citoplasmático, indicando lesão celular. Células carenciadas por 5 dias mostraram aumento de eosinofilia, também indicando lesão celular. Após 6 dias de carência as células apresentaram citoplasma heterogêneo, filamentos citoplasmáticos desorganizados, deterioração morfológica, redução da basofilia nuclear, indicando cariólise. Células tratadas com 10µg/ml de CHX por 12 horas apresentaram-se similares às do controle. O tratamento por 24 horas induziu deterioração morfológica e cariorrexise e por 48 horas provocou inibição da proliferação dos fibroblastos, deterioração morfológica, deslocamento nuclear, cariorrexise e aumento da eosinofilia. Não foi verificada fluorescência nas células coradas por HE indicando que os tratamentos não induziram apoptose. Em conclusão, a carência de SFB e o tratamento com CHX reduzem a viabilidade celular de acordo com o tempo de exposição, causando diversos danos que podem reduzir o sucesso da transferência nuclear.

Suporte financeiro CNPq-PIBIC

EFEITO DO NÚMERO DA PASSAGEM E DO SEXO DE FIBROBLASTOS NO DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS POR TRANSFERÊNCIA NUCLEAR

Merighe, G.K.F.¹; Miranda, M.S.¹; De Bem, T.H.C.¹; Watanabe, Y.F.²; Meirelles, F.V.¹

¹Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento Departamento de Ciências Básicas - FZEA/USP, Pirassununga-SP, Brasil. ²Vitrogen - Pesquisa e Desenvolvimento em Biotecnologia da Reprodução S/C Ltda. gkrempel@usp.br

Células cultivadas por longos períodos acumulam alterações genéticas e epigenéticas que resultam, eventualmente, em uma inapropriada reprogramação nuclear de embriões submetidos à transferência nuclear a partir de células somáticas (SCNT). Além disso, a variável sexo revela ser um fator limitante na produção de blastocistos e na competência de desenvolvimento pós-implantação de embriões produzidos *in vitro*. Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi determinar o número da passagem ideal para os ensaios de transferência nuclear, bem como, avaliar o efeito do sexo no desenvolvimento *in vitro* e no potencial pós-implantação destes embriões. Para tanto, oócitos derivados de matadouro foram enucleados e reconstruídos com células somáticas de animal adulto a partir de 18 horas pós-maturação. Após a fusão (dois pulsos de 2,25 kv/cm durante 65 µseg) e ativação química (ionomicina - 5,0 µM durante 5 minutos e 6-DMAP - 2,0 mM durante 3 horas), os conjuntos oócito-célula somática foram cultivados em CR2 com monocamada de células da granulosa a 38,8°C, em atmosfera umidificada de 5% de CO₂ em ar durante 7 dias. Os dados foram analisados utilizando o teste qui-quadrado (χ^2). A taxa de desenvolvimento até o estágio de blastocisto foi maior nas passagens iniciais (3^a a 5^a) diminuindo nas passagens intermediárias (6^a a 8^a) e tardias (9^a a 12^a; 14%, 10% e 5%, respectivamente). Em relação ao desenvolvimento pós-implantação, apesar das passagens intermediárias apresentarem melhores resultados de prenhez aos 30 dias (34%) em relação às demais (25% - iniciais e 0% - tardias), as passagens iniciais resultaram em melhores taxas de gestação a termo (38% vs 6% - intermediárias e 0% - tardias). Em relação ao sexo, não foi observada diferença na formação de blastocistos entre embriões machos e fêmeas (16% e 14%, respectivamente). Embora a taxa de prenhez entre indivíduos machos e fêmeas também tenha sido semelhante (30% e 25% respectivamente), os resultados evidenciam maior competência de desenvolvimento a termo de machos (12%, 8/66) comparada a fêmeas (4%, 4/107) em relação aos embriões transferidos. Em conclusão, estes resultados indicam que células doadoras de núcleos cultivados por um longo período dificultam a produção de blastocistos e aumentam as chances de perdas durante a gestação, além disso, gestações de fetos do sexo feminino tendem a apresentar maior taxa de perda gestacional.

Apoio: VITROGEN® e FAPESP

AVALIAÇÃO DO USO DA MINI-PALHETA (0,25mL) NO CONGELAMENTO DE FIBROBLASTOS BOVINOS CULTIVADOS *IN VITRO*

De Bem, T.H.C.¹; Miranda, M.S.^{1,2}; Merighe, G.K.F.¹; Watanabe, Y.F.³;
Meirelles, F.V.¹; Ohashi, O.M.²

¹Laboratório de Morfofisiologia Molecular do Desenvolvimento - FZEA – Pirassununga-SP

²Laboratório de FIV – UFPA – Belém-PA ³Vitrogen – Cravinhos-SP tiagodebem@yahoo.com.br

A manutenção de um banco de células somáticas é necessária para a realização da clonagem animal por transferência nuclear. Na fase de congelamento destas células, alguns problemas como a acomodação correta de criotubos dentro dos botijões convencionais de N₂L tem sido vivenciados por muitos laboratórios. Neste estudo, avaliou-se a eficácia da utilização de mini-palhetas (0,25 mL) para o congelamento de células somáticas cultivadas *in vitro*. Fibroblastos bovinos de origem fetal (FF) e fibroblastos adultos (FA) foram envasados paralelamente em criotubos (FFcriotubo/FFpalheta – 1x10⁶ células/mL) e palhetas (FACriotubo/FAPalheta – 5x10⁵ células/mL) e congelados em meio DMEM suplementado com 20% SFB e 10% de DMSO pela redução gradual da temperatura (1 hora 4°C, 1 hora em a -20°C, 48 horas a -86°C) e imersão em N₂L. Em seguida, as células foram descongeladas em banho-maria a 35°C e parte avaliadas quanto a integridade da membrana celular mediante coloração combinada de Hoechst 33342 (5 µg/mL) e Iodeto de Propídeo (100 µg/mL). As células restantes foram semeadas em placas para observar a capacidade de se fixar e multiplicar. Para análise estatística foi utilizado o teste do qui-quadrado. O grupo FFpalheta (n = 228) apresentou aumento no número de células mortas em relação ao grupo FFcriotubo (n = 514; 19,7% vs. 13%, respectivamente; p<0,05). Com relação às células adultas, também foi observado entre os grupos FAPalheta (n=306) e FACriotubo (n=405) um acréscimo no número de células mortas (13,3% vs. 4,4%, respectivamente; p<0,05). Apesar do decréscimo de 10% na viabilidade celular, Fibroblastos bovinos fetais e adultos congelados em palhetas permitem formação de monocamada após descongelamento. Estes resultados confirmam a possibilidade de utilização de palhetas de 0,25 mL no congelamento de fibroblastos bovinos. Há, no entanto, necessidade de se determinar em futuros experimentos se a crioinjúria mais frequente acarreta em outros danos nas células como por exemplo os ligados alterações cromossômicas.

RESULTADOS PRELIMINARES DE TRANSFERÊNCIA DE CITOPLASMA BUBALINO EM ZIGOTOS BOVINOS

Ferreira, C.R.¹; Meirelles, F.V.²; Sá Filho, M.F.³; Baruselli, P.S.³; Gasparini, B.⁵; Perecin, F.¹; Méo, S.C.⁴; Tetzner, T.A.D.¹; Saraiva, N.Z.¹; Yamazaki, W.¹; Vantini, R.¹; Garcia J.M.¹

¹DMVPRA FCAV-UNESP, 14884-900, Jaboticabal-SP, Brasil, ²FZEA-USP, ZAB, Pirassununga-SP, Brasil, ³DRA-USP, São Paulo-SP, Brasil, ⁴CPDGRA-IZ, APTA/SAA, Nova Odessa-SP, 13460-000, Brasil. ⁵University of Frederico II, Napoly, Italy. chrisferreira13@yahoo.com.br

A transferência citoplasmática (TC) em zigotos pode ser utilizada para estudos sobre compatibilidade citoplasmática, efeitos epigenéticos no desenvolvimento embrionário e contribuição fenotípica do mtDNA. Esta técnica pode ser também empregada para avaliar a possibilidade de preservar espécies ameaçadas de extinção utilizando-se citoplastos receptores de espécies domésticas relacionadas para transferência nuclear. Nosso objetivo foi aplicar e avaliar a TC interespecífica de citoplasto bubalino para zigotos bovinos. Oócitos bovinos obtidos a partir de vacas abatidas foram maturados *in vitro* em meio TCM-199 suplementado com 10% de SFB e hormônios por 24h sob óleo mineral a 38,5°C em 5% de CO₂ em ar. Após a MIV foi realizada a fertilização *in vitro* (FIV) para produção dos zigotos receptores. Oócitos bubalinos, usados como doadores de citoplasto, foram coletados por punção folicular guiada por ultrassonografia (OPU), maturados *in vitro* nas mesmas condições utilizadas para oócitos bovinos com suplementação de 50µM de cisteamina e 0,3mM de cistina. Depois de 22h de MIV, os oócitos bubalinos foram enucleados em metáfase II e ativados partenogeneticamente (5 µM de inomicina por 5 min e 2 mM de 6-DMAP por 4 h). Depois de 10-12h de FIV, os zigotos bovinos receptores foram lavados 3 vezes em meio SOF-HEPES suplementado com 10% de SFB e tiveram as células do *cumulus* removidas com hialuronidase 0,5%, sendo em seguida selecionados quanto à presença do segundo corpúsculo polar (2.CP). O sistema de microcirurgia consistiu de duas pipetas de preensão (uma para o doador de citoplasto e outra para o zigoto receptor) e uma pipeta de injeção. Tanto os zigotos receptores quando os citoplastos doadores foram incubados por 30min em meio contendo 7.5µg/mL de citocalasina B (CB) antes da microcirurgia, realizada em meio SOF-HEPES suplementado com 10% de SFB e 7,5µg/mL de CB. Os zigotos bovinos tiveram seu 2.CP e citoplasma adjacente removidos previamente à TC. Cerca de 10-15% de citoplasto bubalino foi introduzido no espaço perivitelínico do zigoto bovino receptor e eletrofundido (2 pulsos de 1,5kV/cm por 30µs em solução de manitol 0,28M). Dezesseis (61,53%) dentre 26 embriões interespecíficos de TC clivaram e desenvolveram-se 3 blastocistos (11.54%), os quais foram transferidos no dia 7 para vacas receptoras sincronizadas, resultando em uma prenhez (em andamento) que encontra-se próxima do termo. O grupo controle FIV (n=30) apresentou 70% de clivagem e 10% de desenvolvimento de blastocistos. Estes resultados preliminares sugerem que a transferência de 10-15% de citoplasto bubalino para zigotos bovinos não prejudica o desenvolvimento embrionário, entretanto outros experimentos são necessários para confirmar esta hipótese. A TC bubalino para zigotos bovinos é compatível com a gestação. Embriões pós-fusão e o animal/feto produzido serão analisados para estimativa da quantidade de mtDNA bubalino introduzido e seu destino ao final do desenvolvimento fetal.

ATIVAÇÃO PARTENOGENÉTICA DE OÓCITOS BOVINOS COM IONÓFOROS DE CÁLCIO A23187 (CA) OU IONOMICINA (IO)

Milazzotto, M.P.; Feitosa, W.B.; Simões, R.; Martins, L.F.; Coutinho, A.R.S.;
Assumpção, M.E.O.A.; Visintin, J.A.

Departamento de Reprodução Animal – FMVZ-USP, São Paulo-SP, Brasil
mazamila@terra.com.br

A ativação de oócitos maturados *in vitro* é essencial para o sucesso da clonagem animal por transferência nuclear e para isto têm sido usados os ionóforos de Ca^{2+} A23187 (CA) ou ionomicina (IO). A combinação do CA com 6-DMAP induz altos índices de ativação e desenvolvimento de blastocistos. Entretanto, oócitos ativados com IO e 6-DMAP podem sofrer alterações no DNA, refletindo um padrão anormal de cariocinese durante o primeiro ciclo celular. O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos dos ionóforos de Cálcio A23187 ou ionomicina como agentes primários de ativação de oócitos bovinos, associados ou não ao BSA, um bloqueador da ativação, sobre a eficiência no índice e qualidade embrionária. Complexos cumulus-oócitos foram maturados em TCM199 suplementado com SFB e hormônios por 18hs a 38,5°C e 5% de CO_2 em ar. Os oócitos foram desnudos, selecionados quanto à presença do primeiro corpúsculo polar, mantidos no meio SOFaa até completarem 24hs de maturação e divididos em quatro grupos experimentais: Grupo 1 - CA (CA 5mM, 5min + 6-dimetilaminopurina (6-DMAP), 3hs); Grupo 2 - CA (CA 5mM, 5min + BSA, 5min + 6-DMAP, 3hs); Grupo 3 - IO (IO 5mM, 5min + 6-DMAP, 3hs); Grupo 4 - IO (IO 5mM, 5min + BSA, 5min, + 6-DMAP, 3hs). Após esse período, os oócitos foram cultivados no meio SOF por 7 dias a 38,5°C e 5% de CO_2 em ar e avaliados no D2 quanto à clivagem e no D7 quanto ao desenvolvimento e a qualidade dos embriões. Para avaliação da qualidade embrionária, foram utilizados os corantes fluorescentes iodeto de propídeo e Hoechst 33342. Os resultados foram avaliados pelo ANOVA, sendo submetidos ao teste LSD para os índices de embriões e ao teste T para a qualidade embrionária. Foram realizadas 4 repetições com um total de 89 oócitos por tratamento. Houve diferença ($p < 0,05$) quanto aos índices de embriões entre os grupos 1 - CA (54,4%^a) e 3 - IO (51,4%^a) em relação ao grupo 4 - IO (18,3%^b), mas o grupo 2 - CA (39,8%^{ab}) não diferiu em relação aos demais grupos. Entretanto, não foi observada diferença ($p > 0,05$) quanto ao número total e os índices de células viáveis entre os grupos 1 - CA (63,1 e 49,9%), 2 - CA (57,2 e 45,8%), 3 - IO (60,9 e 64,9%) e 4 - IO (72,4 e 50,9%), respectivamente. Concluiu-se que a BSA não foi benéfica para a ativação oocitária, tendo efeito negativo no índice de embriões quando associada ao IO. No entanto, os ionóforos de cálcio e a BSA não interferiram na qualidade embrionária.

Suporte financeiro FAPESP: 03/00156-9

ATIVACÃO E DESENVOLVIMENTO PARTENOGENÉTICO DE OÓCITOS BOVINOS JOVENS

Biondi, F.C.¹; Cordeiro, M.S.¹; Miranda, M.S.¹; Santos, S.S.D.²; Ohashi, O.M.¹

¹Laboratório de Fertilização *in vitro* - CCB/UFPA, Belém-PA, Brasil ²Departamento de Histologia e Embriologia - CCB/UFPA, Belém-PA, Brasil - fbiondi@ufpa.br

No ramo da biotecnologia reprodutiva, o desenvolvimento de protocolos de ativação partenogenética eficientes é muito útil no estudo da competência oocitária e essencial para melhorar os procedimentos de transferência nuclear em espécies domésticas. Em mamíferos, a ativação partenogenética pode ser induzida por diversos agentes, tais como: pulso elétrico, etanol, cálcio ionóforo, estrôncio, ionomicina e, ainda, uma combinação destes agentes com inibidores da síntese protéica ou da fosforilação de proteínas, como a cicloheximide e 6-dimetilaminopurina (6-DMAP). O presente estudo objetivou avaliar a ativação química com ionomicina e estrôncio, assim como o efeito da 6-DMAP na ativação e desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos jovens. Oócitos bovinos, obtidos em abatedouro local, foram maturados *in vitro* em Meio 199 com bicarbonato, FSH, LH, insulina, cisteamina, piruvato e antibióticos, em 5% de CO₂ a 38,5°C, em atmosfera úmida, durante 24 horas. Após a MIV, os oócitos foram desnudados e apenas aqueles com o 1º corpúsculo polar foram expostos a 5 µM de ionomicina, por 5 minutos (I) ou a 25 mM de estrôncio, por 6 horas (S). Então, foram incubados em meio CR2 (I e S) ou meio CR2 + 2,0 mM de 6-DMAP (ID e SD). Após 4 horas (ID e SD) e 15 horas (I e S) de cultivo, os oócitos foram fixados e a formação pronuclear foi analisada. Clivagem e desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto foram analisados no 2º e 8º dia de cultivo, respectivamente. Comparações entre os grupos foram feitas pelo teste de χ^2 , empregando o software CLUMP. Diferenças foram consideradas significativas com $p < 0,05$. Os resultados mostraram a ocorrência de ativação de oócitos bovinos jovens tratados com ionomicina ou estrôncio e 6-DMAP. A incubação com 6-DMAP aumentou os índices de formação pronuclear, clivagem e blastocisto da ionomicina (18,1% vs. 99,1%; 5,8% vs. 65,2%; 0% vs. 44,3%) e estrôncio (33,8% vs. 81,7%; 35,3% vs. 54,3%; 4,3% vs. 25%). Os índices de formação pronuclear e clivagem do estrôncio foram maiores ($p < 0,05$) estatisticamente do que os da ionomicina, na ausência da 6-DMAP (33,8% vs. 18,1% e 35,3% vs. 5,8%); mas, em combinação com a 6-DMAP, os índices de formação pronuclear e de blastocisto da ionomicina foram maiores ($p < 0,05$) do que as do estrôncio (99,1% vs. 81,7% e 44,3% vs. 25%). Os maiores ($p < 0,05$) índices de formação pronuclear, clivagem e blastocisto foram obtidos no tratamento ionomicina com 6-DMAP, os quais foram similares aos obtidos na FIV. Adicionalmente, os resultados mostram que tratamentos com ionomicina ou estrôncio induzem baixos índices de formação pronuclear, clivagem e blastocisto, e para melhores resultados na ativação de oócitos bovinos jovens é necessário o tratamento com inibidores da síntese protéica e da fosforilação para prevenir a reativação do MPF.

DESENVOLVIMENTO PARTENOGENÉTICO DE OVÓCITOS BOVINOS BLOQUEADOS COM BUTIROLACTONA I: RESULTADOS PRELIMINARES

Miranda, M.S.¹; Merighe G.K.F.¹; Adona, P.R.^{1,2}; Biase, F.H.¹; Meirelles, F.V.¹; Leal, C.L.V.¹

¹Departamento de Ciências Básicas – FZEA/USP – Pirassununga-SP, ²Setor de Reprodução Animal – LMGA/CCTA/UENF – Campos dos Goytacazes-RJ

Visando melhorar os resultados da produção *in vitro* de embriões bovinos, tem-se proposto uma pré-maturação com o uso de inibidor de cinase dependente de ciclina. O bloqueio da meiose permitiria ao ovócito um tempo adicional para uma melhor maturação citoplasmática e aumento da competência de desenvolvimento embrionário. O objetivo do presente estudo foi de avaliar a competência de desenvolvimento embrionário partenogenético de ovócitos bovinos bloqueados com butirolactona I (BL). Ovócitos coletados de ovários de frigorífico foram aspirados de folículos de 2-6 mm e divididos em 2 grupos: G1 – bloqueados com 10 μ M de BL em TCM199 com 10 μ g/mL de gentamicina por 24h e, posteriormente, maturados por 18h em meio de maturação (TCM199 com 10% de SFB, 5,0 μ g/mL de LH, 0,5 μ g/mL de FSH e 10 μ g/mL de gentamicina); G2 – os ovócitos foram submetidos a maturação *in vitro* (MIV) por 18h sem o uso prévio de inibidor (controle). Após a maturação, os ovócitos foram desnudados e selecionados pela presença do 1^o corpúsculo polar (CP). Os ovócitos com 1^o CP foram ativados partenogeneticamente com 5 μ M de ionomicina em TCM199, por 5 min., seguidos da incubação com 2mM de 6-DMAP diluído em meio de cultivo (SOF com 10% de SFB), por 3 horas. Os ovócitos ativados foram cultivados em SOF, por 7, dias sobre monocamada de granulosa, em estufa a 5% de CO₂, em ar. Os resultados preliminares mostram que não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos G1 (n = 51) e G2 (n = 44) com relação aos índices de extrusão do 1^o CP (67% vs. 75,1%, respectivamente), clivagem (61% vs. 59%), embriões no estágio de 8-células, às 48h após a ativação (35,4% vs. 38,4%) e desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto, 192h após a ativação (21,5% vs. 34%). Portanto, o bloqueio meiótico com a BL por 24h, aparentemente não incrementa a competência de desenvolvimento dos ovócitos bovinos. Como também não foi observado efeito negativo sobre o desenvolvimento, a utilização deste protocolo pode vir a ser útil na manipulação do tempo de maturação visando a maximização do uso de ovócitos em programas de transferência nuclear somática.

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA ATIVAÇÃO QUÍMICA OU ELÉTRICA NA ATIVAÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS

Milazzotto, M.P.; Feitosa, W.B.; Martins, L.F.; Yamada, C.; Nicacio, A.C.;
Assumpção, M.E.O.A.; Visintin, J.A.

Departamento de Reprodução Animal – FMVZ-USP, São Paulo-SP, Brasil mazamila@terra.com.br

A ativação química de oócitos pode ser induzida pelo ionóforo A23187 (CA) que promove a liberação do cálcio intracelular, e que também facilita o influxo de íons cálcio do meio extracelular. A estimulação elétrica (EL) é uma etapa essencial nos protocolos de transferência nuclear (TN), visando a fusão do oócito enucleado com a célula doadora de núcleo, podendo ser usada como alternativa à ativação química por induzir influxo de cálcio do meio extracelular pela formação de poros na membrana plasmática. O objetivo deste trabalho foi verificar três protocolos, utilizando cálcio extracelular (CA), intracelular (EL) ou ambos (CE) nos índices de embriões e na viabilidade embrionária. Complexos cumulus-oócitos foram maturados em TCM199 suplementado com SFB e hormônios por 18hs a 38,5°C e 5% CO₂ em ar. Os oócitos foram desnudos, selecionados quanto à presença do primeiro corpúsculo polar, mantidos no meio SOF até completarem 24hs de maturação e divididos em três grupos experimentais: Grupo 1 - CA (CA 5mM, 5min + 6-dimetilaminopurina (6-DMAP), 3hs); Grupo 2 - EL (EL 1,5kV/cm, 20µs, 2 pulsos + 6-DMAP, 3hs); Grupo 3 - CE (EL 1,5kV/cm, 20µs, 2 pulsos + CA 5mM, 5min + 6-DMAP, 3hs). Após esse período, os oócitos foram cultivados no meio SOF por 7 dias a 38,5°C e 5% CO₂ em ar, sendo avaliados no D2 quanto à clivagem e no D7 quanto ao desenvolvimento e a qualidade dos embriões. Para avaliação da qualidade embrionária, foram utilizados os corantes fluorescentes iodeto de propídeo e Hoechst 33342. Os resultados foram avaliados pela ANOVA, sendo submetidos ao teste LSD para os índices de embriões e ao teste T para a qualidade embrionária. Foram realizados 4 repetições com um total de 89 oócitos no grupo 1 - CA; 79 no grupo 2 - EL e 120 no grupo 3 - CE. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) nos índices de embriões entre os grupos 1 - CA (54,3%^a), 2 - EL (54,5%^a) e 3 - CE (32,8%^a), assim como no número total de células entre os grupos 1 - CA (64,6^a), 2 - EL (58,4^a) e 3 - CE (52,7^a). Entretanto, houve diferença ($p < 0,01$) na porcentagem de células vivas entre os grupos 1 - CA (50%^a) e 2 - EL (82,7%^b), mas não no grupo 3 - CE (63%^{ab}). Conclui-se que o estímulo elétrico como via de indução de influxo de cálcio, apesar de não ser mais efetiva nos índices embrionários, representa uma alternativa na produção de embriões de maior qualidade.

Suporte financeiro FAPESP: 03/00156-9

TAXAS DE ECLOSÃO DE BLASTOCISTOS DE CAMUNDONGOS DAS LINHAGENS C57BL/6 E DAS TRANSGÊNICAS EM BACKGROUND C57BL/6 CULTIVADOS *IN VITRO*

Maffili, V.V.¹; Paiva, F.P.¹; Silva, C.A.¹; Viana, J.H.M.²

¹ Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – FIOCRUZ – vmaffili@cpqgm.fiocruz.br

². Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora

O objetivo deste estudo foi de comparar o desenvolvimento *in vitro* de embriões de camundongos *wild type* (*wt*) C57Bl/6 e de algumas linhagens transgênicas em *background* C57Bl/6, após o cultivo. No presente estudo foram utilizados embriões de fêmeas com seis semanas de idade das linhagens C57Bl/6 *wt* (T1) e os transgênicos C57Bl/6 *iNOS*^{tm1Plh} (T2), C57Bl/6 *Ifngr*^{tm1Agt} (T3), C57Bl/6 GFP (T4), C57Bl/6 *Gt(ROSA)26Sor*^{tm1Ts} (T5), C57Bl/6 *Tnfrsf1a*^{tm1Imx} (T6), C57Bl/6 *Cd28*^{tm1Mak} (T7), C57Bl/6 *Il10*^{tm1Cgn} (T8) e C57Bl/6 *β2mtm1Unc* (T9). As fêmeas foram superovuladas com a administração de 5 UI de eCG, seguidas de 5 UI de hCG, intervaladas de 48 horas. Logo após a aplicação da hCG, as fêmeas foram acasaladas com os machos na proporção de 1:1 e retiradas no dia seguinte. A coleta dos embriões foi realizada 38 horas após a aplicação da hCG através da lavagem da tuba uterina com meio M2. Os embriões selecionados e classificados como viáveis foram colocados em solução crioprotetora (1,5M de propilenoglicol em meio M2) por 15 minutos. Findo este período foram congelados em congelador de células à temperatura de -7°C. Após 5 minutos foi realizado o “seeding” e os embriões foram submetidos a uma curva de resfriamento de 0,3°C/minuto até -30°C, sendo então imersos e armazenados em N₂ (RENARD, J.P.; BALBINET, C.; J. Exp. Zoo., 230-443, 1984). O descongelamento foi efetuado retirando-se a palheta do botijão e expondo-a a temperatura ambiente por 40 segundos. Em seguida, o conteúdo da palheta foi depositado numa placa de petri de 35mm, onde permaneceu durante 5 minutos. Após este período, os embriões foram transferidos para uma placa contendo meio M2 e posteriormente cultivados em meio M16 por 72 horas em atmosfera contendo 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂ numa temperatura de 37° C. A taxa de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto eclodido foi verificada por meio do confronto de dados em tabela de contingência, utilizando-se o teste do qui-quadrado ao nível de 5% de probabilidade. As taxas de eclosão foram 62,1%^a (41/66) - T1, 54,4%^{a,b} (20/37) - T2, 42,5%^{b,c} (20/47) - T3, 54,6%^{a,c,d,e} (30/55) - T4, 56,8%^{a,c} (25/44) - T5, 64,7%^a (33/51) - T6, 47,4%^{b,d} (18/38) - T7, 35,6%^{b,e,f} (21/59) - T8 e 19,0%^f (8/42) - T9. Os resultados permitem concluir que, de forma geral, embriões de linhagens transgênicas apresentam menor taxa de desenvolvimento *In vitro*, contudo, os fatores envolvidos nessa redução ainda carecem de esclarecimentos.

USO DO CÁLCIO IONÓFORO NA CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA PARA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES TRANSGÊNICOS EM BOVINOS

Simões, R.; Binelli, M.; Mendes, C.M.; Coutinho, A.R.S.; Feitosa, W.B.; Braga, F.A.;
Visintin, J.A.; Assumpção, M.E.O.A

Departamento de Reprodução Animal – FMVZ – USP, São Paulo-SP, Brasil - resimoes@usp.br

A produção *in vitro* de embriões transgênicos é realizada em camundongos pela microinjeção de DNA em pronúcleos, mas em bovinos, devido a grande quantidade de lipídeos, essa técnica torna-se inviável. O uso de espermatozóides como vetores de DNA tem sido uma alternativa para a produção *in vitro* (PIV) de embriões transgênicos, contornando as dificuldades da microinjeção. Uma forma para inserir o DNA exógeno no oócito é carregá-lo em espermatozóides capacitados com cálcio ionóforo (CaI). O objetivo deste estudo foi avaliar diferentes concentrações ([CaI]) e tempos (tCa) de CaI na capacitação espermática, assim como diferentes tempos de incubação dos espermatozóides capacitados com DNA (tDNA) (EYFP, Clontech, USA) para definir um protocolo eficiente na PIV de embriões transgênicos. Folículos de ovários de matadouro foram maturados *in vitro* no meio TCM199 + 10%SFB +FSH + HCG + E² + piruvato e gentamicina à 39°C, 5%CO₂ em ar e alta umidade, por 24hs. Após separação por gradiente Percoll (45/90%) a 600g por 30min, os espermatozóides foram lavados no meio Talp sêmen por centrifugação a 200g/5 minutos. Do sedimento, 5x10⁶espermatozóides foram capacitados com 250nM ou 500nM de CaI por 1 ou 5 minutos e incubados com DNA por 1 ou 2 horas. Os espermatozóides não tratados foram utilizados como grupo controle. Foram utilizadas 1x10⁵espermatozóides para inseminar 20 oócitos maduros/microgota por 18hs. Os presumíveis zigotos foram co-cultivados em meio SOFaa com monocamada de células da granulosa a 39°C, alta umidade e 5%CO₂ em ar. Os índices de blastocisto (%BL) foram analisados por ANOVA. As variáveis independentes foram replicações, [Ca], tCa, tDNA e as interações duplas e tripla das últimas três variáveis e, quando apropriado, as médias foram comparadas por contrastes ortogonais. Houve interação [Ca] x tCa x tDNA para %BL (p<0,02). Os tratamentos 250nM, 5min, 1h ou 500nM, 1min, 1h apresentaram %BL, respectivamente, de 36,1% e 37,4%, não diferindo do controle (30,5%, p>0,4). Em conclusão, estes resultados demonstraram que é possível utilizar espermatozóides capacitados com CaI para produzir embriões transgênicos, sem alterar os índices de blastocistos.

Suporte financeiro FAPESP 03/08542-5 e 03/07456-8

UTILIZAÇÃO DA TRANSFERÊNCIA PRONUCLEAR PARA ESTUDO DA INTERAÇÃO NÚCLEO-CITOPLASMA ENTRE OÓCITOS BOVINOS FECUNDADOS E ATIVADOS COM ESTRÔNCIO

Méo, S.C.^{1,2}; Ferreira, C.R.²; Perecin, F.²; Yamazaki, W.²; Leal, C.L.V.³; Meirelles, F.V.³; Garcia, J.M.²

¹Centro de Genética e Reprodução - Instituto de Zootecnia, APTA/SAA, Nova Odessa-SP, 13460-000, Brasil; ²Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal - FCAV/UNESP, Jaboticabal-SP, 14884-900, Brasil; ³Departamento de Ciências Básicas – FZEA/USP, Pirassununga-SP, 13635-900, Brasil. simone@iz.sp.gov.br

Nos animais domésticos, a busca por melhores índices produtivos e disseminação de material genético superior tem permitido o desenvolvimento de diversas biotecnologias da reprodução, como a produção *in vitro* de embriões e a clonagem. O sucesso da clonagem está na habilidade do citoplasma do oócito receptor em induzir a reprogramação de uma célula adulta para originar um novo indivíduo. Neste trabalho, visamos à melhor compreensão dos eventos de reprogramação nuclear e dos efeitos da interação núcleo-citoplasma sobre o desenvolvimento embrionário pré-implantação. Para isso, oócitos bovinos maturados *in vitro* por 24 h em TCM199 com 10% SFB, piruvato e hormônios foram fecundados (FIV) ou ativados artificialmente com ionomicina (5 µM por 5 min) e estrônio (20 mM por 6 h; IS) e, após 24-30 h, submetidos à transferência pronuclear (TP). Para a visualização dos pronúcleos, os zigotos foram centrifugados a 15.000 xg por 15 min. Os resultados foram analisados pelo teste de Qui-quadrado (p=0,05). Embriões IS e Controle micromanipulado IS (TP-IS; submetidos à remoção e transferência do pronúcleo no mesmo embrião ativado) apresentaram taxas similares de clivagem (77,9 e 73,6%) e de desenvolvimento até blastocisto (7,8 e 7,3%). Por outro lado, as taxas de clivagem e de desenvolvimento dos embriões FIV (69,6 e 21,7%) foram superiores às taxas do Controle FIV micromanipulado (TP-FIV; submetidos à remoção e transferência do pronúcleo no mesmo embrião FIV; 56,2 e 2,2%), evidenciado impacto negativo da técnica de TP nos embriões FIV em comparação aos IS. A clivagem e o desenvolvimento dos embriões reconstruídos com citoplasma FIV e núcleo IS (CFNS = 59,8 e 1,4%, respectivamente) e com citoplasma IS e núcleo FIV (CSNF = 51,2 e 1,6%) foram semelhantes aos TP-FIV, mas inferiores aos TP-IS, reforçando a observação de dificuldade na transferência pronuclear em embriões FIV. Quando comparados entre si, os embriões CFNS e CSNF apresentaram taxas semelhantes de clivagem e de desenvolvimento até blastocisto, indicando que tanto o citoplasma FIV foi capaz de dar suporte ao desenvolvimento do núcleo IS, quanto o citoplasma IS em dar suporte ao núcleo FIV. No entanto, apesar de ambos terem sido influenciados pela técnica, foram observados indícios de incompatibilidade núcleo-citoplasma, pelo menos nas fases iniciais de desenvolvimento embrionário, visto que a taxa de clivagem nos embriões CFNS tendeu a ser maior (p=0,051) que nos embriões CSNF. Dessa maneira, conclui-se que a técnica de transferência pronuclear pode ser utilizada como ferramenta para avaliação da interação núcleo-citoplasma e, para tanto, ela dever ser aperfeiçoada, principalmente, nos embriões FIV a fim de que não haja interferência da técnica sobre o desenvolvimento dos embriões reconstituídos.

Apoio financeiro FAPESP 02/00971-1.

AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE ZIGOTOS MURINOS EXPOSTOS *IN VITRO* A *Brucella abortus* PARA ESTABELECIMENTO DE UM MODELO EXPERIMENTAL EM ESTUDOS DE INTERAÇÃO EMBRIÃO-PATÓGENOS

Galuppo, A.G.; D'Angelo, M.; Miyashiro, S.; Pinheiro, E.S.; Senedezi, M.L.P.; Melo, G.M.

Centro de Sanidade Animal-Instituto Biológico de São Paulo, São Paulo-SP, CEP04014-002, Brasil
andrea_giannotti@hotmail.com

Do ponto de vista epidemiológico, novas tecnologias representam um desafio para o controle da transmissão de doenças, pois criam possibilidades para a disseminação de patógenos. São de interesse os agentes infecciosos associados com tecidos ovarianos, tubáricos e uterinos, o que levou a preocupação da possibilidade de transmissão da *Brucella abortus* por procedimentos de reprodução animal. Os objetivos desse trabalho foram avaliar *in vitro* a sensibilidade de zigotos murinos a *Brucella abortus*, e a eficácia das lavagens sequenciais e do tratamento com tripsina, na sua remoção e/ou inativação, a fim de estabelecer um modelo acessível para o estudo de interações embriões-patógenos. Para a coleta dos zigotos foram utilizados camundongas (Swiss Webster), 6-8 semanas, acasaladas com machos inteiros, após superestimulação ovariana. A suspensão de *B.abortus* foi preparada no momento da inoculação, na diluição de 10^6 bactérias/ml. Os zigotos foram separados em controle e infectados (30 μ l da suspensão de bactérias), mantidos em HTF (CULTILAB[®]-Campinas, SP), com 10% SFB. Morfologia e viabilidade foram analisadas após 24h e 96h. A lavagem sequencial e o tratamento com tripsina foram realizados após 24h. Para detecção da bactéria após as lavagens foram utilizados os testes de cultura e reação em cadeia pela polimerase (PCR). Uma amostra da última gota de lavagem de cada grupo também foi testada. A análise estatística foi feita com o χ^2 . No grupo controle não foram verificadas alterações morfológicas, já no infectado, foi possível verificar a presença de blastômeros irregulares, falha de divisão, citoplasma com granulação e aspecto degenerativo. As taxas de clivagem foram de 77,4% (controle) e 59,2% (infectados) (χ^2 de 0,001674; $p < 0,05$) após 24h e após 96h 14,5% (controle) e 7% (infectados) (χ^2 de 0,141616; $p < 0,05$). Não foi possível isolar *B.abortus* em cultura após os procedimentos de lavagem. As amostras do grupo controle apresentaram-se negativas na PCR. Já no grupo infectado foram obtidos resultados positivos e negativos, respectivamente, para os embriões e para a última gota de lavagem dos grupos submetidos a lavagem sequencial. Foi verificada em uma amostra a presença de embriões positivos, com última gota de lavagem negativa. Para outras duas amostras os embriões apresentaram-se livres de *B.abortus*, com última gota de lavagem positiva. Apenas em uma amostra foram obtidos resultados negativos tanto para os embriões, quanto para o meio de lavagem. Os resultados da PCR para os grupos infectados tratados com tripsina foram positivos para todas as amostras, contendo embriões ou apenas da alíquota da última gota de lavagem, com exceção de uma amostra que apresentou embriões negativos. Nossos resultados sugerem que os embriões murinos sejam sensíveis a *Brucella abortus*. As novas tecnologias desenvolvidas em reprodução animal promovem manipulação invasiva do embrião. Portanto, tratamentos preconizados para a remoção de patógenos podem não ser eficazes. O risco a ser considerado é da presença de patógenos associados à zona pelúcida ou nas proximidades, que possam ser introduzidos, ou ter sua entrada facilitada no embrião. Considerando os dados apresentados, torna-se clara a importância do desenvolvimento de um modelo para estudos de interações embrião-patógenos, a fim de se evitar a disseminação de doenças. *Suporte financeiro*: CULTILAB

CARACTERIZAÇÃO DA REGIÃO DOS TOPOS DOS VILOS MATERNOS E BASE DOS VILOS FETAIS DE BOVINOS ZEBÚ (*Bos indicus* - LINNAEUS, 1758)

Pereira, F.T.V.¹; Cazerta, S.M.M.¹; Miglino, M.A.²; Braga, F.C.^{2,3}; Meirelles, F.V.³;
Assis Neto, A.C.¹; Marques, R.S.¹; Vulcano, M.

¹Faculdade de Zootecnia do Campus de Dracena-UNESP, Dracena-SP, 17900-000, Brasil.

²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP (FMVZ-USP/SP), São Paulo-SP, Brasil.

³Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP (FZEA-USP), Pirassununga-SP, Brasil.

fverechia@dracena.unesp.br

A região específica do topo dos vilos maternos e base dos vilos fetais de bovinos não foi muito estudada, e corresponde à zona arcada do placentônio de ovinos, onde há áreas com extravasamento de sangue (área hemófaga) e áreas desprovidas desse processo, o qual é realizado pelo trofoblasto. É possível que este hematoma seja resultado da abertura dos capilares maternos no topo dos septos intervilosos do trofoblasto adjacente e apresenta a função de suprir a necessidade de ferro para o feto. Vários estudos têm demonstrado que a deficiência de ferro durante a gestação resultam em problemas a longo prazo no recém-nascido, como por exemplo aumento na pressão sanguínea, diminuição da função cerebral e comprometimento do desenvolvimento do sistema imune. Sendo assim, o objetivo deste trabalho é o de caracterizar a área hemófaga presente na interface materno-fetal de bovinos. Para este estudo foram utilizados placentônios de 30 vacas zebuínas coletadas em frigoríficos nos períodos de 4 a 8 meses de gestação, fixados por perfusão com solução aquosa de formoldeído a 10% e paraformoldeído a 4% em PBS pH 7,4 0,1 M, os quais foram processados e corados para microscopia de luz (H&E, picrosírius, tricromo de Masson e reações histoquímicas (PAS, Perls) para observar as atividades celulares relacionadas à absorção, transporte de moléculas e presença de secreções. A interface materno-fetal em bovinos é constituída pelo trofoblasto (parte fetal) e pelo epitélio uterino (parte materna). O trofoblasto é constituído por uma camada única e apresenta duas populações celulares distintas, as células epiteliais e as células uni ou multinucleadas, sendo as binucleadas o tipo mais comum. Já o epitélio uterino é constituído por epitélio do tipo cúbico. Nas amostras coletadas a partir dos 6 meses de prenhez, detectamos o acúmulo ocasional de sangue materno extravasado na interface materno-fetal com conseqüente eritrofagocitose trofoblástica. Seu aspecto permaneceu semelhante em todas as fases, demonstrando grande variação morfológica microscópica. Quando presentes estes hematomas estavam localizados principalmente no ápice dos vilos maternos, o que correspondia à base dos vilos coriônicos. As células trofoblásticas apresentavam hemácias em seu interior, sugerindo uma possível transferência de ferro para o feto. As células trofoblásticas binucleadas não foram visualizadas realizando fagocitose. Acredita-se que o feto utilize esse íon extravasado da mãe para sua hematopoiese. No sangue extravasado do hematoma foram observados também debris celulares e prováveis células em apoptose. Na região dos hematomas, foram observados vesículas e grânulos nas células trofoblásticas. Os resultados obtidos através da microscopia de luz indicaram que essas áreas hemófagas da interface materno-fetal de bovinos são sítios muito importantes de transferência de ferro, e podem estar envolvidos na regulação da hematopoiese fetal. Esses dados podem ser transferidos para placenta de bovinos manipulados em laboratório como forma de auxílio na detecção de tantas perdas gestacionais e alterações placentárias. Apoio: FAPESP e FUNDUNESP

CARACTERIZAÇÃO DA REGIÃO INTERCARUNCULAR DE VACAS ZEBÚ PRENHES (*Bos indicus* – Linnaeus, 1758).

Marques, R.S.¹; Miglino, M.A.²; Braga, F.C.^{2,3}; Meirelles, F.V.³; Assis Neto, A.C.¹; Vulcano, M.¹; Cazerta, S.M.M.¹; Pereira, F.T.V.¹

¹Faculdade de Zootecnia do Campus de Dracena-UNESP, Dracena-SP, 17900-000, Brasil.

²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP (FMVZ-USP/SP), São Paulo-SP, Brasil.

³Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP (FZEA-USP), Pirassununga-SP, Brasil.
rodrigomarques@dracena.unesp.br

A placentação em ruminantes refere-se à junção do cório com o epitélio uterino, resultando na placenta funcional e nos placentônios, que são as unidades morfofuncionais. Na superfície do útero dos ruminantes, existem projeções não glandulares denominadas carúnculas, que juntamente com as vilosidades coriônicas, dão origem aos placentônios. As regiões entre essas carúnculas são chamadas de intercarunculares e são compostas pelo perimétrio, miométrio e endométrio, que apresenta uma estrutura glandular representando um papel importante no ciclo estral e na preparação do útero para a implantação do blastocisto. Levando em consideração que tais glândulas desempenham também a função de transporte de ferro e outras substâncias da mãe para o feto, este trabalho tem objetivo de fornecer informações sobre o desenvolvimento das regiões intercarunculares da placenta de bovinos ao longo de toda prenhez, e aplicá-las em pesquisas de biotecnologia ligadas a Reprodução Animal. Para a realização deste trabalho foram utilizadas regiões intercarunculares de úteros gestantes de 55 vacas zebuínas coletados em frigoríficos nos períodos de 4 a 8 meses de gestação. As regiões intercarunculares foram recortadas e fixadas com solução aquosa de formaldeído a 10% e paraformaldeído a 4%, em PBS (pH 7,4 a 0,1M), processadas e coradas para microscopia de luz (hematoxilina-eosina, tricromo de Masson, picrosírius) e histoquímica (reação de Perls e PAS). Os resultados obtidos mostraram que a região intercaruncular está situada entre as carúnculas uterinas tanto no útero não-gestante quanto no gestante, as quais apresentaram-se muito desenvolvidas neste último. As carúnculas são áreas de intercâmbio materno e fetal e apresentam macroscopicamente em toda superfície criptas com aspecto de “favo de mel”, entretanto, com o progredir da gestação apresentam-se maiores no corno uterino gestante do que no corno não gestante, podendo ocorrer fusões de carúnculas vizinhas para se tornarem maiores e juntamente com a conexão dos vilos coriônicos, levam à formação dos placentônios. As áreas intercarunculares são compostas por endométrio, constituído por epitélio simples cúbico a simples colunar alto, a lâmina própria (submucosa) composta por tecido conjuntivo denso, o miométrio composto pela camada circular interna e externa de músculo liso e o perimétrio, camada serosa com a presença de muitos vasos sanguíneos. As glândulas endometriais são constituídas por epitélio colunar simples e são encontradas no estroma endometrial em maior quantidade, mas podem avançar até o miométrio e com o progredir da gestação aumentam visualmente de tamanho e número e são importantes áreas de transferência de substâncias da mãe para o feto. Na luz destas glândulas havia debris celulares e secreções mucóides PAS positivas. O estroma endometrial apresentou um considerável número de fibroblastos e vasos sanguíneos que aumentaram com o progresso da prenhez e logo abaixo do endométrio visualizamos o miométrio composto de fibras musculares lisas. De acordo com a metodologia utilizada concluiu-se que as glândulas endometriais são importantes sítios de secreção e passagem de substâncias da mãe implicadas na nutrição do feto de bovinos. Apoio: CNPq PIBIC

**ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO DA REGIÃO DOS TOPOS DOS VILOS MATERNS E
BASE DOS VILOS FETAIS DE PLACENTAS DE BÚFALAS (*Bubalus bubalis bubalis* -
Simpson, 1945)**

Burioli, K.C.¹; Miglino, M.A.²; Braga, F.C.²; Bazer, F.W.³; Kfoury Jr.; J.R.²; Oliveira, L.J.²; Papa, P.C.²; Oloris, S.C.S.²; Dagli, M.L.Z.²; Carvalho, A.F.⁴; Pereira, F.T.V.¹

¹Faculdade de Zootecnia da UNESP - *Campus* Dracena-, Dracena-SP, 17900-000, Brasil. ²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia of USP (FMVZ-USP/SP), Sao Paulo-SP, Brasil. ³Texas A&M University, EUA. ⁴UNIFEOB, São João da Boa Vista, São Paulo, Brasil.

kburioli@yahoo.com.br

O transporte transplacentário de ferro pela uteroferrina (Uf), e as áreas hemófagas da placenta de búfala foram analisados para esclarecer esse mecanismo de extravasamento de sangue na interface materno-fetal (áreas hemófagas) com conseqüente transferência de ferro para o feto através da eritrofagocitose trofoblástica (Murai; Yamauchi, 1986). Na placenta de búfalas esse mecanismo continua obscuro e a uteroferrina é muito importante nesse processo porque é um transportador de ferro e um fator de crescimento hematopoiético induzido pela progesterona. Nosso objetivo foi o de caracterizar essas áreas hemófagas da placenta de búfalos, focalizando a transferência de ferro materno-fetal, devido ao fato de que a provisão adequada da nutrição para o feto é a chave para uma gestação bem sucedida. Amostras dos placentônios de búfalas (*Bubalus bubalis bubalis*, n=51) em todos os períodos de gestação foram fixadas em formoldeído a 10% e paraformoldeído a 4% em PBS, processadas e coradas para microscopia de luz para caracterizar as áreas hemófagas morfológicamente e para imunoistoquímica com o anticorpo anti-uteroferrina para confirmar a transferência de ferro transplacentário. As áreas hemófagas estavam presentes em placentônios a partir dos 4 até os 10 meses de gestação e foram caracterizadas ao microscópio de luz como sendo áreas de extravasamento de sangue pontual entre o epitélio uterino e o trofoblástico, por uma erosão dos capilares maternos. A reação imunoistoquímica com o anticorpo anti-uteroferrina foi positiva no trofoblasto, principalmente em determinadas regiões da interface materno-fetal onde o sangue extravasado ficava em contato direto com o epitélio trofoblástico, e, em outros pontos mais profundos no placentônio. Os resultados obtidos pela imunoistoquímica com o anticorpo específico provaram que as áreas hemófagas do placentônio são sítios muito importantes para transferência de substâncias transplacentárias envolvidas na nutrição histiotrófica de fetos bubalinos.

Apoio: FAPESP e Fundunesp

EFEITO DO CO-TRATAMENTO COM INIBIDORES SELETIVOS DE COX-1 E 2 SOBRE IMPLANTES UTERINOS FETAIS.

Tomé, A.R.¹; Lima-Júnior, R.C.P.²; Cunha, K.M.A.²; Santos, F.A.²; Rao, V.S.N.²

¹Faculdade de Veterinária -UECe Fortaleza-CE, Brasil. ²Departamento de Fisiologia e Farmacologia – UFC, Fortaleza-CE, Brasil. adrtome@yahoo.com.br

A enzima Cicloxigenase-1 (COX-1), uma enzima constitutiva, atua regulando as diversas funções homeostáticas no organismo. A enzima Cicloxigenase-2 (COX-2), contudo, é uma forma induzível por diferentes estímulos como, por exemplo, citocinas e fatores de crescimento, além de regular processos como a inflamação e angiogênese. Ovulação e implantação são consideradas análogas de respostas pró-inflamatórias. Deste modo, o trabalho objetivou avaliar o efeito de inibidores seletivos de COX-1 e 2 na fase de implantação de blastocistos em ratos grávidas. Ratos fêmeas (n=6), Wistar, foram dispostas em caixas de polietileno com ratos machos (2:1) e 14 h após foi coletado fluido vaginal para comprovação da prenhez (atestada pela presença de espermatozóides, sendo determinado o 1º dia de gravidez). Nos dias 4, 5 e 6 os animais foram tratados oralmente com veículo (água destilada), indometacina (IND 5 mg/kg – PRODOME, Campinas-SP, Brasil), rofecoxibe (ROF 5 mg/kg – Merck, São Paulo-SP, Brasil), IND (2,5 mg/kg) + ROF (2,5 mg/kg) ou IND (5 mg/kg) + ROF (5 mg/kg), com intervalos de 30 min no caso de co-tratamento. No dia 10, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, os cornos uterinos expostos e contados o número de implantações e de corpos lúteos. A significância estatística ($p < 0,05$) foi analisada com ANOVA seguida de Student-Newman Keuls como pós-teste. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Os resultados indicam que o tratamento dos animais com indometacina 5 mg/kg + rofecoxibe 5 mg/kg teve uma redução significativa ($p < 0,001$) no número de implantações ($0,0 \pm 0,0$) quando comparado com o grupo controle normal ($9,0 \pm 1,34$). Além disso, houve uma elevação significativa ($p < 0,05$) no número de corpos lúteos dos mesmos animais ($16,83 \pm 1,95$) comparado ao grupo controle normal ($12,2 \pm 0,8$). Em conclusão, o co-tratamento de ratos grávidos com indometacina e rofecoxibe em altas doses é capaz de promover reabsorções totais em sítios de implantação uterinos, mesmo ocorrendo ovulação normal, caracterizada pela presença de corpos lúteos.

Apoio: CAPES/CNPq

MEROANENCEFALIA E GASTROSKUISE BOVINA: UM ESTUDO MACROSCÓPICO E MICROSCÓPICO UTILIZANDO MISCOSCOPIA DE LUZ TRANSMITIDA

Alberto, M.L.V.¹; Matsumoto, F.S.¹; Assis Neto, A.C.¹; Santos, J.M.²;
Miglino, M.A.¹; Ambrósio, C.E.¹

¹Departamento de Veterinária e Cirurgia (Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) – FMVZ/USP, São Paulo-SP, 05508-270, Brasil. ²Faculdade de Medicina do ABC / Universidade Anhembimorumbi, São Paulo-SP, 04546-000, Brasil. miryan.bio@ig.com.br

A presença das malformações congênitas corresponde a uma das principais causas para a perda embrionária durante o processo gestacional, são resultantes da interação de vários fatores como herança multifatorial, alterações cromossômicas e gênicas e agentes ambientais, podendo ainda apresentar etiologia desconhecida. Fatores ambientais e nutricionais estão diretamente relacionados com defeitos do tubo neural, desempenhando papel importante para ao aparecimento de malformações congênitas do sistema nervoso central, entre as quais destacamos a meroanencefalia onde o neuroectoderma é afetado, resultando na ausência de fusões das pregas neurais e não fechamento do neuroporo rostral e como consequência, alterações significantes no encéfalo, sendo que o mesmo fica exposto na maioria dos casos. Já a gastrosquise trata-se de um defeito congênito da parede abdominal ventral, ocorrendo extrusão das vísceras abdominais sem envolver o cordão umbilical, sendo que sua etiologia pode estar relacionada com exposição a drogas e substâncias químicas ambientais. No presente estudo, utilizamos 10 embriões provenientes de abatedouro para descrição macroscópica e microscópica, por microscopia de luz transmitida. Em nossos achados, podemos constatar a presença de uma massa de tecido encefálico na região cranial dorsal dos embriões, resultante da não formação de parte da calota craniana e não fechamento por completo do neuroporo cefálico. Quanto à região abdominal, observamos que não ocorreu fusão completa das pregas laterais do corpo durante a formação da parede abdominal e o fígado apresentou-se projetado para o exterior.

TIPIFICAÇÃO CITOLÓGICA DO LÍQUIDO AMNIÓTICO DE BEZERROS ORIUNDOS DE PIV E FECUNDAÇÃO NATURAL NO MOMENTO DO PARTO

Moya, C.F.¹; Prestes, N.C.¹; Piagentini, M.¹; Rocha, N.S.²

¹Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária e ²Departamento de Clínica Veterinária da FMVZ/UNESP, Botucatu-SP, 18618-000, Brasil. carlafredrichsen@yahoo.com.br

A proposta do presente trabalho foi descrever as possíveis diferenças no padrão citológico do fluido fetal, no momento do parto, comparando os resultados obtidos de bezerros nelores oriundos de fertilização *in vitro* em relação aos nascidos de inseminação artificial. Foram utilizados 40 animais, divididos em grupo 01: vinte receptoras de embrião oriundo de PIV e grupo 02: vinte vacas nelores gestando bezerros oriundos de fecundação natural. Os animais eram mantidos em pasto natural recebendo sal mineral, próximo ao parto foram transferidos para o piquete maternidade com suplementação de silagem de milho e ração, nas propriedades rurais da região de Avaré. Todos os partos foram acompanhados. Durante a fase de expulsão e após a ruptura do alantocóion realizou-se a punção do âmion para colheita de 20ml de líquido, que foi depositado em tubo plástico e congelado em freezer (-18°C). As amostras, pós-descongelamento, foram centrifugadas a 4000rpm durante seis minutos (Revan® Centrifuga Ciclo Cito), no Departamento de Patologia Veterinária da FMVZ/UNESP – Botucatu. Depois da obtenção deste material sobre as lâminas empregou-se a técnica de coloração Hematoxilina – Shorr (Arruda *et al.*, 1976; modificado por Oliveira *et al.*, 2000). Ao final deste procedimento, as lâminas foram montadas e observadas em microscopia óptica para classificação dos tipos celulares (morfologia). A tipificação citológica foi baseada na afinidade tintorial das células. A classificação celular baseou-se no estágio de maturação. As células basais e parabasais não foram encontradas nas lâminas das amostras de líquido amniótico analisadas. As células intermediárias pequenas (CIP) mostraram-se de forma ovalada ou poligonal com citoplasma grande e núcleo central. As células intermediárias grandes (CIG) apresentavam núcleo central e relação núcleo citoplasma maior em relação às células superficiais. Estas foram as maiores células encontradas, exibindo queratinização, com bordas angulares, possuindo núcleo picnótico (CSN) e núcleo ausente (escamas) CSA. As porcentagens, em média, de cada grupo celular foram: grupo 01 CIP (1,9%), CIG (7,1%), CSN (33,5%) e CSA (58,0%) e no grupo 02 CIP (2,9%), CIG (6,8%), CSN (30,6%) e CSA (60,0%). A discussão dos achados foi dificultada, pois não há relato em bovinos empregando a mesma técnica. Encontrou-se referência onde há classificação das células do líquido amniótico em ovinos pela coloração Azul do Nilo (Souza *et al.*, 2000). A coloração Hematoxilina-Shorr é bastante empregada na medicina humana para caracterizar a maturidade epidérmica de fetos nas últimas semanas de gestação (Cunha *et al.*, 1978). Os valores médios encontrados em ambos grupos deste experimento foram semelhantes para os quatro tipos celulares.

ANÁLISE BIOQUÍMICA DO LÍQUIDO AMNIÓTICO DE BEZERROS NELORE ORIUNDOS DE PIV E FECUNDAÇÃO NATURAL COLHIDOS NO MOMENTO DO PARTO

Piagentini, M.¹; Prestes, N.C.¹; Moya, C.F.¹; Barretos, C.S.¹; Lucidi, C.A.²; Takahira, R.K.²

¹ Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária e

² Departamento de Clínica Veterinária - FMVZ/UNESP, Botucatu-SP, 18618-000, Brasil.

nereu@fmvz.unesp.br

Este trabalho tem como objetivo, avaliar a composição bioquímica dos fluídos fetais de bezerros oriundos de produção *in vitro* (PIV) e inseminação artificial (IA), visando correlacionar as possíveis alterações com as perdas neonatais na PIV. Utilizaram-se 40 animais. O grupo 01: vinte vacas ou novilhas (Nelore) com bezerros oriundos de fecundação natural (IA) e o grupo 02: vinte receptoras gestando bezerros de PIV, alimentadas de pasto natural e sal mineral, recebendo próximo ao parto no piquete maternidade suplementação de silagem de milho e ração, em propriedades rurais da região de Avaré. Todos os partos foram acompanhados. Durante a fase de expulsão e após a ruptura do alantocórion, realizou-se a punção da bolsa amniótica para colheita de 20ml de líquido. As amostras foram armazenadas em tubo plástico e congeladas em freezer (-18°C). As análises foram realizadas por meio de kits bioquímicos comerciais. Os valores médios obtidos foram: grupo 01 uréia (45,8mg/dl), creatinina (8,47mg/dl), glicose (6,75mg/dl), proteína total (0,44g/dl), gama GT (33,90UI/l), cloreto (81,41mmol/l), sódio (82,17mmol/l) e potássio (7,35 mmol/l) e no grupo 02 uréia (44,1mg/dl), creatinina (8,44mg/dl), glicose (5,30g/dl), proteína total (0,39g/dl), gama GT (36,50UI/l), cloreto (81,45 mmol/l), sódio (115,5mmol/l) e potássio (6,3mmol/l), respectivamente. Os valores, tanto do grupo 01 quanto do grupo 02, de uréia creatinina e glicose são muito discrepantes quando comparados aos dados obtidos por Li et al. (2005), já os valores de proteína total, cloreto, sódio e potássio são mais condizentes com os dados do mesmo grupo de pesquisa. Baetz et al. (1976) obtiveram resultados próximos aos do grupo 01 com relação aos parâmetros analisados. Em relação à gama GT não foi encontrado nenhum dado em bovino, mas há um trabalho em ovinos (Prestes et al., 2000), cujo valor do parâmetro citado é praticamente a metade do encontrado neste trabalho. Neste experimento, os grupo 01 e grupo 02 apresentaram valores médios semelhantes em todos os parâmetros avaliados.

IDENTIFICAÇÃO PRECOCE DO SEXO FETAL E DETERMINAÇÃO DO DIA DA MIGRAÇÃO DO TUBÉRCULO GENITAL EM CABRAS LEITEIRAS UTILIZANDO ULTRA-SOM

Oliveira, M.A.L.¹; Santos, M.H.B.²; Moraes, E.P.B.X.²; Moura, R.T.D.²; Chiamenti, A.²;
Rabelo, M.C.²; Bezerra, F.Q.G.³; Lima, P.F.¹

¹Departamento de Medicina Veterinária/UFRPE - maloufrpe@uol.com.br ²Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária/UFRPE ³Curso de Graduação em Medicina Veterinária/UFRPE

O objetivo deste estudo foi identificar precocemente o sexo fetal e determinar o dia da migração do tubérculo genital (TG) através da ultra-sonografia em tempo real de cabras das raças Saanen (n=56) e Alpina Americana (n = 82). Em todos os experimentos (EI, EII, EIII, EIV), conduzidos em diferentes períodos e propriedades, a determinação do sexo foi efetuada levando-se em consideração a localização do TG e a identificação do pênis, prepúcio, bolsa escrotal tetas e vulva. Os exames foram realizados com ultra-som (240 Parus – Pie Medical) equipado com um transdutor linear (6, 0 e 8,0 MHz) utilizado por via transretal. No EI, as fêmeas da raça Alpina Americana (n = 24) com gestação entre 45 e 70 dias foram submetidas a exame único. No EII, as fêmeas da raça Alpina Americana (n = 32) foram monitoradas em intervalos de 12 horas, do 39º ao 57º dia de gestação. No EIII, as fêmeas da raça Saanen (n = 36), com idade gestacional entre 47 e 77 dias, foram examinadas apenas uma vez. No EIV, as fêmeas da raça Saanen (n = 46) foram submetidas a exames em intervalos de 48 horas, do 40º ao 58º dia da gestação. No EI, a acurácia da sexagem foi de 85,7% (12/14) nas gestações simples e de 80,0% (16/20) nas duplas, não sendo observada diferença ($P > 0,05$) entre gestação simples e dupla. No EII, a acurácia foi de 100% (14/14) nas gestações simples, 87,5% (28/32) nas duplas e 66,7% (4/6) nas tríplexes, sendo registrada diferença ($P \leq 0,05$) entre as gestações simples e tríplexes. No EIII, a acurácia foi também de 100% (24/24) nas gestações simples, 72,7% (16/22) nas duplas e 66,7% (2/3) nas tríplexes. A acurácia da sexagem na gestação simples foi maior ($P = 0,05$) do que nas gestações dupla e tríplexes. No EIV, a acurácia foi de 100% (20/20) nas gestações simples, 80,9% (34/42) nas duplas, 66,7% (8/12) nas tríplexes e 50,0% (2/4) nas quádruplas. A acurácia nas gestações simples foi maior ($P \leq 0,05$) do que nas duplas, tríplexes e quádruplas, não havendo diferença entre as demais. A acurácia total foi de 86,6% (26/34) no EI, 88,5% (46/52) no EII, 85,7% (42/49) no EIII e 82,0% (64/78) no EIV, não havendo diferença ($P > 0,05$) entre os experimentos. Nos fetos da raça Alpina Americana, a migração do TG ocorreu no $46,4 \pm 2,1$ dia e nos da raça Saanen no dia $48,9 \pm 1,8$ dia. Os resultados permitem concluir que a ultra-sonografia em tempo real é um método eficiente para identificar previamente o sexo do feto e determinar o dia da migração do TG, bem como que os exames ultra-sonográficos repetidos nem sempre aumentam a acurácia da sexagem fetal.

QUANTIFICAÇÃO DO CONTEÚDO PROTÉICO DE LAVADOS UTERINOS OBTIDOS EM DIFERENTES DIAS DO CICLO ESTRAL EM BOVINOS

Freire, A.F.¹; Lima, M.C.²; Hucke, E.E.T.S.³; Marques, V.B.²; Miglino, M.A.²; Binelli, M.¹

¹ Departamento de Reprodução Animal - Av. Duque de Caxias Norte, 225 - FMVZ/USP - Pirassununga, SP, CEP 13635-900, Brasil. - anfvvet@usp.br

² Departamento de Cirurgia –Setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres - Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87 –FMVZ/USP, São Paulo -SP, CEP 05508-900, Brasil.

³ Laboratório de Fisiologia e Farmacologia - Faculdade de Medicina Veterinária – UNIFEOB, São João da Boa Vista-SP, CEP 13874-148, Brasil.

Em bovinos, durante o “período crítico” para o estabelecimento da gestação (dias 15 a 19 após o estro), ocorre o bloqueio da luteólise em consequência de um diálogo bioquímico entre o conceito e o endométrio. Falhas na comunicação materno-fetal resultam em taxas de mortalidade embrionária em torno de 30%, repercutindo negativamente na lucratividade das operações pecuárias. O sucesso da gestação depende da secreção de proteínas pelo conceito e pelo endométrio. Para o entendimento dos mecanismos parácrinos associados à manutenção da gestação é necessária a obtenção e caracterização de tais proteínas. O objetivo do presente trabalho foi obter lavados uterinos ao longo do ciclo estral em vacas para posterior avaliação (1) da taxa de recuperação do líquido infundido para realização dos lavados, (2) da frequência de ocorrência de lavados purulentos e (3) quantificação da concentração protéica dos lavados. O comportamento de estro foi observado diariamente em onze vacas holandesas, vazias, secas e múltiparas. Utilizando-se uma sonda de Foley posicionada transcervicalmente, obtiveram-se lavados uterinos do dia do estro até o dia 23 do ciclo. Para cada dia do ciclo estral foram coletados três lavados uterinos, de vacas distintas, alternando-se os onze animais. Lavados uterinos consecutivos em um mesmo animal só foram realizados após intervalo mínimo de cinco dias. Cada lavado foi realizado com 500mL de solução de Ringer simples. O volume recuperado e a aparência dos lavados uterinos foram registrados e a concentração de proteínas totais presentes nos lavados uterinos foi quantificada pelo método de Bradford. As taxas de recuperação [(volume recuperado/volume infundido) x 100] e as concentrações de proteína foram analisadas por ANOVA. As taxas de recuperação variaram de 77 (D6) a 99,7±6,7% (D7), contudo, não houve efeito de dia do ciclo estral (P>0,1). De um total de 85 lavados uterinos obtidos, 9,44% apresentaram-se purulentos. Não houve efeito de vaca ou dia do ciclo estral (P>0,1) na concentração protéica dos lavados uterinos. A concentração média foi 245,69±30,02µg/mL e a quantidade total média foi 122,8mg de proteína por lavado. Concluiu-se que foi possível formar um banco de lavados uterinos obtidos ao longo do ciclo estral. A taxa de recuperação, qualidade e concentração dos lavados foram adequadas. Experimentos futuros verificarão a composição protéica dos lavados uterinos ao longo do ciclo por eletroforese.

Apoio Financeiro: FAPESP (02/00233-0; 03/10127-6; 03/10128-2)

DESENVOLVIMENTO DE UMA TÉCNICA PARA ESTUDO DO MICROAMBIENTE UTERINO EM VACAS

Lima, M.C.¹; Freire, A.F.²; Hucke, E.E.T.S.³; Miglino, M.A.¹; Binelli, M.²

¹Departamento de Cirurgia –Setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres - Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87 –FMVZ/USP, São Paulo -SP, CEP 05508-900, Brasil.

limamc@usp.br ²Departamento de Reprodução Animal - Av. Duque de Caxias Norte, 225 - FMVZ/USP - Pirassununga, SP, CEP 13635-900, Brasil. ³Laboratório de Fisiologia e Farmacologia - Faculdade de Medicina Veterinária – UNIFEOB, São João da Boa Vista-SP, CEP 13874-148, Brasil.

O diálogo bioquímico que ocorre entre o concepto e o endométrio materno nas primeiras três semanas de gestação é definido como período crítico para o estabelecimento da gestação (dias 15 a 19 após o estro). Aproximadamente 30% de morte embrionária podem ocorrer nesse período em decorrência de falhas no bloqueio da luteólise, conseqüentemente diminuindo a produtividade das operações pecuárias. Visando diminuir as perdas embrionárias, torna-se essencial caracterizar as moléculas envolvidas no diálogo materno-fetal durante o período crítico. Para tanto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver uma técnica cirúrgica para a implantação de um cateter de silicone no lúmen uterino para que se obtenham amostras do fluido uterino para a identificação e quantificação de proteínas presentes nesse compartimento potencialmente envolvidas com a inibição da luteólise. A técnica cirúrgica foi previamente testada *ex vivo*, utilizando-se tratos reprodutivos frescos oriundos de matadouro de duas vacas, sendo uma cíclica e outra prenhe. Cada corno uterino foi isolado do corpo do útero por uma ligadura com objetivo de permitir a realização da lavagem uterina restrita a cada corno uterino. Utilizou-se para as ligaduras fitilho cardíaco ou abraçadeira com sistema “Insulok”. Dois tipos de cateteres de silicone (HpBio[®]) foram utilizados sendo que cada um foi introduzido no lúmen de um corno. Com o auxílio de uma haste perfurante em aço inox (HpBio[®]), a parede uterina foi transfixada em dois pontos, distantes de 5cm. O orifício de entrada do cateter foi obstruído por sutura. O cateter foi exteriorizado através do outro orifício, permanecendo apenas sua extremidade no lúmen uterino. Os cateteres foram fixados na serosa do órgão. Em cada corno infundiram-se via cateter 40mL de água destilada corada com azul de metileno. A ligadura isolou eficientemente os cornos uterinos. Foi possível recuperar o líquido infundido por gravidade. A seguir, o procedimento cirúrgico foi realizado *in vivo* através de laparotomia. Para tanto, em uma vaca foi realizada anestesia local infiltrativa no local da incisão (abaixo da tuberosidade coxal) em associação com anestesia epidural utilizando-se lidocaína 2%. Ambos os cornos uterinos foram utilizados, sendo os cateteres exteriorizados através da parede abdominal e acondicionados dentro de uma bolsa de couro fixada no flanco do animal. Foram realizadas lavagens uterinas utilizando-se Ringer simples do dia 13 ao dia 23 do ciclo estral. O processo cicatricial dos orifícios abertos pela haste perfurante e das ligaduras foi eficiente, uma vez que todo o volume infundido foi totalmente recuperado por gravidade, à semelhança do que ocorreu *ex vivo*. O cateter de silicone mostrou-se eficiente para a recuperação do líquido infundido, não sendo observados entupimentos. O uso da ligadura foi eficiente para ocluir os cornos uterinos, permitindo a lavagem uterina restrita aos mesmos. Concluiu-se que a técnica cirúrgica adotada e os cateteres de silicone para lavagem uterina restrita podem ser utilizados para a coleta de fluido uterino para posterior avaliação de seu conteúdo protéico.

Apoio Financeiro: FAPESP (02/00233-0; 03/10127-6; 03/10128-2).

O ETANOL CAUSA LUTEÓLISE EM BOVINOS?

de Barros, F.R.O.¹; Dias, L.O.P.¹; Fantini, D.A.¹; Ayres, G.R.¹; Marques, V.B.²; Miguez, P.H.P.³;
Bertan, C.M.¹; Binelli, M.¹

¹ Departamento de Reprodução Animal – FMVZ/USP, Pirassununga-SP, 13635-900, Brasil. ² Departamento de Cirurgia – FMVZ/USP, São Paulo-SP, 05508-900, Brasil. ³ Departamento de Farmacologia Instituto de Biociências/UNESP, Botucatu-SP, 18618-000, Brasil.
flaviarob@gmail.com

O etanol é capaz de influenciar a produção de prostaglandinas em diversas espécies animais (Rajakrishnan V., J. Nutr. Biochem 2000, 11:509-514). Em experimentos realizados com bovinos no Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular, observou-se um nítido estímulo do etanol na produção da prostaglandina F₂α (PGF-2α), o mais importante agente luteolítico na espécie bovina (Binelli M. et al., ICAR 2004, p.135). O objetivo do presente trabalho foi verificar a capacidade luteolítica da PGF-2α estimulada pelo etanol em fêmeas bovinas. No primeiro experimento, vacas holandesas cíclicas não lactantes tiveram seu ciclo estral sincronizado e ovulação verificada por ultra-sonografia. No dia 16 do ciclo estral (D16) os animais foram implantados com um cateter na veia jugular, ranqueados de acordo com o peso vivo e divididos em 3 grupos. No D17, foram coletadas amostras de sangue de cada animal em intervalos de 30 minutos por 4 horas. Na hora 2 do experimento os animais receberam os seguintes tratamentos: grupo etanol (0,05 mL de etanol absoluto/kg de peso vivo; infusão intravenosa; n=5), grupo controle (0,05 mL de solução fisiológica/kg de peso vivo; infusão intravenosa; n=4) e grupo prostaglandina (150µg de d-cloprostenol; IM; n=4). Foram coletadas amostras de sangue diárias entre os dias 16 e 20 do ciclo estral para mensuração das concentrações plasmáticas de progesterona (P₄). As concentrações plasmáticas de PGFM (principal metabólito da PGF-2α mensurável na circulação) e P₄ foram determinadas por radioimunoensaio (RIE) e analisadas por ANOVA dos quadrados mínimos. Houve liberação aguda de PGFM em resposta ao etanol em comparação aos demais tratamentos (P(0,05). Contudo, apenas as vacas tratadas com PGF-2α apresentaram luteólise até D20, baseando-se na diminuição das concentrações plasmáticas de P₄. No segundo experimento, vacas mestiças cíclicas e não lactantes foram sincronizadas e abatidas no D17. O trato reprodutivo foi imediatamente levado ao laboratório e o endométrio dissecado em fluxo laminar. Explantes endometriais do corno contra-lateral ao corpo lúteo (CL) foram cultivados por 4 horas em meio de cultura contendo 0, 0,1, 1, 10 ou 100 µL de etanol absoluto/mL de meio. As concentrações de PGF-2α foram determinadas por RIE e analisados por ANOVA dos quadrados mínimos. Foi verificado que o etanol não estimulou a produção de PGF-2α pelo endométrio. Conclui-se, que o etanol não possui atividade luteolítica em bovinos e, portanto, não pode ser utilizado como ferramenta no controle do ciclo estral de bovinos.

Apoio Financeiro: FAPESP (Processos 99/03383-9; 04/03012-0)

INCIDÊNCIA DE HIDROMETRA E MUCOMETRA EM CABRAS

Moraes, E.P.B.X.¹; Santos, M.H.B.¹; Rocha, J.M.¹; Arruda, I.J.²;
Lima, P.F.³; Oliveira, M.A.L.³

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária/UFRPE ²Curso de Graduação em Medicina Veterinária/UECE ³Departamento de Medicina Veterinária/UFRPE - maloufrpe@uol.com.br

Este trabalho teve o objetivo de relatar a incidência de hidrometra e mucometra em cabras das raças Saanen, Alpina Americana, Anglo-Nubiana e Boer submetidas a exames ultra-sonográficos para o diagnóstico precoce da gestação. Nas propriedades monitoradas, os referidos exames foram realizados nas fêmeas com histórico de permanência junto a reprodutores e de terem sido separadas há, no mínimo, 30 dias. As que não foram diagnosticadas como gestantes e que apresentaram acúmulo de muco ou líquido no útero, formando trabéculas móveis hiperecóticas e relativamente finas, foram novamente examinadas após quinze dias para confirmação da condição patológica. Os casos em que o conteúdo uterino proporcionava imagem anecótica foram diagnosticados como hidrometra e naqueles com visualização hipocótica foram diagnosticados como mucometra. Foi utilizado o ultra-som, modelo 240 Parus/Pie Medical, equipado com o transdutor linear (6,0 e 8,0 MHz) adaptado a um suporte de PVC para facilitar a manipulação no reto do animal e o micro-convexo (5,0 e 7,5 MHz) revestido com uma proteção plástica em sua extremidade para evitar contaminação vaginal. As fêmeas portadoras dessas alterações uterinas receberam 0,5 mg de prostaglandina e as que não evidenciaram estro nos cinco dias subsequentes foram novamente tratadas com a mesma substância em igual dose no 11º dia da primeira administração. As coberturas foram realizadas no estro, detectado por rufiões, subsequente ao evidenciado após a administração da prostaglandina, utilizando-se reprodutores com fertilidade comprovada. Nas 30 cabras Saanen, 17 (56,7%) eram gestantes e das 13 (43,3%) vazias, 9 (30%) estavam com o útero normal, 3 (10%) com hidrometra e 1 (3,3%) com mucometra. Das 23 Alpinas Americanas, 4 (17,4%) eram gestantes e das 19 (82,6%) vazias, 16 (69,6%) apresentaram útero normal e 3 (13,0%) hidrometra. Nas 34 Anglo-Nubianas, 23 (67,6%) estavam gestantes e das 11 (32,3%) vazias, 10 (29,4%) evidenciaram útero normal e 1 (2,9%) estava com hidrometra. Nas 37 cabras Boer, 8 (21,6%) eram gestantes e das 29 (78,4%) vazias, 27 (74%) mostraram útero normal, 1 (2,7%) apresentou hidrometra e 1 (2,7%) e outra mucometra. Das fêmeas tratadas com prostaglandina, todas manifestaram estro, sendo 3 (75,0%) Saanen, 2 (66,0%) Alpina Americana, 1 (100%) Anglo-Nubiana e 2 (100%) Boer após a primeira administração e 1 (25,0%) Saanen e 1 (34%) Alpina Americana depois da segunda. Entre o 30º e o 35º dia da cobertura, as fêmeas tratadas foram ultra-sonograficamente examinadas e as 10 (100%) foram diagnosticadas como gestantes. Os resultados não apontaram diferença ($P = 0,05$) na incidência de hidrometra e mucometra entre os rebanhos monitorados, permitindo concluir que a ultra-sonografia é uma importante ferramenta tanto para diagnosticar precocemente a gestação e a detecção de alterações uterinas quanto para auxiliar o manejo reprodutivo nos pequenos ruminantes.

EFEITO DE LAVAGENS UTERINAS NA DURAÇÃO DO CICLO ESTRAL EM BOVINOS

Binelli, M.¹, Freire, A.F.¹; Lima, M.C.²; Hucke, E.E.T.S.³; Marques, V.B.²; Miglino, M.A.²

¹Universidade de São Paulo - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Departamento de Reprodução Animal-binelli@usp.br/anfrevet@usp.br-Av. Duque de Caxias Norte, 225-FMVZ-VRA-Pirassununga, SP, Brasil - 13635-900 ² Universidade de São Paulo - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Departamento de Cirurgia –Setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres - limamc@usp.br / miglino@usp.br / vamarques@usp.br - Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87 -FMVZ - VCI- São Paulo -SP, Brasil- 05508-900. ³Centro Universitário da Fundação de Ensino Octavio Bastos UNIFEOB - Laboratório de Fisiologia e Farmacologia - Faculdade de Medicina Veterinária–São João da Boa Vista-SP, Brasil, 13874-148 – ehucke@feob.br

Em bovinos, durante o “período crítico” para o estabelecimento da gestação (dias 15 a 19 após o estro), ocorre o bloqueio da luteólise em consequência de um diálogo bioquímico entre o conceito e o endométrio materno. Tal comunicação materno-fetal freqüentemente não é bem sucedida, resultando em taxas de mortalidade embrionária em torno de 30%, repercutindo negativamente na lucratividade das operações pecuárias. O sucesso da gestação depende da secreção de proteínas pelo conceito e pelo endométrio. Para o entendimento dos mecanismos parácrinos associados à manutenção da gestação é necessária a obtenção e caracterização de tais proteínas. Uma das maneiras de se obterem secreções uterinas é pela lavagem uterina utilizando-se uma sonda de Foley. Contudo, a realização de lavagens pode afetar a fisiologia uterina e modificar a duração dos ciclos estrais. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da obtenção de lavados uterinos na duração do ciclo estral em vacas. O comportamento de estro foi observado duas vezes por dia, por 60 minutos, diariamente, em onze vacas holandesas, vazias, secas e múltiparas por um período de 180 dias. Utilizando-se uma sonda de Foley posicionada transcervicalmente, obtiveram-se lavados uterinos (solução de Ringer simples, 500mL) do dia do estro até o dia 23 do ciclo. Para cada dia do ciclo estral, foram coletados três lavados uterinos, de vacas distintas, alternando-se os onze animais. Lavados uterinos consecutivos em um mesmo animal só foram realizados após intervalo mínimo de cinco dias. Dos 66 ciclos estrais acompanhados, 9,1% foram de 18 dias ou menos, 83,3% foram de 19 a 23 dias e 7,6% foram de 24 dias ou mais. Concluiu-se que com o protocolo de lavagens utilizado foi possível formar um banco de lavados uterinos sem alteração da freqüência de ciclos estrais de duração normal. Experimentos futuros verificarão a composição protéica dos lavados uterinos ao longo do ciclo estral e da gestação por eletroforese.

Apoio Financeiro: FAPESP (02/00233-0; 03/10127-6; 03/10128-2)

ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS DA ADENOMIOSE EM ÚTEROS BOVINOS NAS DIFERENTES FASES DO CICLO ESTRAL

Moreira, L.¹; Caldas-Bussiere, M.C.²; Quirino, C.R.²; Carvalho, E.C.Q.¹

¹Setor de Morfologia e Anatomia Patológica – LSA/CCTA/UENF. ²Setor de Reprodução Animal – LMGA/CCTA/UENF, Av. Alberto Lamego, 2000, Campos dos Goytacazes-RJ, 28013-620, Brasil.
moreira@uenf.br

Adenomiose uterina é o termo utilizado para designar a localização distópica de glândulas e estroma endometrial pelos feixes musculares do miométrio. Estudos sugerem que a adenomiose tenha como causa primária a desestruturação da borda que separa o endométrio do miométrio pelo desequilíbrio entre os hormônios sexuais, por sucessivos partos e idade avançada. Em mulheres e animais de laboratório é um achado bem definido e está associada com subfertilidade e infertilidade. Durante o estro em vacas, as glândulas endometriais são relativamente retas e conforme a concentração de progesterona aumenta, as glândulas se tornam mais enoveladas, e o máximo de crescimento/enovelamento ocorre por volta do oitavo dia após a ovulação. A superfície epitelial está relativamente alta durante o estro, cuboidal no dia dois do proestro e o máximo do seu desenvolvimento no dia nove e doze do ciclo estral. A presente investigação teve o intuito de relacionar as características da adenomiose com as fases do ciclo estral. Foram colhidas 61 peças uterinas em matadouros de Campos, RJ. As amostras foram fixadas em formalina neutra tamponada a 10%, submetidas a processamento de rotina e coloração com hematoxilina/eosina. Para auxiliar a microscopia, a adenomiose foi classificada em superficial e profunda. A fase do ciclo estral foi estimada pela morfologia, coloração e vascularização do corpo lúteo e presença ou não de folículos ovarianos maiores do que 8mm. Os dados foram analisados pelo teste qui-quadrado ($\alpha=0,05$). Os animais que estavam em anestro (n=11) apresentaram a menor percentagem de ocorrência de adenomiose (8,2%), enquanto os animais na fase luteal média (n=21) exibiram a maior percentagem (31%). A fase luteal inicial (n=13) e folicular (n=16) apresentaram percentagens semelhantes de ocorrência de adenomiose (18,03 e 22,9 %, respectivamente). A maior percentagem de adenomiose profunda ocorreu na fase luteal inicial e média (45 e 47,4%, respectivamente) quando comparada com a percentagem durante o anestro (20%) e durante a fase folicular (14,3%). Esses dados sugerem que a fase do ciclo em que o animal se encontra influencia na ocorrência da adenomiose e no grau de infiltração das glândulas endometriais.

ESTERÓIDES SEXUAIS MODULAM A SÍNTESE DE PGF₂ α EM EXPLANTES ENDOMETRIAIS BOVINOS

Miguez, P.H.P.¹; Da Cunha, P.M.²; Marques, V.B.³; Bertan, C.M.²; Binelli, M.²

¹ Departamento de Farmacologia IB/UNESP, Botucatu-SP, 18618-000, Brasil.

² Departamento de Reprodução Animal FMVZ/USP, Pirassununga-SP, 13635-900, Brasil.

³ Departamento de Cirurgia FMVZ/USP, São Paulo-SP, CEP 05508-900, Brasil.

phmiguez@yahoo.com.br

Em bovinos, a luteólise é causada por pulsos de prostaglandina F₂ α (PGF₂ α) liberados pelo endométrio no final da fase luteínica do ciclo estral. O estradiol (E₂) e a progesterona (P₄) são importantes para a iniciação da luteólise em ruminantes mas o mecanismo envolvido na ação destes hormônios não está esclarecido. O objetivo geral deste trabalho foi investigar as ações individuais e conjuntas desses esteróides na produção de prostaglandina F₂ α em bovinos. Foram utilizadas vacas mestiças abatidas no D17 de um ciclo estral sincronizado em três estudos independentes. O endométrio foi extraído e explantes endometriais foram cultivados em cultura estática por 12 horas na presença dos diversos tratamentos em triplicata. A concentração de PGF₂ α no meio de cultura foi quantificada por radioimunoensaio. No Estudo 1 testou-se a capacidade do E₂ estimular a síntese de PGF₂ α em explantes endometriais de três vacas nas concentrações de 0, 10⁻¹² ou 10⁻¹¹M. Verificou-se que o E₂ não foi capaz de estimular a síntese de PGF₂ α (P>0,1). No Estudo 2 testou-se a capacidade da P₄ estimular a síntese de PGF₂ α em explantes endometriais de quatro vacas nas concentrações de 0, 10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶ ou 10⁻⁵M. Verificou-se que a P₄ não foi capaz de estimular a síntese de PGF₂ α (P>0,1). No Estudo 3 testou-se a interação entre P₄ e E₂ no estímulo da síntese de PGF₂ α em explantes endometriais de três vacas. Os explantes endometriais receberam P₄ (0, 10⁻⁸ ou 10⁻⁷M), E₂ (0, 10⁻¹² ou 10⁻¹¹M) ou combinações dessas concentrações de P₄ e E₂. Houve estímulo na produção de PGF₂ α (P<0,01) quando associou-se P₄ e E₂ nas seguintes concentrações: 10⁻¹¹M E₂ + 10⁻⁸M P₄, 10⁻¹¹M E₂ + 10⁻⁷M P₄. Em conclusão, há necessidade de interação entre E₂ e P₄ para que haja um estímulo na síntese de PGF₂ α . Contudo, os mecanismos moleculares envolvidos nesta interação não estão esclarecidos.

Apoio financeiro: FAPESP (processo número: 99/03383-9).

MODULAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PROSTAGLANDINA F2 α POR FATORES SÉRICOS EM BOVINOS

Dias, L.O.P.¹; de Barros, F.R.O.¹; Fantini, D.A.¹; Meneghini, R.C.M.¹; Pontes, E.O.¹; Bertan, C.M.¹; Miguez, P.H.P.²; Binelli, M.¹

¹ Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Av. Duque de Caxias Norte 225, 13630-000 Pirassununga-SP, Brazil. pontes.eduardo@uol.com.br ² Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociência, Universidade Estadual Paulista, Distr. Rubião Jr. s/n, 18618-000 Botucatu-SP, Brazil

Observou-se aumento na taxa de liberação espontânea de prostaglandina F2 α (PGF2 α) por explantes endometriais bovinos em cultura. Em contraste, a produção observada *in vivo* é constante. A hipótese do presente trabalho foi que fatores séricos, ausentes *in vitro*, modulam a produção de PGF2 α . Objetivos foram testar o efeito do soro bovino (Experimento 1) e da P₄ sérica na modulação da liberação de PGF2 α (Experimentos 2 e 3). Preparou-se um “pool” do soro de vacas (n=5) no dia 17 do ciclo estral que foi utilizado nos experimentos. Vacas mestiças cíclicas e não lactantes foram sincronizadas e abatidas no dia 17 do ciclo estral. Seus tratos reprodutivos foram imediatamente levados ao laboratório. O endométrio dos cornos ipso-laterais ao CL foram dissecados e explantes (~50mg) acondicionados em placas de cultivo contendo meio de cultura (Ham-F10). No Experimento 1, explantes endometriais de três vacas foram cultivados em meio contendo 0, 20 ou 40% de soro. No Experimento 2, explantes foram cultivados em meio suplementado com 0 ou 40% de soro, tratado para a remoção dos esteróides, adicionado de 0 ou 4ng/ml de P₄. No Experimento 3, explantes foram cultivados em meio suplementado com 0 ou 40% de soro contendo 0 ou 10⁻⁶ M de mifepristona (RU-486). Os tecidos foram incubados em plataforma oscilatória a 37° C por 15 horas e amostras do meio foram coletadas nos tempos 1, 8 e 15 horas do início da incubação para mensuração da concentração de PGF2 α por radioimunoensaio. No Experimento 1, a produção de PGF2 α diminuiu conforme aumentou-se a concentração de soro no meio de cultura (P<0,01). No Experimento 2, a adição de soro inibiu a produção de PGF2 α (efeito de soro; P<0,01) e tal efeito foi independente da presença de P₄ (efeito de P₄ e da interação soro x P₄; P>0,1). No Experimento 3 a adição de soro inibiu a produção de PGF2 α (efeito de soro; P<0,01) e tal efeito não foi influenciado pelo bloqueio dos receptores de P₄ pelo antagonista RU-486 (efeito de RU-486 e da interação soro x RU-486; P>0,1). Concluiu-se que existem fatores do soro bovino que estão envolvidos na modulação da liberação da PGF2 α , mas a P₄ não participa nessa modulação.

Apoio financeiro: FAPESP (processos 99/03383-9; 04/03011-4)

INIBIÇÃO QUANTITATIVA DA SÍNTESE DE PROSTAGLANDINA F2A: BASES DE UM BIOENSAIO PARA MENSURAR A ATIVIDADE DE INTERFERON-TAU BOVINO

Marques, V.M.¹; Bertan, C.M.²; Merighe, G.K.F.³; Meirelles, F.V.³; Miglino, M.A.¹; Binelli, M.²

¹Universidade de São Paulo - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Departamento de Cirurgia setor Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres - vamarkes@usp.br / limamc@usp.br / miglino@usp.br - Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87 FMVZ - CBRA - São Paulo -SP, Brasil - CEP 05508-900 ²Universidade de São Paulo - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Departamento de Reprodução Animal - Pirassununga, SP - Brasil - binelli@usp.br / anfrevet@usp.br / cbertan@fmvz.usp.br - Av. Duque de Caxias Norte, 225 - Pirassununga, SP, Brasil - CEP 13630-000 ³Universidade de São Paulo - Faculdade Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Departamento de Ciências Básicas - Pirassununga, SP - Brasil - Av. Duque de Caxias Norte, 225 - Pirassununga, SP, Brasil - CEP 13630-000

No gado bovino, o reconhecimento da gestação é mediado através do interferon-tau (IFN-t). O interferon-tau é uma proteína secretória do conceito cuja principal ação consiste em bloquear a produção de prostaglandina F2 alfa (PGF2 α) pelo endométrio. A atividade de interferon-tau é usualmente mensurada indiretamente através de um ensaio antiviral. Propõe-se que um ensaio mais adequado mesure a atividade antiluteolítica de interferon-tau, ou seja, sua habilidade em inibir a produção de prostaglandina. O objetivo desse trabalho foi quantificar a inibição na síntese de PGF2 α estimulada por éster de forbol em células endometriais bovinas (células BEND), exercida pelo IFN-t. No experimento 1, células BEND foram semeadas em placas de 48 cavidades e tratadas em triplicata com 0; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 ou 200 ng/mL de 12,13 forbol dibutirato (PDBu) por 6 horas em três repetições experimentais independentes. As concentrações de PGF2 α no meio de cultura foram mensuradas por radioimunoensaio. O PDBu estimulou a síntese de PGF2 α de maneira concentração-dependente (P<0,01). A concentração de 25ng/mL promoveu uma síntese sub-máxima de PGF2 α . No experimento 2, células BEND foram tratadas em triplicata com 25 ng/mL de PDBu associado com 0; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2 ou 6,4 ng/mL de interferon-tau bovino recombinante (rbIFN-t) em quatro repetições experimentais independentes. O rbIFN-t inibiu a síntese de PGF2 α de maneira concentração-dependente (P<0,01). O percentual de inibição da síntese de PGF2 α apresentou associação positiva e linear com a concentração de rbIFN-t (R²=0.87; P<0.01). A concentração calculada de IFN-t que promoveu 50% de inibição na síntese de PGF2 α estimulada por PDBu foi 5,2 ng/mL. Conclui-se que IFN-t tem a habilidade de inibir quantitativamente a síntese de PGF2 α estimulada por PDBu. Espera-se que a atividade antiluteolítica em fluidos biológicos de interesse possa ser mensurada usando um sistema similar.

EFEITOS DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PROGESTERONA DURANTE O CICLO ESTRAL NA LIBERAÇÃO DE PROSTAGLANDINA F₂ α INDUZIDA PELO 17 β -ESTRADIOL EM BOVINOS

Fantini, D.A.¹; Goissis M.D.¹; Barros F.R.O.¹; Dias L.O.P.¹; Bressan F.F.¹; Miguez P.H.P.²; Bertan C.M.¹; Marques V.B.³; Almeida A.B.¹; Binelli M.¹.

¹ Departamento de Reprodução Animal - FMVZ-CBRA/USP, Pirassununga-SP, 13635-900, Brasil.

² Departamento de Farmacologia - Instituto de Biociências/UNESP, Botucatu-SP, 18618-000, Brasil

³ Departamento de Cirurgia – FMVZ/USP, São Paulo-SP, 05508-900, Brasil.

dafantini@yahoo.com.br

A prostaglandina F₂ α (PGF₂ α) possui um importante papel na luteólise dos bovinos. A liberação de PGF₂ α é regulada por uma ação coordenada da progesterona (P₄) e estradiol (E₂). Sabe-se que injeções de E₂ estimulam a liberação de PGF₂ α e que esta liberação pode ser modulada pela P₄. A prenhez pode ser mantida por uma ação da P₄ no bloqueio da liberação de PGF₂ α e luteólise. O objetivo deste estudo foi verificar como a liberação de PGF₂ α induzida pelo 17 β -E₂ difere em vacas com diferentes concentrações plasmáticas de P₄ durante o ciclo estral. Vacas holandesas, não lactantes, no dia 6 (D6) de um ciclo estral sincronizado (OvSynch), foram tratadas com 0 (grupo controle; n=9) ou 5000 UI im (grupo hCG; n=8) de gonadotrofina coriônica humana (hCG; Vetecor[®]), para a formação de um corpo lúteo (CL) acessório. No D8, a formação do CL acessório foi confirmada por ultrassonografia ovariana. Amostras sanguíneas foram coletadas do D6 até a manifestação de estro para a dosagem de P₄. No D17, todas as vacas tiveram a veia jugular canulada, e amostras sanguíneas foram coletadas a cada 30 minutos por 12 horas (hora experimental -2 até hora 10) para a dosagem de 13,14 diidro 15-ceto PGF₂ α (PGFM). Na hora experimental 0, foram administrados 3 mg iv de E α para todos os animais. As concentrações plasmáticas de P₄ e PGFM foram mensuradas por radioimunoensaio e analisadas por ANOVA dos quadrados mínimos. As concentrações plasmáticas médias de P₄ não diferiram ao longo do ciclo estral (p>0,1). Porém, houve maior produção de P₄ do grupo hCG em comparação ao grupo controle nos D11, D14 e D18. Houve maior produção média de PGFM do grupo hCG entre as horas experimentais 4 a 5,5 (p<0,05), variando de 14,77 até 85,52 pg/ml. Considerando-se que a P₄ estimula a produção de PGF₂ α induzida pelo E₂, conclui-se que a ação da P₄ na manutenção da prenhez se dá pelo favorecimento do crescimento do conceito e não por uma ação inibitória na síntese de PGF₂ α .

Apoio financeiro: FAPESP (processos 04/03013-7, 03/00576-8 e 99/03383-9).

EFEITO DO USO DO D-CLOPROSTENOL E OCITOCINA NA INVOLUÇÃO UTERINA DE VACAS LEITEIRAS – DADOS PRELIMINARES

Vasconcelos, R.S.¹; Rigo, A.G.¹; Lisboa, L.A.¹; Ribeiro, A.B.C.²; Sgobero Filho, I.³;
Chacur, M.G.M.⁴; Seneda, M.M.¹

¹ Departamento de Clínicas Veterinárias – UEL/PR, Brasil. ² Sítio Santana – Londrina-PR, Brasil. ³ Produtiva Ltda – Londrina-PR, Brasil. ⁴ Unoeste – Presidente Prudente-SP, Brasil.
rschroeder@pop.com.br

A condição do útero no pós-parto influencia diretamente a fertilidade das vacas leiteiras e a rentabilidade da produção leiteira. A involução uterina normal é fundamental para o retorno à fase reprodutiva. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da ocitocina e da prostaglandina na involução uterina pós-parto em vacas leiteiras de alta produção. O experimento foi realizado em propriedade localizada próxima ao município de Londrina-PR. Foram utilizadas 59 vacas de alta produção de leite, da raça holandesa (HPB), com escore corporal médio 3,5, seguindo uma tabela de 1 a 5 e com peso médio de 654,4 Kg. Apenas vacas com parto eutócico foram consideradas no experimento. Os animais foram divididos aleatoriamente em 3 grupos. No grupo controle (n = 17) nenhum tratamento foi realizado, no grupo 2 (n = 18) foi administrado uma dose de ocitocina (Orastina Forte[®], 30 UI, IM) no momento do parto e outra dose 4 horas após a primeira, no grupo 3 (n = 24) foi administrado uma dose de cloprostenol (Preloban[®], 0,15mg, IM) no momento do parto e outra dose 3 dias após a primeira. A involução uterina foi avaliada por palpação retal, aproximadamente 30 dias pós-parto. Os critérios adotados para grau de involução uterina foram: G1 - excelente, involução completa dos cornos; G2 – satisfatório, involução parcial dos cornos e G3 – insatisfatório, presença de conteúdo no útero. O grupo controle apresentou 41,2% (7/17) dos animais classificados em G1, 47% (8/17) em G2 e 11,8% (2/17) em G3, o grupo ocitocina apresentou 27,8% (5/18) em G1, 61,2% (11/18) em G2 e 11% (2/18) em G3. No grupo prostaglandina obteve-se 54,2% (13/24) em G1, 29,1% (7/24) em G2 e 16,7 (4/24) em G3. Apesar do caráter preliminar, os resultados parciais sugerem, aparentemente, que a utilização da prostaglandina no momento do parto seguida de nova dose 3 dias após, possa ser o tratamento mais promissor para a involução uterina. Se esta tendência se confirmar com a continuidade dos trabalhos, os dados obtidos estarão de acordo com a literatura, quanto à eficiência da prostaglandina na involução uterina.

RELAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INTRAUTERINA DE NITRITO COM A OCORRÊNCIA DE ENFERMIDADES UTERINAS EM BOVINOS

Moreira, L.¹; Viana, K.S.²; Caldas-Bussiere, M.C.²; Quirino, C.R.²; Carvalho, E.C.Q.¹

¹Setor de Morfologia e Anatomia Patológica – LSA/CCTA/UENF. ²Setor de Reprodução Animal – LMGA/CCTA/UENF, Av. Alberto Lamego, 2000, Campos dos Goytacazes-RJ, 28013-620, Brasil.
moreira@uenf.br

Na pecuária de corte, fêmeas que apresentam ineficiência reprodutiva, geralmente são descartadas sem que se tenha uma análise mais detalhada do seu histórico reprodutivo. O óxido nítrico (NO) é sintetizado a partir do aminoácido não essencial L-arginina em NO e L-citrulina pela enzima óxido nítrico sintase. O NO é rapidamente oxidado a nitrito/nitrato pelas células como mecanismo de defesa, principalmente quando produzido em alta concentração. Além disso, o NO tem sido implicado como um dos efetores da perda embrionária precoce em camundongas. O presente estudo teve como objetivo relacionar a concentração de nitrito no lúmen uterino de vacas acometidas por patologias uterinas (adenomiose, endometrite, hiperplasia endometrial cística (HEC), distrofia angiomasiosa e fibrose periglandular) ou não. Foram colhidas 25 peças uterinas de vacas vazias em matadouros de Campos, RJ. Lavado intrauterino com 1ml de PBS foi realizado para mensuração da concentração de nitrito pela reação de Griess. O corno uterino no qual foi realizada a lavagem foi submetido a exame histopatológico para diagnóstico das referidas patologias. Os dados foram analisados pela ANOVA e teste *t* ($\alpha=0,05$). Uma relação significativa com fibrose periglandular ($99,15\pm 89,75\text{mM}$), endometrite ($102,96\pm 87,58\text{mM}$) e distrofia angiomasiosa ($157,57\pm 108,80\text{mM}$), e não significativa com a adenomiose ($77,40\pm 81,25\text{mM}$), HEC ($73,94\pm 43,41\text{mM}$) e úteros normais ($15,29\pm 20,85\text{mM}$), pela análise de variância e teste F foi verificada. No entanto, elevada concentração de nitrito apresentou uma relação significativa com adenomiose acentuada superficial e profunda pelo teste *t*. A observação da concentração de nitrito individual sugere a existência de um efeito cumulativo na geração do NO, pois ao analisarmos os dados isoladamente, as maiores concentrações de nitrito (281,14; 265,36; 105,33 e 117,82 mM) tinham pelo menos duas patologias ocorrendo simultaneamente no mesmo segmento uterino analisado. Constatou-se uma relação positiva com tipo e quantidade de patologias uterinas com a concentração de nitrito no lúmen uterino. Mais estudos são necessários para verificar se a alta concentração de NO ocorrida durante estas patologias seja um dos motivos da subfertilidade ou infertilidade em vacas.

EFEITO DA PRÉ-EXPOSIÇÃO DE GESTÁGENOS NA EXPRESSÃO DE RECEPTORES ESTERÓIDES PELO CORPO LÚTEO DE VIDA CURTA E ENDOMÉTRIO DE VACAS EM ANESTRO PÓS-PARTO

Loguercio, R.S.¹; Pimentel, C.A.²; Loguercio, L.P.³; Löf, H.K.¹; Fernandes, R.¹;
Oliveira, J.F.C.¹; Gonçalves, P.B.D.¹

¹ Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Clínica de Grandes Animais Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal - BioRep, Santa Maria, RS, Brasil. bayard@biorep.ufsm.br

² Departamento de Patologia Animal – UFPel, Pelotas- RS – Brasil

³ Granjas 4 Irmãos S&A – Rio Grande – RS – Brasil.

Visando elucidar parte do mecanismo de luteólise precoce no primeiro ciclo estral pós-parto (CL de vida curta), foi avaliado o efeito da pré-exposição a gestágenos na expressão de receptores de progesterona (RP), estrógeno alfa (REa) e estrógeno beta (REβ) no endométrio e CL. Dez vacas em 30 dias de anestro pós-parto foram divididas em dois grupos. No grupo anestro (AN; n=5), os animais tiveram um acompanhamento diário da onda folicular e, quando o folículo dominante alcançou diâmetro de 12 mm, foi aplicado gonadorelina (agonista do GnRH; 100 µg; im). Após 7 dias, foram coletados tecidos luteal e endometrial para avaliação da expressão gênica e histológica. No grupo AN+MAP (n=5), os animais foram submetidos a medroxiprogesterona por 7 dias (MAP; 250 mg; pessário intra-vaginal) e injeção i.m. de benzoato de estradiol na colocação do pessário (BE; 5 mg; im). Nesse grupo, os animais também tiveram um acompanhamento da onda folicular, receberam GnRH e tiveram tecidos coletados de maneira similar ao grupo AN. O grupo controle foi composto por dez animais ciclando (CICL) destinados ao abatedouro, onde foram coletados fragmentos do endométrio e corpo lúteo. As amostras coletadas foram destinadas a expressão gênica (RT-PCR) e avaliação histológica endometrial e luteínica. A pré-exposição ao gestágeno no primeiro ciclo estral pós-parto exerceu uma influência na expressão de receptores esteróides no endométrio. A expressão de RP foi maior no endométrio dos animais do grupo AN+MAP, do que nos demais grupos (P<0,05), sugerindo uma ação inibitória do gestágeno no começo da cascata luteolítica. A expressão do REa no endométrio foi maior nos grupos AN e AN+MAP comparado ao grupo de animais ciclando (P<0,05). Os indivíduos do grupo AN+MAP não expressaram REβ no tecido endometrial, diferindo dos grupos AN e CICL (P=0,0834). No CL, os animais do grupo AN apresentaram maior expressão do REβ (P=0,0352), indicando regressão do CL. As medidas de altura do epitélio glandular endometrial e o número total de células luteais grandes, encontradas nos animais do grupo AN+MAP, foram maiores que no grupo em anestro (AN; P<0,05). Esses achados indicam que a exposição prévia ao gestágeno no primeiro ciclo estral pós-parto resulta em modificações fisiológicas similares ao ciclo estral normal e que os receptores esteróides têm um papel importante no mecanismo de luteólise precoce durante o final do anestro pós-parto em bovinos.

Trabalho realizado com apoio do CNPq e FAPERGS.

ANÁLISE DA REGIÃO +15 DO GENE DA α -LACTALBUMINA EM BOVINOS DA RAÇA NELORE (*Bos primigenius indicus*)

Martins, L.F.; Milazzotto, M.P.; Feitosa, W.B.; Mendes, C.M.; Nicacio, A.C.;
Assumpção, M.E.O.A.; Visintin, J.A.

Departamento de Reprodução Animal – FMVZ-USP, São Paulo-SP, Brasil
leydson_martins@yahoo.com.br

A α -lactalbumina é uma subunidade da lactose-sintase, que é responsável pela junção da glicose e da galactose na formação da lactose, molécula diretamente responsável pela produção do leite. O alelo A_{+15} está relacionado com o aumento da produção de leite, em relação ao alelo B_{+15} em bovinos da raça Holandesa (*Bos primigenius taurus*). O objetivo deste trabalho foi analisar os polimorfismos na região +15 do gene da α -lactalbumina em bovinos da raça Nelore (*Bos primigenius indicus*), visando implantação de programas de melhoramento genético e transgenia animal. Foram utilizados 2 grupos de bovinos, um controle com 15 animais da raça Holandesa e um experimental com 50 animais da raça Nelore. O DNA genômico total foi extraído de sangue periférico pelo método Fenol/Clorofórmio e submetido à amplificação com oligonucleotídeos iniciadores específicos, resultando em um fragmento de 167 bp. As amostras amplificadas foram incubadas com a enzima *MnII* à 37°C por 16 horas. Após a digestão, as amostras foram analisadas em gel de poliacrilamida 12%, observando três alelos: A_{+15} que produziu três fragmentos de 77; 50 e 40 pb; B_{+15} que produziu dois fragmentos de 117 e 50 pb, ambos já identificados na literatura e um terceiro alelo, novo, denominado C_{+15} , que produziu dois fragmentos de 137 e 30 bp. A frequência foi de 20% de animais AB e 80% de BB no grupo controle e de 10% de BB e 90% de BC no experimental. Neste estudo, pode-se concluir que ocorre predominância do alelo B_{+15} em ambos os grupos, porém o alelo A_{+15} ocorre com exclusividade nos animais Holandeses de alta produção e o alelo C_{+15} nos animais Nelore.

Suporte financeiro FAPESP: 04/05841-4

ESTUDO DA REGIÃO -1689 DO GENE DA α -LACTALBUMINA EM BOVINOS DA RAÇA NELORE (*Bos primigenius indicus*)

Martins, L.F.; Milazzotto, M.P.; Caetano, H.V.A.; Feitosa, W.B.; Yamada, C.;
Assumpção, M.E.O.A.; Visintin, J.A.

Departamento de Reprodução Animal – FMVZ-USP, São Paulo-SP, Brasil
leydson_martins@yahoo.com.br

A produção de leite é diretamente proporcional à quantidade de lactose, um dissacarídeo composto de glicose e galactose. A lactose-sintase é a enzima responsável pela união destes dissacarídeos e é formada por duas subunidades a galactosiltransferase e a α -lactalbumina. Voelker et al. (Journal Dairy, v.80, 9, 194-197, 1997) identificaram por RFLP uma mutação pontual no gene da α -lactalbumina localizada na posição – 1689. Bovinos da raça Sueca Vermelha e Branca mostram relação entre polimorfismo nessa região e a concentração de lactose no leite. Animais -1689 AA em combinação com o genótipo +15 BB possuem 0,08% de lactose a mais por kg de leite do que animais –1689 AB em combinação com o genótipo +15 BB. O objetivo deste trabalho foi analisar os polimorfismos da região -1689 do gene da α -Lactalbumina em bovinos da raça Nelore, visando a implantação de programas de melhoramento genético e transgenia animal. Foram utilizados 2 grupos de bovinos, um controle com 15 animais da raça Holandesa e um experimental com 50 animais da raça Nelore. O DNA genômico total foi extraído de sangue periférico pelo método Fenol/Clorofórmio e submetido à amplificação com oligonucleotídeos iniciadores específicos, resultando em um fragmento de 429 pb. As amostras amplificadas foram incubadas com a enzima *SduI* à 37°C por 16 horas. Após a digestão, as amostras foram analisadas em gel de poliacrilamida 12%, observando-se a presença de dois alelos: A₋₁₆₈₉ que não foi digerido e B₋₁₆₈₉ que produziu dois fragmentos de 260 e 169 pb. A frequência foi de 33% de animais AA, 60% AB e 7% BB no grupo controle e de 100% AA no experimental. Conclui-se que, embora animais da raça Nelore apresentem o genótipo ligado à maior produção de lactose, torna-se necessário a análise e a correlação dos alelos da região +15 do gene da α -lactalbumina para seleção de linhagens de interesse.

Suporte financeiro: FAPESP: 04/05841-4

INDICES DE AUTORES

A

Abrahão, M. 403
 Abreu, C.O. 284
 Accorsi, M.F. 350; 364; 397; 418
 Adona, P.R. ... 338; 388; 389; 390; 392; 393; 394; 446
 Agnonni, L. 403
 Aguiar Filho, C.R. 248
 Aguilar, J.J. 179
 Alberti, K. 300; 302; 305; 324; 325; 326
 Alberto, M.L.V. 456
 Albuquerque, C.P. 241
 Albuquerque, F.T. 292
 Albuquerque, K.P. 216; 217; 233
 Alencar, M.M. 273; 278
 Alessi, C. 253
 Alfieri, A.A. 344; 345; 398; 399
 Almeida, A.B. 141; 186; 274; 469
 Almeida, A.K. 242; 272; 289
 Almeida, A.P. 241
 Almeida, K.C. 366
 Alonso, C. 201
 Alonso, M.A. 194; 200; 204; 205
 Alvarenga, M.A. .. 19; 135; 179; 192; 193; 194; 195;
 196; 197; 198; 300
 Alvarez, R.H. 235; 237; 412
 Alves, A.E. 367
 Alves, S.G.G. 272; 289; 290
 Alvim, M.T.T. 162; 348; 381; 430
 Amaral, J.B. 237
 Ambrósio, C.E. 186; 456
 Amorin, L. 234
 Andrade Moura, J.C. 29
 Andrade, A.F.C. . 145; 298; 299; 319; 320; 321; 327;
 328
 Andrade, E.R. 344; 345
 Andrade, J.B. 235
 Andrade, J.C.O. 250; 433
 Andrade, M.A. 255
 Andrade, M.L.L. 246; 366
 Andrade, M.P. 295
 Andrade, P.B. 334
 Andrade, R.F. 349
 Andreoti, M. 371
 Arashiro, E.K.N. 189
 Araújo, C.V. 211
 Araújo, D.B. 177
 Araújo, E.B. 294
 Araujo, G.H.M. ... 179; 191; 193; 194; 195; 196; 197
 Araújo, I.F.L. 255
 Araújo, J.M. 291
 Arruda, I.J. 246; 366; 463
 Arruda, J.N.T. 380

Arruda, R.P. 145; 200; 298; 299; 304; 315; 316; 317;
 319; 320; 321; 327; 328; 329; 355
 Assaf, S.S. 333
 Assis Neto, A.C. 186; 452; 453; 456
 Assumpção, M.E.O.A. 352; 353; 354; 356; 357; 358;
 361; 383; 411; 413; 414; 415; 416; 427; 428; 436;
 437; 438; 439; 440; 444; 447; 449; 473; 474
 Ataíde, P.F. 184
 Athayde, C.S. 346; 374
 Atique Netto, H. 365
 Avelar, S.R.G. 366
 Avellar, M.C.W. 337
 Ávila, F.F. 391
 Ayres, G.R. 462
 Ayres, H. 225; 229; 230; 260; 266; 288
 Azevedo, H.C. 127; 311
 Azevedo, J.R. 222
 Azevedo, N.A. 208

B

Balarin, O.F. 281
 Balbino, S.C. 207
 Balla, E. 219; 220; 276; 277
 Bandarra, E.P. 313
 Bão, S.N. 170; 322; 343
 Barbosa, P.F. 278
 Barbosa, R.T. 273; 278
 Barcelos, A.C. 370
 Barioni, L.G. 214; 215
 Barreiros, T.R.R. 185; 213; 224; 282
 Barreto Filho, J.B. 292
 Barretos, C.S. 458
 Barretto, L.S.S. 355; 385; 386; 410
 Barros, C.M. 55; 209; 210; 258; 263; 270; 280; 337;
 362; 370; 404
 Barros, F.R.O. 469
 Barreiros, T.R.R. 222; 281
 Bartolomeu, C.C. 207
 Baruselli, P.S. 141; 151; 174; 178; 209; 210; 225;
 227; 228; 229; 230; 234; 235; 260; 261; 262; 265;
 266; 273; 281; 285; 286; 287; 288; 397; 431; 443
 Basso, A. 419; 420; 421; 336
 Bastos, R. 351
 Bazer, F.W. 454
 Beier, S.L. 375
 Beletti, M.E. 314
 Beltrame, R.T. 214; 215
 Beretta, C.A.G. 367
 Bergamaschi, M.A.C.M. 273; 278
 Bernardi, M.L. 381
 Bertan, C.M. 274; 462; 466; 467; 468; 469
 Bertolla, R.P. 410

Bertonsello, L.G.	284	Camargo, L.S.A.	181; 376; 407; 408; 425
Bezerra, F.Q.G.	248; 459	Cao, M.	335
Bezerra, G.A.	222	Capinzaiki, R.L.	362
Bianconi, L.L.	327	Capovilla, L.C.T.	216; 217; 233
Biase, F.H.	394; 400; 446	Carambula, S.F.	400; 401
Bicalho, H.M.S.	218	Carballo, J.I.	232
Bicudo, S.D.	127; 305; 311	Carmo, D.R.	240
Binelli, M. .. 273; 274; 278; 361; 449; 460; 461; 462; 464; 466; 467; 468; 469		Carmo, M.T.	179; 193; 195; 197; 198
Biondi, F.C.	340; 371; 445	Carnwath, J.W.	83
Biscarde, C.E.A.	242; 272; 289; 290	Carvalho, A.C.	340
Bishop, W.	418	Carvalho, A.F.	454
Bisinotto, R.S.	278	Carvalho, A.G.	19
Bittencourt, R.F.	272; 289; 290	Carvalho, C.S.P.	339; 368; 429
Blanes, M.S.	302; 303	Carvalho, E.C.Q.	465; 471
Blaschi, W.	239; 344; 345	Carvalho, J.B.P.	174; 209; 235; 266
Bó, G.A. 151; 178; 219; 220; 221; 275; 276; 277; 432		Carvalho, L.R.	191
Boff, A.L.N.	171; 296	Carvalho, M.A.P.	257; 283
Bols, P.E.J.	1; 5; 103	Carvalho, N.A.T.	266; 174; 209; 235; 431
Bongalharo, D.	296	Carvalho, P.H.A.	292
Bonotto, A.L.M.	226	Castaneira, C.	201
Borges, J.C.	212; 387; 396	Castilho, A.C.S.	55; 334; 335
Borges, J.R.J.	173	Castilho, C.	253; 268
Borges, L.F.K.	220; 221; 432	Castilho, E.M.	184
Borsato, E.A.	185; 213; 224	Castricini, E.S.C.	227; 285; 286
Bortolotti, L.A.	239	Cavalcanti, M.T.H.	306
Boselli, C.C.	345	Cavaliere, F.L.B.	216; 217; 233
Bracarense, A.P.F.R.L.	345	Cazerta, S.M.M.	452; 453
Braga Jr., R.A. 292		Celeghini, E.C.C. 145; 298; 299; 319; 320; 321; 327; 328; 329	
Braga, F.A.	427; 449	Celestino, J.J.H.	170; 341
Braga, F.C.	452; 453; 454	Cembranelli, M.A.R.	271
Braga, M.Q.	347	Centenaro, E.A.	284
Bragança, J.F.	254	Chacur, M.G.M.	470
Bragança, J.M.	308	Chalhoub, M.	242; 272; 289; 290
Brandão, D.O.	391	Chesta, P.	276; 277
Branquinho, J.A.	135	Chiamenti, A.	248; 459
Brauner, C.C.	226	Chiaratti, M.R.	417
Bredbacka, P.	403	Chiari, J.R.	174; 230; 235; 288
Bressan, F.F.	469	Coelho, L.A.	412
Bringel, B.A.	242	Conceição, J.C.	191
Brum, D.S.	348; 381	Constantino-Max, M.	239
Bruschi, J.H.	243; 249; 251; 252	Cordeiro, M.F.	367
Bucher, C.H.	368	Cordeiro, M.S.	340; 371; 445
Bunn, S.	382; 426	Corrêa, G.A.	173
Buratini Jr., J.	55; 263; 334; 335; 337	Corrêa, M.N.	184
Burioli, K.C.	454	Cortezzi, S.S.	401; 417
		Coscioni, A.	403
		Costa, D.S.	295
C		Costa, I.B.	55; 333; 334
Caetano, H.V.A. . 357; 383; 415; 416; 436; 437; 438; 439; 440; 474		Costa, M.C.	267
Caiado, J.R.C.	180; 199	Costa, S.H.F.	341
Caldas-Bussiere, M.C. 169; 338; 339; 359; 465; 471		Coutinho, A.R.S. . 353; 354; 383; 411; 438; 444; 449	
Câmara, D.R.	306	Crocci, A.J.	302; 303
Câmara, J.U.	173	Cunha, I.C.N.	293; 351
		Cunha, K.M.A.	455

Curcio, B.R.	171; 296	Fazio, F.L.	365
Cutaia L.	220; 221; 432	Feitosa, W.B.	357; 358; 413; 414; 415; 436; 444; 447; 449; 473; 474
C			
D'Angelo, M.	174; 346; 374; 451	Feliciano Silva, A.E.D.	318; 323
D'Oliveira-Sousa, A.	232	Felippe, E.C.G.	316; 317
da Cunha, P.M.	466	Feltrin, C.	182
Dagli, M.L.Z.	454	Féres, F.C.	398
Damato, J.	173	Fernandes, C.A.C.	223; 236; 238; 257; 271; 283
de Barros, F.R.O.	462; 467	Fernandes, C.B.	192; 333; 434; 435
de Bem, T.H.C.	390; 401; 417; 441; 442	Fernandes, C.E.	318; 323
de Kruif, A.	5	Fernandes, M.B.	363; 423
de Moura, V.M.B.D.	313	Fernandes, R.	472
de Souza, D.B.	351	Ferraz, M.L.	350; 364; 397
Del Rei, A.J.	207	Ferraz, P.C.	207
Delboni, M.I.	282; 345	Ferreira, A.M.	181; 376; 408; 425
Dell'Aqua Jr., J.A.	19; 193; 297; 300; 302; 324; 325; 326	Ferreira, C.R.	172; 387; 395; 396; 420; 431; 443; 450
Demétrio, D.	230; 288	Ferreira, M.A.P.	340
Deschamps, J.C.	171	Ferreira, M.B.D.	208
Detmann, E.	295	Ferreira, M.M.G.	404
Di Filippo, P.A.	367	Ferreira-Berbari, J.B.P.	359
Di Santis, G.W.	313	Figueiredo, A.C.S.	236; 238; 271
Dias, A.J.B.	259; 310; 429	Figueiredo, J.R.	170; 341; 344; 345
Dias, D.P.M.	367	Figueiredo, T.B.	287
Dias, J.M.B.	231	Fleury, P.D.C.	200; 204; 205
Dias, L.O.P.	462; 467; 469	Folhadella, D.S.	425
Diniz, E.G.	314; 347	Folhadella, I.M.	376; 408
Dionello, N.J.L.	184	Fonseca, F.A.	180; 199; 368; 408
Dode, M.A.N.	323	Fonseca, J.F.	243; 249; 251; 252
Dores, C.B.	302; 303	Fontes, R.S.	180; 199; 214; 215; 368
Dória, R.G.S.	367	Forell, F.	182
dos Santos, L.C.	182	Forero-Gonzalez, R.A.	329
dos Santos, M.V.	381	Francisco, R.C.	239
Douglas, R.H.	242	Franco, M.M.	173; 391
Duarte, M.B.	202; 203	Franco, R.V.R.	347
Duarte, R.A.	275	Franco, V.C.L.	426
Dutra, F.O.	197	Freire, A.F.	460; 461; 464
E			
Eberhardt, B.G.	314; 362; 370; 404	Freitas, C.P.	384; 424
Elias, F.P.	363; 423	Freitas, D.S.	272; 289
Elias, N.Q.	430	Freitas, V.J.F.	241; 246; 366
Emanuelli, I.P.	400; 401; 417	Frey, F.J.	296
Ereno Jr., J.C.	183; 372; 369	Fuentes, D.S.	232
Ereno, A.F.C.	349	G	
Ereno, R.L.	258; 270; 280	Gabaldi, S.H.	360; 377; 378; 379
Escobar, F.R.	254	Galassi, A.G.	347
Esper, C.R.	336; 360; 379; 419; 420; 421	Galeli, G.	347
F			
Faes, M.R.	169; 339	Galerani, M.A.V.	363; 423
Fagundes, B.	294; 295	Galuppo, A.G.	346; 451
Fantini, D.A.	462; 467; 469	Gama Filho, R.V.	368
Farinasso, A.	135	Gambarini, M.L.	255
		Garcia, A.M.	255
		Garcia, A.R.	145; 319; 320
		Garcia, J.M.	172; 186; 336; 377; 378; 387; 395; 396; 419; 420; 421; 431; 443; 450

Martins Jr., A.P.	256	Monteiro, F.M.	404
Martins, A.R.	365	Moraes, C.M.	296
Martins, C.F.	322	Moraes, E.A.	251; 252
Martins, C.M.	151; 227; 260; 285; 286	Moraes, E.P.B.X.	131; 247; 248; 459; 463
Martins, D.F.	370	Moreira, K.A.	306
Martins, F.S.	170; 341	Moreira, L.	339; 465; 471
Martins, L.E.P.	242	Morelli Júnior, J.	365
Martins, L.F.	438; 444; 447; 473; 474	Morgan, J.	216; 217
Martins, L.R.	375	Mori, M.M.	253; 268
Matos, L.F.	429	Mota, A.V.	279
Matos, M.H.T.	170; 341	Moura, R.T.D.	131; 248; 459
Matsumoto, F.S.	456	Moya, C.F.	457; 458
Matta, S.G.C.	169	Mozzaquatro, F.D.	426
Max, M.C.	372	Mundim, T.C.D.	391
Medeiros, A.S.L.	19; 193; 195		
Meira, C.	191	N	
Meirelles, F.D.P.	350; 364; 402; 418	Nascimento Filho, E.V.	250
Meirelles, F.V.	172; 186; 235; 350; 364; 394; 395; 397; 400; 401; 402; 417; 418; 441; 442; 443; 446; 450; 452; 453; 468	Nascimento, A.B.	352; 353; 354; 356; 358; 383; 411; 438; 440
Meirelles, M.	403	Nascimento, J.	145; 298; 299; 304; 319; 320; 321; 327; 328
Mello, M.R.B.	413	Nasser, L.F.	151; 225; 228
Melo, A.N.	247	Nasser, L.F.T.	178
Melo, C.M.	19; 193; 195; 297; 300; 302; 303; 324; 325; 326	Natori, M.M.	338
Melo, D.S.	333; 404	Navarro, R.B.	406; 409
Melo, E.O.	391	Negrão, J.A.	316; 317
Melo, G.M.	374; 451	Neto, J.S.	318
Melo, L.C.	409	Neves Neto, J.R.	139; 204; 205
Melo, M.V.L.C.C.	240	Neves, A.L.A.	207
Melo, N.S.S.	206; 301	Neves, J.P.	308
Menchaca, A.	244	Neves, T.A.	242
Mendes, C.M.	356; 416; 427; 437; 449; 473	Nicacio, A.C.	358; 361; 416; 427; 428; 436; 447; 473
Mendes, I.K.P.	218	Nichi, M.	354
Menegati, J.A.	178	Nicola, E.S.	335
Meneghetti, M.	256	Niemann, H.	83
Meneghini, R.C.M.	467	Nogueira, C.E.W.	171; 296
Méo, S.C.	172; 387; 395; 396; 419; 443; 450	Nogueira, E.	291
Merighe, G.K.F.	400; 401; 417; 441; 442; 446; 468	Nogueira, E.T.	234
Mesquita, L.G.	400; 401; 417	Nogueira, L.A.G.	425
Mezzalira, A.	382	Nogueira, M.F.G.	55; 263; 270; 337; 370
Mezzalira, J.C.	382	Nomellini, J.	363
Miglino, M.A.	186; 452; 453; 454; 456; 460; 461; 464; 468	Nonato Jr., I.	183; 369; 372
Miguez, P.H.P.	462; 466; 467; 469	Nunez, M.M.	225
Milazzotto, M.P.	357; 358; 361; 438; 444; 447; 473; 474	O	
Mingoti, G.Z.	355; 385; 386; 410	Oba, E.	177; 191; 192; 197; 223; 236; 237; 238; 257; 279; 283; 333
Miragaya, M.H.	373	Ohashi, O.M.	340; 371; 405; 422; 442; 445
Miranda, M.	417	Oliveira Filho, B.D.	255
Miranda, M.S.	371; 394; 405; 422; 441; 442; 445; 446	Oliveira, A.C.	282
Miyashiro, S.	451	Oliveira, C.A.	315; 316; 317
Mizubuti, I.Y.	267	Oliveira, C.H.	430
Mondadori, R.G.	343	Oliveira, C.M.C.	309
		Oliveira, E.R.	236; 257; 271

Ramos, F.S.R.	216; 217	Sá, W.F.	181; 376; 408; 425
Ramos, J.L.G.	368	Saalfeld, M.H.	403
Rao, V.S.N.	455	Saliba, W.P.	162; 348; 381; 430
Raphael, C.F.	145; 298; 299; 319; 320; 321; 327; 328; 329	Salmazo, R.	267
Rêgo, T.P.	240	Sanches, B.V.	369; 372
Reichenbach, H-D.	131	Santana, G.M.	159
Reichert, R.H.	174; 235	Santana, R.C.M.	272; 289; 290
Reis, A.N.	309; 312; 405; 422	Santiago, L.L.	209; 234
Reis, E.L.	178; 229; 265; 286	Santin, T.R.	343
Resende, M.V.	419; 420; 421	Santos, A.F.A.	243; 249
Rezende, C.R.	225; 228	Santos, F.A.	455
Rezende, L.F.	225; 228	Santos, G.T.	216; 217
Rheingantz, M.G.T.	403	Santos, J.M.	456
Ribeiro Filho, A. de L.	242; 272; 289; 290	Santos, M.H.B.	131; 246; 247; 248; 459; 463
Ribeiro, A.B.C.	470	Santos, M.V.	426
Ribeiro, G.	367	Santos, N.P.	338
Ribeiro, H.F.L.	211; 309; 312	Santos, P.A.C.	240
Ribolla, P.E.	318	Santos, R.G.	418
Rigo, A.G.	267; 470	Santos, R.M.	177
Rigolon, L.P.R.	216; 217; 233	Santos, R.R.	170; 341
Ripamonte, P.	400; 401; 417	Santos, S.D.S.	340
Rocha, A.A.	293; 351	Santos, S.S.D.	371; 445
Rocha Filho, A.N.	196	Santos, W.K.F.	400
Rocha, J.D.	250	Saraiva, N.Z.	172; 387; 395; 396; 421; 443
Rocha, J.L.	372	Sartorelli, E.S.	370
Rocha, J.L.F.	218	Satrapa, R.	314
Rocha, J.M.	463	Satrapa, R.A.	314; 362; 370; 404
Rocha, N.S.	457	Schneider, A.	184
Rodello, L.	127; 311	Schneider, C.	307
Rodrigues, A.P.R.	341	Schroeder, R.V.	267
Rodrigues, C.	229	Schumacher, R.I.	436; 437; 438; 439
Rodrigues, J.L.	182	Seneda, M.M.	183; 185; 213; 222; 224; 239; 267; 281; 282; 344; 345; 369; 370; 372; 398; 399; 470
Rodrigues, L.F.	347	Senedezi, M.L.P.	451
Rodrigues, P.H.M.	319; 320; 327; 328	Serapião, R.V.	408; 425
Rojas, N.	346; 374	Sgobero Filho, I.	239; 470
Rolim Filho, S.T.	211	Shimoya, A.	368
Rondina, D.	241; 366	Silva Junior, B.L.	195
Rosa, S.D.	275	Silva Maia, M.S.	127
Roser, J.F.	194	Silva, A.A.B.	272; 289; 290
Rossa, L.A.	274	Silva, A.E.	359
Rossi, R.O.S.D.	292	Silva, A.O.A.	309; 312; 405; 422
Rovegno, M.	357; 361	Silva, A.S.	291
Rubianes, E.	244	Silva, C.A.	448
Rubin, K.C.P.	183; 372	Silva, C.A.M.	381; 406; 409; 426
Rubin, M.I.B.	35; 381; 406; 409; 426	Silva, D.R.M.	185; 213; 224
Rufino, F.A.	398; 399	Silva, D.S.	409; 426
Rumpf, R.	135; 173; 184; 206; 308; 322; 391	Silva, E.H.S.	371
Ruyz, D.C.	346	Silva, E.S.	340
		Silva, J.C.B.	307
		Silva, J.D.A.	366
		Silva, J.F.S.	180; 199; 293; 294; 295
		Silva, J.R.V.	170; 341
		Silva, K.V.G.C.	293
S			
Sá Filho, M.F.	151; 174; 178; 209; 210; 225; 227; 228; 229; 230; 234; 235; 260; 261; 262; 265; 266; 285; 286; 287; 288; 397; 431; 443		
Sá Filho, O.G.	177; 223; 264		

Silva, L.K.X.	309; 312; 405; 422	Toniolli, R.	344
Silva, M.R.	212	Torres, A.	296
Silva, M.S.	340	Torres, C.A.A.	234; 251; 252
Silva, T.A.S.N.	308	Torres-Júnior, J.R.S.	262; 286; 376; 431
Silva, T.C.B.	186	Traldi, A.S.	307
Silveira, E.C.	239; 282	Tribulo, R.	219; 221; 276; 277; 432
Silveira, L.L.	206; 301	Trinca, L.A.	210
Simões, R. ..	357; 358; 361; 411; 416; 437; 444; 449	Trinque, C.L.A.	300
Simplício, K.M.M.G.	306	Tsuribe, P.M.	342
Siqueira Filho, E.R.	300; 305; 324; 325; 326		
Siqueira, L.C.	269	U	
Sobrinho, J.M.F.	240	Ueno, V.G.	368
Solano, O.G.	231; 232	Uvo, S.	372
Solano, R.F.	231; 232		
Soria, G.F.	287; 410; 419; 420; 421; 431	V	
Sousa, A.J.O.	405; 422	Vale Filho, V.R.	407
Sousa, B.P.A.	433	Vale, W.G.	211; 309
Sousa, D.B.	127; 311	Valério, J.	392
Sousa, F.A.C.	200	Valleriote, P.S.	310
Sousa, J.S.	309; 312; 405; 422	Van Soom, A.	5
Sousa, R.A.F.	367	Vannucci, F.S.	174; 235
Sousa, R.R.	159	Vantini, R. ..	172; 387; 395; 396; 419; 420; 421; 431; 443
Souza, A.F.	258; 280	Varago, F.C.	430
Souza, A.L.	366	Vargas, A.C.	406
Souza, F.F.	318	Vasconcelos, A.B.	430
Souza, G.V.	294; 295	Vasconcelos, J.L.M.	177; 256; 264
Souza, J.A.	240	Vasconcelos, M.F.	290
Souza, J.A.T.	245	Vasconcelos, R.S.	470
Souza, J.C.	208	Vasconcelos, T.D.	283
Souza, L.W.O.	145; 315; 316; 317; 319; 320; 321	Veliz, J.	232
Souza, R.J.	174; 346	Verechia, F.T.V.	186
Souza, R.J.	374	Viana, J.H.M. .	1; 103; 181; 189; 243; 249; 251; 252; 271; 376; 408; 425; 448
Souza, R.V.	206	Viana, K.S.	169; 471
Squires, E.L.	69; 205	Viau, P.	315; 316; 317
Stahlberg, R.	430	Vicente, W.R.R.	273; 367
Stefanello, J.R.	380	Vieira, A.D.	182
Stella, E.D.	279	Vieira, F.V.	347
Stranieri, P.	418	Vieira, M.P.	225; 228
		Vieira, R.C.	202; 203
T		Vieira, S.E.M.	346; 374
Takahira, R.K.	458	Vila, R.A.	363; 423
Tavares, L.M.T.	413; 414; 415; 428	Vilariño, M.	244
Tavares, M.	347	Vilela, E.R.	256
Tavares, M.N.	411	Villaroel, A.B.S.	241
Tedesco, A.C.	360; 379	Visintin, J.A.	352; 353; 354; 356; 357; 358; 361; 383; 411; 413; 414; 415; 416; 427; 428; 436; 437; 438; 439; 440; 444; 447; 449; 473; 474
Teixeira, A.B.	55	Vozzi, P.A.	363
Teixeira, D.I.A.	241	Vulcano, M.	452; 453
Tesolin, L.C.	233		
Testa, A.C.	198	W	
Tetzner, T.A.D. ..	172; 336; 387; 395; 396; 431; 443	Wall, R.J.	181; 407
Tolentino, R.L.L.	291	Watanabe, M.R.	350; 364; 397; 402; 418
Tomé, A.R.	455		
Tomé, R.S.	268		
Tonello, T.T.M.	350		
Tonhati, H.	431		

Watanabe, Y.F.	350; 364; 397; 402; 418; 441; 442
Wentz, K.C.	382
Werlich, D.E.	382
Wisnesck, C.A.	228
Wohlers, S.	189
Wolf, A.	360; 377; 378; 379; 387; 396
Wosiacki, S.R.	398; 399

X

Xavier, M.C.	159
-------------------	-----

Y

Yamada, C.	361; 416; 427; 428; 437; 439; 447; 474
Yamazaki, W.	172; 395; 443; 450

Z

Zahn, F.S.	300
Zamberlam, G.O.	380
Zambrini, F.N.	243; 249
Zampiva, W.K.	284
Zerbini, F.L.S.	423