



## Efeito da somatotropina bovina recombinante (rbST) na produção *in vivo* e na maturação *in vitro* de oócitos bovinos da raça Sindhi

[Effect of recombinant bovine somatotropin (rbST) on the *in vivo* production and *in vitro* maturation of bovine oocytes of the Sindhi breed]

L.G.M. Ribeiro<sup>1</sup>, B.D.M. Bastos<sup>1</sup>, M.N.P. Silva<sup>1</sup>, R.A. Oliveira<sup>1</sup>, A.F.B.P. Pinto<sup>1</sup>,  
I.R.A. Lima<sup>1</sup>, L.H.A. Melo<sup>1</sup>, R.K.C. Sousa<sup>1</sup>, P.R. Gonçalves<sup>1</sup>, H.C. Bonfa<sup>1</sup>,  
M.F. Cordeiro<sup>1</sup>, D.M. Nogueira<sup>2</sup>, R.S. Barbosa<sup>2</sup>, E.S. Lopes Júnior<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Vale do São Francisco - Petrolina, PE

<sup>2</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Semiárido - Petrolina, PE

L.G.M. Ribeiro  
<https://orcid.org/0000-0002-1691-7855>  
B.D.M. Bastos  
<https://orcid.org/0000-0002-8923-5150>  
M.N.P. Silva  
<https://orcid.org/0000-0002-6342-4674>  
R.A. Oliveira  
<https://orcid.org/0000-0002-7751-9391>  
A.F.B.P. Pinto  
<https://orcid.org/0000-0002-9100-4116>  
I.R.A. Lima  
<https://orcid.org/0000-0002-5557-0989>  
L.H.A. Melo  
<https://orcid.org/0000-0003-2767-6361>  
R.K.C. Sousa  
<https://orcid.org/0000-0001-5828-3152>  
P.R. Gonçalves  
<https://orcid.org/0000-0001-6543-7519>  
H.C. Bonfa  
<https://orcid.org/0000-0002-7601-8712>  
M.F. Cordeiro  
<https://orcid.org/0000-0003-1963-7311>  
D.M. Nogueira  
<https://orcid.org/0000-0002-3704-1485>  
R.S. Barbosa  
<https://orcid.org/0000-0003-0587-165X>  
E.S. Lopes Júnior  
<https://orcid.org/0000-0002-4790-8134>

### RESUMO

A fim de avaliar o efeito de diferentes doses da rbST sobre a dinâmica folicular, a produção e a maturação *in vitro* de oócitos, 20 vacas Sindhi, divididas em três grupos, receberam um dispositivo de progesterona intravaginal, estradiol e PGF<sub>2α</sub>, além de 2mL de solução salina (grupo controle), 250 (grupo rbST 250) ou 500mg de rbST (grupo rbST 500). Cinco dias depois, realizou-se a *ovum pick up*, e os complexos *cumulus*-oócitos (CCOs) recuperados foram selecionados, classificados e maturados *in vitro*. Os dados de contagem foram comparados pelo procedimento *glht* (*General Linear Hypothesis Test*), e os dados em porcentagem foram submetidos ao qui-quadrado, no programa estatístico R, onde as diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ . Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre os grupos quanto à quantidade de folículos e à taxa de maturação. Os grupos rbST 250 e rbST 500 foram significativamente superiores ( $P < 0,05$ ) ao grupo controle em relação ao número de folículos grandes ( $0,42 \pm 0,20$  vs. 0). O grupo rbST 500 apresentou maior ( $P < 0,05$ ) porcentagem de oócitos viáveis (91,52%) do que os grupos controle (67,85%) e rbST 250 (53,33%). A rbST aumenta o número de folículos grandes, e 500mg de rbST aumentam a porcentagem de oócitos viáveis em vacas Sindhi.

Palavras-chave: CCO, vaca, OPU, ovário, superestimulação

### ABSTRACT

*In order to evaluate the effect of different doses of rbST on the follicular dynamics, production, and in vitro maturation of oocytes, 20 Sindhi cows were divided into three groups, receiving an intravaginal progesterone device, estradiol and PGF<sub>2α</sub>, and 2mL of solution saline (Control Group), 250 (rbST 250 Group) or 500mg rbST (rbST 500 Group). Five days later, the ovum pick up was performed, and the cumulus-oocyte (CCO) complexes recovered were selected, classified, and matured in vitro. The counting data were compared by the glht (General Linear Hypothesis Test) procedure, and the percentage data were submitted to Qui-square, in the statistical program R, where differences were considered significant when  $P < 0.05$ . There was no difference ( $P > 0.05$ ) between the groups regarding follicle quantity and maturation rate. The rbST 250 and rbST 500 groups were significantly higher ( $P < 0.05$ ) than the Control group in relation to the number of large follicles ( $0.42 \pm 0.20$  versus 0). The rbST 500 group presented higher ( $P < 0.05$ ) percentage of viable oocytes (91.52%) than the Control (67.85%) and rbST 250 (53.33%) groups. rbST increases the number of large follicles and 500mg rbST increases the percentage of viable oocytes in Sindhi cows.*

Keywords: COC, cow, OPU, ovary, superstimulation

## INTRODUÇÃO

Em vacas, para iniciar a produção *in vitro* de embriões (PIV), faz-se necessária a coleta de oócitos, por ultrassonografia transvaginal, método denominado de *ovum pick up* (OPU). Porém, a significativa quantidade e a excelente qualidade de oócitos coletados são essenciais para o sucesso dessa biotécnica, o que depende também da quantidade e da qualidade de folículos ovarianos antrais produzidos. A fim de obter maior quantidade de folículos ovarianos, tem-se realizado a superestimulação ovariana por meio da aplicação de hormônios, como a somatotropina bovina recombinante (rbST), que atua aumentando os receptores para o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), acarretando o recrutamento folicular ovariano (Kozicki *et al.*, 2005). Os tratamentos de superestimulação com rbST têm sido utilizados, frequentemente, em raças bovinas consideradas possuidoras de material genético especializado no tocante ao aumento da produtividade (Kirby *et al.*, 1997; Buratini-Júnior *et al.*, 2000; Ramos *et al.*, 2007). Observa-se que o uso indiscriminado de raças especializadas em programas de PIV poderá gerar a perda de características importantes de adaptabilidade encontradas nas raças nativas, como a rusticidade e a tolerância térmica, as quais são necessárias para a obtenção de animais produtivos não só em condições ideais, mas também em regiões adversas, como o semiárido brasileiro.

A raça Sindi, apesar de ser originária do Paquistão, partilha da mesma característica das raças nativas do Brasil, ou seja, a rusticidade, apresentando grande tolerância ao calor e adaptação a ambientes adversos (Santiago, 2009). Entretanto, não há relatos sobre os efeitos da administração da rbST em doadoras de oócitos destinados à PIV da raça Sindi. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de diferentes doses de rbST sobre a dinâmica folicular, a produção e a maturação *in vitro* de oócitos de bovinos da raça Sindi.

## MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – Ceua/Embrapa Semiárido, sob o protocolo de número 03/2016. O tratamento hormonal, a OPU e a seleção dos oócitos foram realizados entre março e abril de

2018, na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Semiárido, na zona rural de Petrolina, Pernambuco, localizada a 9° 23' S de latitude e 40° 30' O de longitude, a uma altitude de 376m e com uma temperatura anual média de 26,4°C. A pluviosidade média anual é de 216,3mm, distribuídos no período de fevereiro a abril (Médias..., 2014). Já a maturação *in vitro* de oócitos foi executada no Laboratório de Fisiologia e Biotecnologia da Reprodução Animal (Lafibra), no Campus de Ciências Agrárias (CCA), na Universidade Federal do Vale do São Francisco (Univasf), localizada também em Petrolina, Pernambuco.

Foram utilizadas 20 vacas da raça Sindi, pertencentes ao Núcleo de Conservação da Raça Sindi da Embrapa Semiárido, não lactantes, com média de peso de 246,86±12,75kg, escore de condição corporal de 3,20±0,17 (numa escala de 1 a 5), idade de 4,68±0,34 anos, selecionadas após avaliação do aparelho reprodutor por ultrassonografia transretal. Os animais foram submetidos a um regime intensivo de produção, recebendo no cocho, duas vezes por dia, silagem de sorgo (*Sorghum bicolor*), bem como ração à base de milho (*Zea mays*), farelo de soja (*Glycine max*), feijão guandu (*Cajanus cajan*), sal mineral e calcário. Os animais tiveram, ainda, livre acesso à água e ao sal mineral.

Os estros das vacas foram sincronizados com a inserção intravaginal de um dispositivo liberador de progesterona (Cronipress monodose®, Biogénesis Bagó, Brasil), impregnado com 0,558g desse fármaco, o qual permaneceu na porção cranial da vagina por cinco dias. Concomitantemente à colocação do dispositivo (dia 0; D0), foi realizada a administração intramuscular da dose de 2mg de benzoato de estradiol (Ric-BE®, Tecnopec-Agener, Brasil) e de 500µg de cloprostenol (Sincrocio®, Ouro Fino, Brasil), um análogo sintético da PGF<sub>2α</sub>. As 20 vacas foram distribuídas aleatoriamente e homogeneamente, em três grupos: grupo controle (n=6), no qual as fêmeas, também no D0, receberam, por via intramuscular e na fossa isquiorretal, 2 mL de solução fisiológica a 0,9% NaCl (Fisiológico 0,9%®, Equiplex, Brasil); e os grupos rbST250 (n=7) e rbST500 (n=7), os quais receberam, pela mesma via, respectivamente, uma dose de 250 e de 500mg de rbST (BST-Boostin®, MSD Saúde Animal, Brasil).

Para a avaliação da resposta folicular ovariana, no dia da retirada do dispositivo intravaginal de progesterona (dia 5; D<sub>5</sub>), os animais foram contidos, um por vez, em brete de contenção. Foi feita a higienização da vulva e do períneo, o dispositivo intravaginal foi retirado e administraram-se 3mL de lidocaína a 2%, sem vasoconstrictor (Anestésico Bravet<sup>®</sup>, Bravet, Brasil), por via epidural baixa. Para a avaliação da resposta folicular, foi utilizado um aparelho de ultrassonografia (Aquila Vet<sup>®</sup>, Piemedical, Holanda), equipado com um transdutor setorial intravaginal de 5MHz, o qual foi introduzido na vagina do animal, permitindo a visualização dos ovários e dos folículos, que foram classificados, de acordo com o diâmetro, como pequenos (2 a 5mm), médios (6 a 10mm) e grandes (>10mm), segundo Chaubal *et al.* (2007).

Logo após a avaliação folicular, realizou-se a colheita de complexos *cumulus*-oócitos (CCOs) pelo método de *ovum pick up*, utilizando-se, para tanto, uma agulha 20G para a punção folicular (WTA, Brasil) e uma bomba de vácuo (BV-003<sup>®</sup>, WTA, Brasil), regulada com pressão de 15mL/min (De Roover *et al.*, 2004). O líquido folicular foi recuperado em um tubo Falcon (Falcon<sup>®</sup>, Corning, Brasil) de 50mL, contendo tampão fosfato salino (PBS<sup>®</sup>, Nutricell, Brasil) e 25UI de heparina sódica (Hemofol<sup>®</sup>, Cristália, Brasil). Os oócitos foram lavados com o mesmo meio utilizado para a recuperação em filtro coletor para FIV (WTA, Brasil) e vertidos em placas de Petri de 100m (Nutricell, Brasil), analisados sob estereomicroscópio de luz fria (SMZ 645<sup>®</sup>, Nikon, Japão) e classificados em diferentes graus de qualidade (I, II, III e IV), de acordo com a presença das células do *cumulus* e características do ooplasma, seguindo a classificação de Gonçalves, *et al.* (2002). Foram destinados à maturação *in vitro* apenas os CCOs de graus I, II e III.

Para a maturação *in vitro*, os CCOs foram colocados em gotas de 90µL do meio MIV, composto por TCM-199 com sais de Earle, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1,0µg/mL de hormônio folículo-estimulante (Pluset<sup>®</sup>, Hertape Calier Saúde Animal S/A, Brasil), 50µg/mL de gonadotrofina coriônica humana (Vetecor<sup>®</sup>, Hertape Calier Saúde Animal S/A, Brasil), 1,0µg/mL de estradiol, 0,2mM de piruvato de sódio e 83,4µg/mL de amicacina. As gotas foram recobertas por óleo mineral, e as

placas levadas à estufa de cultivo (TE-399, Tecnal, Brasil), por 24 horas, a 38,5°C, com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade. Ao final do processo, os CCOs maduros foram avaliados, sob estereomicroscópio de luz fria (SMZ 645<sup>®</sup>, Nikon, Japão), quanto à ocorrência e à qualidade da maturação, sendo, para tanto, avaliadas a expansão das células do *cumulus* e a ocorrência de retração nuclear.

Utilizou-se delineamento em blocos ao acaso (DBC), com dois blocos referentes aos dias de coleta (as coletas foram realizadas em dois dias), três tratamentos, totalizando 20 unidades experimentais (sendo seis animais pertencentes ao grupo controle e sete animais aos grupos rbST250 e rbST500). No primeiro dia, foram submetidos à coleta quatro animais do grupo rbST250 e três animais dos demais grupos, e, no segundo dia, foram submetidos à coleta, quatro animais do grupo rbST 500 e três animais dos demais. As variáveis taxa de maturação, taxa de recuperação, porcentagem de oócitos viáveis, porcentagem de oócitos não viáveis, graus de expansão das células do *cumulus* e porcentagem de retração foram analisadas pela ANOVA, sendo a homogeneidade de variância avaliada pelo teste de Barlett e a normalidade avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. As variáveis de contagem foram avaliadas via modelos lineares generalizados (GLM), considerando a distribuição de Poisson, e estas, quando significativas, tiveram suas médias comparadas em pares, com o auxílio do procedimento *glht* do *software* estatístico R (Hothorn *et al.*, 2008). As diferenças foram consideradas significativas quando P<0,05.

## RESULTADOS

Houve uma diferença entre o primeiro e o segundo bloco, sendo o segundo superior (P<0,05) ao primeiro, quanto aos parâmetros: número de folículos visualizados (P=0,02), número de folículos aspirados (P=0,03), oócitos levados à maturação (P=0,02) e oócitos maduros (P=0,03). Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais (P>0,05) quanto à quantidade de folículos ovarianos, bem como quanto à quantidade de oócitos recuperados. No entanto, os grupos tratados com a rbST foram superiores (P<0,05) ao grupo controle com relação ao número de folículos grandes visualizados e aspirados (Tab. 1).

Tabela 1. Efeito de diferentes doses da somatotropina bovina recombinante (rbST) sobre a produção e o tamanho (pequenos: 2 a 5mm; médios: 6 a 9mm; grandes: &gt;9mm) de folículos ovarianos em vacas Sindi

Parâmetros	Controle (média±e.p.)	rbST 250 (média±e.p.)	rbST 500 (média±e.p.)
Nº total de folículos visualizados	11,33±2,09	14,28±2,20	13,14±2,52
Pequenos	9,50±2,40	11,00±1,75	10,57±2,02
Médios	1,83±0,83	2,85±0,82	2,14±0,93
Grandes	0 <sup>b</sup>	0,42±0,20 <sup>a</sup>	0,42±0,20 <sup>a</sup>
Nº total de folículos aspirados	7,50±1,76	10,57±1,42	10,42±2,43
Pequenos	6,33±1,96	7,85±1,38	8,00±1,92
Médios	1,16±0,65	2,28±0,60	2,00±0,87
Grandes	0 <sup>b</sup>	0,42±0,20 <sup>a</sup>	0,42±0,20 <sup>a</sup>
Nº de oócitos recuperados	4,66±1,52	6,42±1,17	8,42±2,38

<sup>a,b</sup> Valores com letras sobrescritas na mesma linha são significativamente diferentes (P<0,05).

Não houve recuperação de CCOs grau I nos animais utilizados no presente trabalho. O grupo rbST 500 foi significativamente superior (P<0,05) em relação ao número de CCOs de grau II, quando comparado aos grupos controle e rbST250. As vacas não tratadas com somatotrofina bovina recombinante (rbST) (controle) e aquelas tratadas com 250mg de rbST (rbST250) apresentaram um número

significativamente maior de oócitos de grau IV (P<0,05; Fig. 1).

O grupo rbST 500 apresentou maior taxa de recuperação oocitária (P<0,05) e maior porcentagem de oócitos viáveis (P<0,05) em relação aos grupos rbST 250 e controle. A taxa de maturação oocitária foi similar (P>0,05) entre os três grupos experimentais (Tab. 2).

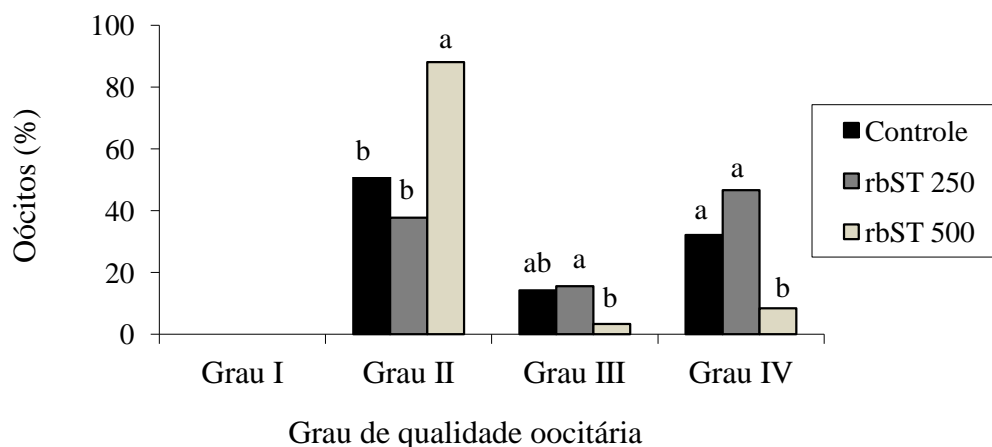


Figura 1. Qualidade dos complexos *cumulus* oócitos (CCOs) obtidos de vacas Sindi, submetidas a diferentes doses de somatotropina bovina recombinante (rbST).

<sup>a,b</sup> Letras diferentes indicam diferença entre os tratamentos (P<0,05).

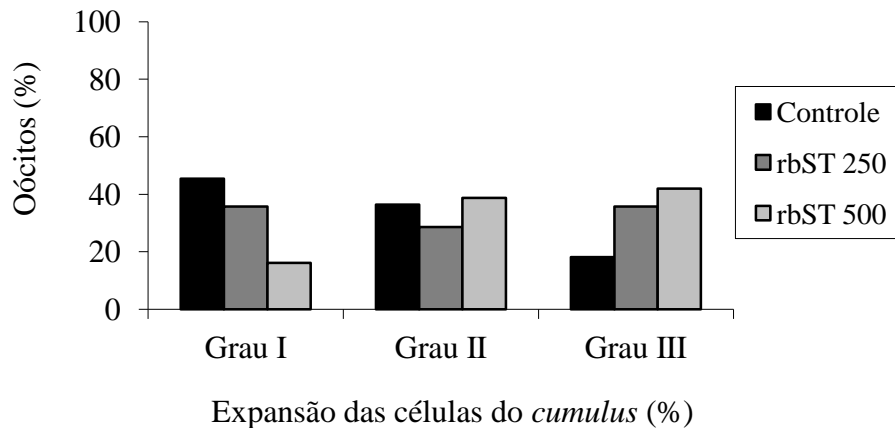
Tabela 2. Taxas de recuperação e maturação oocitária (%), bem como porcentagem de oócitos viáveis e não viáveis em vacas Sindi submetidas a diferentes doses de somatotropina bovina recombinante (rbST)

Variáveis	Controle	rbST 250	rbST 500
Taxa de recuperação oocitária	62,22 (28/45) <sup>b</sup>	60,81 (45/74) <sup>b</sup>	80,82 (59/73) <sup>a</sup>
Oócitos viáveis	67,85 (19/28) <sup>b</sup>	53,33 (24/45) <sup>b</sup>	91,52 (54/59) <sup>a</sup>
Oócitos não viáveis	32,14 (9/28) <sup>ab</sup>	46,66 (21/45) <sup>a</sup>	8,47 (5/59) <sup>b</sup>
Taxa de maturação	68,75 (11/16) <sup>a</sup>	63,63 (14/22) <sup>a</sup>	62 (31/50) <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> Valores com letras sobrescritas na mesma linha são significativamente diferentes (P<0,05).

Os grupos experimentais apresentaram resultados semelhantes ( $P>0,05$ ) com relação aos graus de expansão das células do *cumulus* (Fig. 2). A ocorrência de retração nuclear foi de 12,50%,

9,09% e 6% para os grupos controle, rbST 250 e rbST 500, respectivamente, não havendo, porém, diferença estatística entre eles ( $P>0,05$ ).



( $P>0,05$ )

Figura 2. Graus de expansão das células do *cumulus* (grau I: total; grau II: moderado; grau III: leve) de oócitos obtidos de vacas Sindí submetidas a diferentes doses de somatotropina bovina recombinante (rbST).

## DISCUSSÃO

A superioridade do segundo bloco em relação ao primeiro pode ser justificada pela variabilidade individual dos animais, mesmo que estes tenham sido distribuídos de forma homogênea entre os grupos. A administração das duas doses da rbST, 250 e 500mg, não influenciou a quantidade dos folículos ovarianos, não havendo diferença entre os grupos experimentais. Pavlock *et al.* (1996) também não observaram diferenças significativas entre o grupo controle (solução salina) e o grupo que recebeu 500mg de rbST no número de folículos produzidos, ao tratar vacas Holandesas mestiças. Sá-Filho (2006) obteve um aumento na quantidade de folículos ovarianos em búfalas que receberam 500mg de rbST ( $12,2\pm 0,86$  folículos), ao compará-las com fêmeas que não receberam o hormônio ( $8,7\pm 0,86$  folículos).

Segundo Gong (2002), o aumento da população folicular ocorre em torno de três dias após a administração da rbST, como consequência do aumento dos níveis circulantes do hormônio do crescimento (GH), fator semelhante à insulina tipo I (IGF-I) e insulina. O IGF-I, juntamente

com as proteínas carreadoras de IGF (IGFBP), os receptores de IGF, o GH e o receptor de GH constituem o eixo somatotrópico, que atua no desenvolvimento e na diferenciação de várias células e tecidos, possuindo, no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, no trato reprodutivo, na genitália externa e na glândula mamária, um efeito estimulatório e/ou sinérgico. Dessa forma, o GH e o IGF-I podem controlar a liberação de GnRH, de gonadotrofinas, além de controlarem o número de receptores para gonadotrofina nas células da granulosa (Radcliff *et al.*, 2004; Chandrashekar *et al.*, 2004).

Apesar de não influenciarem o número de folículos totais, tanto visualizados quanto aspirados, os animais que receberam a rbST apresentaram um maior número de folículos grandes, quando comparados aos animais do grupo controle. Dados contrários foram relatados em búfalas (Sá-Filho, 2006), em que o grupo tratado com a rbST apresentou um maior número de folículos pequenos ( $9,1\pm 0,6$  folículos) do que o grupo controle ( $6,5\pm 0,4$  folículos), não havendo, porém, diferença entre os grupos quanto ao número de folículos médios e grandes. Corroborando os dados do presente estudo,

Ramos *et al.* (2007) relataram um aumento no número de folículos grandes em vacas Gir, mantidas a pasto, submetidas à administração de 160mg de rbST associada a 250UI de FSH ( $6\pm 3,88$ ), em comparação aos animais tratados com solução salina ( $0,79\pm 0,98$ ). Kirby *et al.* (1997) obtiveram maior número de folículos pequenos e médios ao tratarem vacas Holandesas em lactação com 500mg de rbST. As diferenças encontradas nessas respostas podem ser justificadas pelas diferentes respostas das raças diante do mesmo tratamento hormonal (Buratini Júnior *et al.*, 2000), não havendo relatos da resposta da raça Sindi à rbST. O tamanho e a qualidade dos folículos influenciam diretamente a capacidade de desenvolvimento *in vitro* de oócitos bovinos; ademais, oócitos obtidos de folículos pequenos, além de possuírem menor diâmetro, têm uma capacidade menor de quebra da vesícula germinativa (Fair *et al.*, 1995). No presente estudo, não houve avaliação da competência oocitária, mas os oócitos obtidos de vacas Sindi tratadas com 500mg rbST apresentaram maior viabilidade do que os oócitos dos animais dos demais grupos experimentais.

Sá-Filho (2006) acredita que a espécie e a raça dos animais submetidos ao tratamento com rbST influenciam na resposta ovariana quanto ao número de folículos ovarianos produzidos, o que poderia justificar a ausência de diferença estatística entre os animais dos grupos experimentais do presente trabalho, visto que não há relatos sobre a utilização desse hormônio na superestimulação ovariana de vacas da raça Sindi. O desempenho reprodutivo das Sindi foi pouco estudado, e, apesar de apresentar alguns resultados animadores, estes ainda são bem variáveis (Santos, 2011).

Neste trabalho, houve maior porcentagem de oócitos de grau II (88,13%) e, conseqüentemente, de oócitos viáveis (91,52%) no grupo rbST 500, quando comparado aos outros dois grupos. Aller *et al.* (2012), ao trabalharem com vacas da raça Angus, mantidas a pasto, relataram uma porcentagem menor de oócitos viáveis em vacas tratadas (48%) e não tratadas com eCG (26%). Já Serrilho *et al.* (2009), quando trabalharam com vacas da raça Nelore mantidas em sistema extensivo, não obtiveram diferença na porcentagem de cada grau dos oócitos recuperados, ao compararem vacas tratadas com 500mg de rbST e solução

salina. No entanto, tais autores (Serrilho *et al.*, 2009) relataram maior número total de embriões viáveis no grupo rbST do que no grupo controle, o que reforça a competência oocitária dos animais do grupo rbST. As gonadotrofinas, como a ecG, podem gerar uma esteroidogênese folicular anormal e uma precoce maturação, além de uma possível assincronia entre o folículo e o oócito, podendo atuar de forma negativa na foliculogênese final, interferindo, conseqüentemente, nas características morfológicas do CCOs recuperados (Foot e Ellington, 1988; Aller *et al.*, 2010). A rbST, por sua vez, pode impedir a degeneração atresica oocitária, justificando a superioridade dos oócitos de grau II e dos oócitos viáveis do grupo rbST 500 (Pavlok *et al.*, 1996).

As taxas de recuperação do presente estudo (62,22%, 60,81% e 80,82% para os grupos controle rbST250 e rbST 500, respectivamente) foram superiores às relatadas por Aller *et al.* (2010), que utilizaram vacas Angus, submetendo-as ou não à administração de 9mg de FSH (37,3% para as que receberam e 32,8% para as que não receberam). Ramos *et al.* (2007) obtiveram dados contrários, ao tratarem vacas Gir com rbST, rbST + FSH e vacas não submetidas à estimulação ovariana, tendo esse último grupo apresentado maior taxa de recuperação oocitária em relação aos outros dois. Bols *et al.* (1998) e Tripp *et al.* (2000) também não observaram aumento na taxa de recuperação ao utilizarem a rbST em vacas das raças Holandesa e Hereford, respectivamente. Acredita-se que a rbST pode gerar alterações na morfologia do complexo *cumulus*-oócito e na parede do folículo, que podem interferir na recuperação do CCO (Tripp *et al.*, 2000). Contudo, em virtude da maior taxa de recuperação do grupo rbST500, é possível que as alterações morfológicas no oócito e no folículo, citadas anteriormente, tenham influenciado de modo positivo na taxa de recuperação oocitária no grupo que recebeu 500mg desse hormônio.

Segundo Iga *et al.* (1998), após avaliarem várias concentrações de rbST (0,1, 1, 10, 100 e 1000ng/mL) no meio de MIV, as maiores concentrações desse hormônio resultaram em melhores taxas de maturação *in vitro* e de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto. Pawshe *et al.* (1998) afirmam que a presença do IGF-I no meio de maturação *in vitro*,

em oócitos de bubalinos, estimula a maturação oocitária, uma vez que ele atua no controle parácrino e autócrino das células da granulosa, bem como possui ação sinérgica ao FSH, aumentando a atividade mitogênica, da esteroidogênese e da síntese de proteínas. *In vivo*, a maturação oocitária e o desenvolvimento embrionário são potencializados pelo GH (Modina *et al.*, 2007). Pavlok *et al.* (1996) trataram vacas (1000mg) e novilhas (500mg) Holandesas com rbST e solução fisiológica, abatendo-as após três dias, recuperando os folículos por dissecação, e observaram que os CCOs recuperados das vacas e novilhas tratadas com rbST alcançaram maior taxa de maturação (45,1% e 44,4%, respectivamente) quando comparados aos CCOS obtidos de vacas e novilhas tratadas com solução fisiológica (39,7% e 35,5%, respectivamente). No entanto, no presente trabalho, a rbST, administrada nos animais experimentais nas doses de 250 e 500mg, não foi suficiente para aumentar a taxa de maturação oocitária, o que reforça que animais de raças diferentes respondem de forma diferente aos tratamentos hormonais.

No presente trabalho, a rbST não influenciou os graus de expansão das células do *cumulus* nem a retração nuclear. A expansão das células do *cumulus* é mediada pelo ácido hialurônico, ocorrendo, *in vivo*, após a onda de LH, e, *in vitro*, pela presença do FSH e de fatores de crescimento no meio de maturação (Gilchrist e Thompson, 2007). Kollé *et al.* (2003) avaliaram o efeito da adição de GH no meio de maturação oocitária e observaram aumento na expansão das células do *cumulus*. Segundo Greve *et al.* (1984), a capacidade de desenvolvimento embrionário pode ser indicada pela morfologia e pelo grau de expansão das células do *cumulus*. Não há relatos na literatura da morfologia e grau de expansão das células do *cumulus* em animais tratados com rbST. Segundo Kerr *et al.* (1972), a retração nuclear é um dos sinais típicos de apoptose celular e pode ser observada em oócitos de qualidade inferior. No presente trabalho, a rbST não teve influência sobre esses parâmetros, mostrando, mais uma vez, que os animais de cada raça respondem de maneira diferente aos tratamentos hormonais.

Em conclusão, a somatotropina bovina recombinante aumenta o número de folículos grandes e, na dose de 500mg, melhora a

viabilidade dos oócitos recuperados, não influenciando, porém, a maturação *in vitro* deles. É necessária a realização de mais trabalhos para verificar a competência dos oócitos e a produção *in vitro* de embriões de vacas Sindi tratadas com a rbST.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Embrapa Semiárido, pela disponibilização dos animais experimentais; à instituição de fomento Capes, pela bolsa de pós-graduação concedida à autora L.G.M. Ribeiro.

## REFERÊNCIAS

- ALLER, J.F.; MUCCI, N.C.; KAISER, G.G. *et al.* Effect of repeated eCG treatments and ovum pick-up on ovarian response and oocyte recovery during early pregnancy in suckling beef cows. *Anim. Reprod. Sci.*, v.133, p.5-10, 2012.
- ALLER, J.F.; MUCCI, N.C.; KAISER, G.G. *et al.* Transvaginal follicular aspiration and embryo development in superstimulated early postpartum beef cows and subsequent fertility after artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.*, v.119, p.1-8, 2010.
- BOLS, P.E.J.; YSEABERT, M.T.; LEIN, A. *et al.* Effects of long term treatment with bovine somatotropin on follicular dynamics and subsequent oocyte and blastocyst yield during an OPU-IVF program. *Theriogenology*, v.49, p.983-995, 1998.
- BURATINI-JÚNIOR, J.; PRICE, C.A.; VISINTIN, J.A.; BÓ, G.A. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (bst) on ovarian follicular development in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Theriogenology*, v.54, p.421-431, 2000.
- CHANDRASHEKAR, V.; ZACZEK, D.; BARTKE, A. The consequences of altered somatotropic system on reproduction. *Biol. Reprod.*, v.71, p.17-27, 2004.
- CHAUBAL, S.A.; FERRE, L.B.; MOLINA, J.A. *et al.* Hormonal treatments for increasing the oocyte and embryo production in an OPU-IVP system. *Theriogenology*, v.67, p.719-728, 2007.
- DE ROOVER, R.; GENICOT, G.; LEONARD, S. *et al.* Ovum pick up and in vitro embryo production in cows superstimulated with an individually adapted superstimulation protocol. *Anim. Reprod. Sci.*, v.86, p.13-25, 2004.
- FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol. Reprod. Develop.*, v.42, p.437-442, 1995.

- FOOT, R.H.; ELLINGTON, J.E. Is a superovulated oocyte normal? *Theriogenology*, v.29, p.111-123, 1988.
- GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential *in vitro*. *Theriogenology*, v.67, p.6-15, 2007.
- GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. São Paulo: Roca, 2002. 408p.
- GONG, J.G. Influence of metabolic hormones and nutrition on ovarian follicle development in cattle: practical implications. *Dom. Anim. Endocrinol.*, v.23, p.229-241, 2002.
- GREVE, T.; BOUSQUET, D.; KING, W.A.; BETTERIDGE, K.J. In vitro fertilization and cleavage of in vivo matured bovine oocytes. *Theriogenology*, v.22, p.151-165, 1984.
- HOTHORN, T.; BRETZ, F.; WESTFALL, P. Simultaneous inference in general parametric models. *Biometrical J.*, v.50, p.346-363, 2008.
- IGA, K.; NIWA, K.; BARTKE, A. Recombinant bovine growth hormone stimulates nuclear maturation of bovine oocytes in vitro and promotes subsequent embryonic development. *J. Reprod. Develop.*, v.44, p.45-52, 1998.
- KERR, J.F.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, v.26, p.239-257, 1972.
- KIRBY, C.J.; SMITH, M.F.; KEISLER, D.H.; LUCY, M.C. Follicular function in lactating dairy cows treated with sustained-release bovine somatotropin. *J. Dairy. Sci.*, v.80, p.273-285, 1997.
- KOLLE, S.; STOJKOVIC, M.; BOIE, G.; WOLF, E. et al. Growth hormone-related effects on apoptosis, mitosis, and expression of connexin 43 in bovine *in vitro* maturation cumulus oophorus complexes. *Biol. Reprod.*, v.68, p.1584-1589, 2003.
- KOZICKI, L.E.; SEGUI, M.S.; FANTINI FILHO, J.C. et al. A somatotropina bovina (bst) e sua relação com o recrutamento folicular ovariano durante o ciclo estral de vacas. *Arch. Vet. Sci.*, v.10, p.35-44, 2005.
- MÉDIAS anuais da estação agrometeorológica de Bebedouro. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2014. Disponível em: <<http://www.cpatia.embrapa.br:8080/servicos/dadosmet/ceb-anual.html>>. Acessado em 19 jan. 2018.
- MODINA, S.; BORROMEO, V.; LUCIANO, A.M. Relação entre concentrações de hormônio de crescimento em oócitos bovinos e competência no desenvolvimento de fluido folicular e oócito. *J. Hist.*, v.51, p.173-180, 2007.
- PAVLOK, A.; KOUTECKÁ, L.; KREJCI, P. et al. Effect of recombinant bovine somatotropin on follicular growth and quality of oocytes in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, v.41, p.183-192, 1996.
- PAWSCHE, C.H.; RAO, K.B.; TOTEY, S.M. Effects of insulin-like growth factor-I and its interaction with gonadotropins on in vitro maturation and embryonic development, cell proliferation and biosynthetic activity of cumulus cell and granulosa cell in buffalo. *Mol. Reprod. Dev.*, v.49, p.277-85, 1998.
- RADCLIF, R.P.; VANDHAAR, M.J.; SHARMA, B.K. et al. Effect of dietary energy and somatotropin on components of the somatotropic axis in Holstein heifers. *J. Dairy Sci.*, v.87, p.1229-1235, 2004.
- RAMOS, A.A.; FERREIRA, A.M.; SÁ, W.F. et al. Efeito da somatotropina na população folicular, recuperação de oócitos e produção in vitro de embriões em vacas Gir. *Rev. Bras. Zootec.*, v.36, p.380-86, 2007.
- SÁ-FILHO, M.F. *Efeito do tratamento da somatotropina bovina recombinante (bST) na população folicular e na produção in vitro de embriões bubalinos*. 2006. 98f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- SANTIAGO, A.A. A epopéia do zebu. 2009. Disponível em: <<http://www.abcz.org.br/>>. Acessado em 19 jan. 2018.
- SANTOS, R. *Sindi: o gado vermelho para os trópicos*. Uberaba: Agropecuária, 2011.
- SERRILHO, T.V.P.; BEZERRA, G.A.; AGOSTINHO, B.F. et al. Somatotropina bovina recombinante sobre a produção de embriões bovinos *in vitro*. In: ENCONTRO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA CESUMAR, 6., 2009, Maringá. *Anais...*, Maringá: Cesumar, 2009.
- TRIPP, M.W.; JU, J.C.; HOAGLAND, T.A. et al. Influence of somatotropin and nutrition on bovine oocyte retrieval and in vitro development. *Theriogenology*, v.53, p.1581-1590, 2000.