

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

EFEITO DE DOSE REDUZIDA DE SOMATOTROPINA
BOVINA RECOMBINANTE ASSOCIADA A PROTOCOLOS
DE SUPEROVULAÇÃO NA FERTILIDADE DE EMBRIÕES
TRANSFERIDOS PARA RECEPTORAS EM LACTAÇÃO

THIAGO GUZELLA GUIDA

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós- Graduação em Zootecnia como
parte das exigências para obtenção do
título de Mestre.

BOTUCATU – SP
Dezembro – 2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

EFEITO DE DOSE REDUZIDA DE SOMATOTROPINA
BOVINA RECOMBINANTE ASSOCIADA A PROTOCOLOS
DE SUPEROVULAÇÃO NA FERTILIDADE DE EMBRIÕES
TRANSFERIDOS PARA RECEPTORAS EM LACTAÇÃO

THIAGO GUZELLA GUIDA
Médico Veterinário

Orientador: Prof. Ass. Dr. José Luiz Moraes Vasconcelos

Dissertação apresentada ao Programa
De Pós-Graduação em Zootecnia como
parte das exigências para obtenção do
título de Mestre.

BOTUCATU – SP
Dezembro - 2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

Guida, Thiago Guzella, 1986-

G946e Efeito de dose reduzida de somatotropina bovina recombinante associada a protocolos de superovulação na fertilidade de embriões transferidos para receptoras em lactação / Thiago Guzella Guida. - Botucatu : [s.n.], 2014
ix, 49 f. : il., tabs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2014

Orientador: José Luiz Moraes Vasconcelos

Inclui bibliografia

1. Somatotropina bovina. 2. Bovino - Transferência de embriões. 3. Bovino de leite - Fecundidade. I. Vasconcelos, José Luiz Moraes. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. III. Título.

DEDICATÓRIA

Dedico com toda gratidão, aos meus pais, **José Antônio Guida** e **Cristiane Helena Guzella Guida**. Pelo exemplo de caráter, fé e perseverança; pelo amor incondicional; pelo esforço e dedicação total à minha formação; pela confiança depositada; pela educação e ensinamentos que me fizeram uma pessoa boa e honesta, que aprendeu no berço a lutar e conquistar os objetivos, sem nunca me esquecer do próximo. E a toda minha família, por me ajudar em todos os momentos, confiando, me apoiando e orando por mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e Nossa Senhora, por iluminarem meu caminho, me guiando e protegendo, e me dando força durante as minhas “lutas”. Agradeço a eles, pois com muito amor e a fé, sempre consegui alcançar meus objetivos.

Em especial aos meus pais, por tudo que fizeram para que eu chegasse até aqui. E a toda minha família que é o alicerce firme que me sustenta.

A minha namorada Samadhi, por entrar em minha vida e dividir comigo bons e maus momentos. Nos bons, aproveitamos intensamente os prazeres da vida, extraindo o melhor de tudo, com alegria e felicidade. Nos maus, lutamos juntos para superar os obstáculos e dificuldades, ajudando um ao outro a extrair o que há de bom, transformando os desafios em aprendizado e experiência para buscar a felicidade plena.

A todos os meus professores, desde o ensino básico até a graduação, pela dedicação em me ensinar, educar e conduzir ao caminho certo, me capacitando para que eu chegasse até aqui.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Luiz Moraes Vasconcelos, pela oportunidade ímpar de realizar esse trabalho junto ao seu grupo de pesquisa, pela experiência transmitida, pelas cobranças, pelo reconhecimento do meu esforço, e por tudo que colaborou para meu conhecimento, aprendizado e amadurecimento acadêmico e pessoal.

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), que com excelência, me concedeu o grau de Médico Veterinário e agora vem me dar o título de mestre.

A todos os meus amigos desde a infância que dividiram comigo e fizeram parte da minha formação. Aos amigos de pós-graduação pela colaboração direta para o sucesso desse trabalho: Augusto, Carlos Sanches, Tiago Leiva, Tiago Martins,

Fernanda, Fernando, Everton, Marcos, Lucas, João Pedro, Henrique, Adnan e Rogério, Wedson, Francisco, Anderson.

Aos meus companheiros de turma e de “Republica”, Bruno Massa (Cu), Fábio Possebon (Cid), Luiz Fernando (Gão), Luiz Felipe (Fly), pela convivência de quase 10 anos, que me acrescentou muito, tanto pessoal como profissionalmente.

Aos membros da Conapex Jr., pelo companheirismo e disposição a ajudar durante a realização dos experimentos.

A empresa Pioneiros, pela fantástica experiência profissional e pessoal que me proporcionaram. Aos amigos que lá fiz, pelos ensinamentos, companheirismo nos momentos sérios, e também na descontração (Márcio, Flavio, Kiefer, Júlio, Gândara, Denilson, Paulo, Felipe Pitanga, Felipe Camacho, Tchesco, Tiago Mesquita, Renato, André, Lurdes, Lori, Joselí, Leila, Carol, Daiane, Pâmela, Jader, Pedro, Daniele, Carlos e todos os estagiários que trabalharam conosco).

Ao Carlos Sanches, pela parceria e ajuda na condução dos experimentos, pela amizade sincera, pelas dificuldades que somente juntos conseguimos superar, pelas várias madrugadas de trabalho, mas também de festas, pelas longas viagens para conseguir estar presente nas reuniões em Botucatu, e por tudo que passamos para realizarmos nossos trabalhos com excelência.

Aos funcionários da sessão de Pós-Graduação da UNESP – Botucatu: Seila e Ellen; Departamento de produção Animal: Renato e José Luís Barbosa, pela disposição e prontidão para ajudar.

Aos membros da banca de qualificação, Prof. Dr. José Buratini Jr e Prof. Dr. Fabíola Freitas Paula Lopes e membros da banca examinadora, Prof. Dr. José Buratini Jr e Prof. Dr. Heraldo César Gonçalves, pelas sugestões e críticas que contribuíram para melhoria da dissertação.

A empresa Elanco do Brasil, pelo apoio durante a realização do projeto.

A todos os funcionários e proprietários das fazendas pela ajuda e compreensão da importância da realização dos experimentos.

A todos os animais envolvidos no experimento, pela grande quantidade de informações disponibilizadas.

A CAPES, pela bolsa concedida.

E a todos que de alguma forma contribuíram para o sucesso desse trabalho.

Meus sinceros agradecimentos!

“É preciso lembrar que sempre há um futuro, um futuro que é inevitavelmente incerto. Com isso, eu não quero dar uma mensagem de pessimismo, uma vez que a incerteza pode terminar tanto positiva quanto negativamente, com a vantagem de que o ser humano tem o poder de inclinar a balança a seu favor.”

Roberto Gómez Bolaños

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

SUMÁRIO	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
SUMÁRIO DE TABELAS	ix
SUMÁRIO DE FIGURAS	ix
CAPÍTULO 1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS	1
1. Introdução.....	2
2. Revisão de literatura.....	4
2.1. Morte embrionária e fetal, e reconhecimento materno de gestação	4
2.2. Hormônio do crescimento bovino (bGH ou bST), Fator de crescimento semelhante a insulina (IGF) e eixo somatotrópico.....	6
2.2.1. Hormônio do crescimento bovino (bGH) ou Somatotropina bovina (bST).....	6
2.2.2. Fator de crescimento semelhante a insulina (IGF).....	7
2.2.3. Eixo somatotrópico	7
2.2.4. Efeitos da bST na lactação	8
2.2.5. Efeitos da bST nos tecidos reprodutivos e consequências para a fertilidade em vacas leiteiras	9
3. Referências.....	17
CAPÍTULO 2 EFEITO DE DOSE REDUZIDA DE SOMATOTROPINA BOVINA RECOMBINANTE ASSOCIADA A PROTOCOLOS DE SUPEROVULAÇÃO NA FERTILIDADE DE EMBRIÕES TRANSFERIDOS PARA RECEPTORAS EM LACTAÇÃO	27
Resumo.....	28
Abstract	29
1. Introdução e justificativas do estudo.....	30
2. Materiais e métodos	31
2.1. Animais e tratamentos	31
2.2. Coleta e transferência de embriões.....	33
2.3. Avaliações ultrassonográficas e diagnóstico de gestação	34
2.4. Amostras de sangue, escore de condição corporal, produção de leite e DEL.	34
2.5. Análise estatística.....	35
3. Resultados	36
4. Discussão.....	39
5. Referencias.....	43
CAPÍTULO 3 CONSIDERAÇÕES GERAIS E IMPLICAÇÕES.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

- [P4]- concentração de progesterona
- BE – Benzoato de Estradiol
- BEN – Balanço Energético Negativo
- BEP – Balanço Energético Positivo
- Bi – Blastocisto Inicial
- bGH – Hormônio do Crescimento Bovino
- BL – Blastocisto
- BX – Blastocisto expandido
- CL – Corpo Lúteo
- DEL – Dias em Lactação
- DG – Diagnóstico de Gestação
- E2 – Estrógeno
- ECP – Cipionato de Estradiol
- FIV – Fertilização *In Vitro*
- FSH – Hormônio folículo Estimulante
- GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
- GH – Hormônio do crescimento
- GHBP – Proteínas de Ligação do Hormônio do Crescimento
- GHR – Receptor de Hormônio do Crescimento
- GHRH – Hormônio Liberador de Hormônio do Crescimento
- IA – Inseminação Artificial
- IATF – Inseminação Artificial em Tempo Fixo
- IFN- τ – Interferon - Tau

IGF – Fator de Crescimento Semelhante à Insulina

IGFR – Receptor de Fator de Crescimento Semelhante à Insulina

IGFBP – Proteína de Ligação do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina

IM – Intramuscular

LH – Hormônio Luteinizante

MO – Mórula

NF – Não fertilizado

NH₂ – Radical amina

P/IA – Prenhez por inseminação artificial

P/TE – Prenhez por transferência de embrião

P4 – Progesterona

PGF2 α – Prostaglandina F2 α

RNA_m – RNA mensageiro

TE – Transferência de Embrião

TETF – Transferência de Embrião em Tempo Fixo

SUMÁRIO DE TABELAS

Capítulo 2

Página

Tabela 1.	36
Concentração de IGF1 no d7, número de estruturas por coleta (estruturas totais, não fertilizadas, degeneradas e transferíveis) por tratamento e categoria da doadora – LSM±SEM.	
Tabela 2.	38
Número de embriões por coleta de acordo com o estágio de desenvolvimento e grau de qualidade por tratamento e categoria da doadora – LSM±SEM.	
Tabela 3.	38
Prenhez por TE (P/TE) aos 30 e 60 dias de acordo com a qualidade do embrião, ordem de lactação apresentação de cio da receptora – LSM %.	
Tabela 4.	39
Prenhez por TE (P/TE) aos 30 e 60 dias por tratamento de acordo com o estágio de desenvolvimento do embrião transferido – LSM % (com n/n entre parênteses).	

SUMÁRIO DE FIGURAS

Capítulo 2

Figura 1.	32
Esquematização do delineamento experimental.	

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. Introdução

A produção de leite por vaca aumentou durante os últimos anos, devido a combinação de melhor gestão, nutrição e seleção genética focada no aumento da produção, deixando de lado a fertilidade, o que levou a uma diminuição na eficiência reprodutiva (LUCY, 2001). Butler (1998) documentou declínio de aproximadamente 25 pontos percentuais na taxa de concepção ao primeiro serviço de 1951 a 1996. Apesar da correlação genética antagônica entre produção e reprodução, a herdabilidade para características que medem a fertilidade é baixa, portanto há outros fatores que influenciam a fertilidade da vaca (HANSEN, 2000).

Trabalhos têm mostrado que vacas em lactação apresentam concentração sérica de esteroides (SARTORI ET AL., 2002a; WILTBANK ET AL., 2012) e IGF1 (BILBY ET AL., 2004; BILBY ET AL., 2006) menores quando comparadas a vacas não lactantes, o que pode estar associado à baixa fertilidade de vacas leiteiras.

Vacas em lactação sofrem com os efeitos deletérios do estresse térmico, com menor taxa de fertilização e menor desenvolvimento embrionário que novilhas no verão (SARTORI ET AL., 2002b). Maior produtividade também está associada à maior sensibilidade das vacas aos efeitos negativos do estresse calórico na fertilidade, como demonstrado por Al-Katanani et al. (1999) nos Estados Unidos e por Lopez-Gatius (2003) na Espanha, quando analisaram os efeitos da produção e estação do ano nos índices de fertilidade. O calor promove efeitos deletérios nos folículos (ROTH ET AL., 2000; ROTH ET AL., 2001a; ROTH ET AL., 2001b; WOLFENSON ET AL., 1995; WOLFENSON ET AL., 2000) e nos embriões no início do desenvolvimento (EALY ET AL., 1993; HANSEN, 2007; PUTNEY ET AL., 1988).

Estes fatores estão associados a alta taxa de perda embrionária e fetal (SANTOS ET AL., 2004b). As taxas de fertilização em animais lactantes 5 dias após ovulação (SARTORI ET AL., 2002b) ou 7 dias após inseminação de vacas superovuladas (MOREIRA ET AL., 2002a) varia entre 55,3 a 75,2%, porém relatos mostram índices inferiores a 45% de concepção no diagnóstico de gestação entre 25 e 49 dias após inseminação, tanto na inseminação artificial em tempo fixo (IATF) (CHEBEL ET AL., 2004; CHEBEL ET AL., 2006; CHEBEL ET AL., 2010; CHEBEL E SANTOS, 2010; PEREIRA ET AL., 2013a; PEREIRA ET AL., 2013b; PEREIRA ET AL., 2014; VASCONCELOS ET AL., 1999) como após

observação de cio natural (CHEBEL ET AL., 2004; CHEBEL E SANTOS, 2010; PURSLEY ET AL., 1997; PURSLEY ET AL., 2012; SANTOS ET AL., 2004a).

A Transferência de embriões (TE) vem sendo utilizada como estratégia para aumentar a fertilidade, pois permite que as vacas recebam um embrião de boa qualidade, minimizando possíveis problemas na qualidade do oócito e do embrião, como período longo de dominância folicular (CERRI ET AL., 2009; SANTOS ET AL., 2010); baixa concentração de progesterona durante o crescimento do folículo ovulatório (WILTBANK ET AL., 2012) e durante o desenvolvimento inicial do embrião (MANN ET AL., 2006). A TE também minimiza os efeitos deletérios do estresse térmico prévios a TE (HANSEN, 2007), aumentando a concepção quando comparada às taxas obtidas com IA, tanto nos Estados Unidos (AL-KATANANI ET AL., 2002; DROST ET AL., 1999), como no Brasil (DEMETRIO ET AL., 2007; PEREIRA ET AL., 2013b; VASCONCELOS ET AL., 2006; VASCONCELOS ET AL., 2011c; VASCONCELOS ET AL., 2011a; VASCONCELOS ET AL., 2011b).

Outra estratégia que vem sendo estudada para aumentar a fertilidade é a utilização do hormônio de crescimento bovino (bGH) ou somatotropina bovina (bST), que estimulam a produção e secreção de IGF1. A ação do IGF1 é importante para o controle do crescimento folicular (LUCY, 2000; LUCY ET AL., 2001; LUCY, 2001,2011) e para o desenvolvimento do embrião (BILBY ET AL., 2004; BILBY ET AL., 2006). Além disso, estudos demonstraram que o IGF1 também apresenta efeito importante contra o choque térmico, pois reduz a apoptose celular em estágios iniciais de clivagem, acelerando o desenvolvimento embrionário inicial (BLOCK ET AL., 2008; HANSEN, 2007; JOUSAN E HANSEN, 2004). Estudos recentes têm mostrado que a bST e/ou IGF1 podem aumentar a fertilidade, como demonstrado pela maior manutenção da gestação observada em alguns trabalhos (BLOCK ET AL., 2003; BLOCK E HANSEN, 2007; MOREIRA ET AL., 2000; MOREIRA ET AL., 2001; MOREIRA ET AL., 2002a; RIBEIRO ET AL., 2014; SANTOS ET AL., 2004a).

O presente trabalho pretende avaliar se a associação de dose reduzida de bST ao protocolo de superovulação melhora a produção de embriões e a manutenção da gestação.

2. Revisão de literatura

2.1. Morte embrionária e fetal, e reconhecimento materno de gestação

As mortes embrionárias (da fertilização até 42d) ou fetais (acima de 42d até o parto) reduzem a fertilidade e rentabilidade nas propriedades leiteiras. Além disso, vacas lactantes são mais susceptíveis a falhas reprodutivas quando comparadas a fêmeas de corte ou leiteiras não lactantes (AL-KATANANI ET AL., 1999; INSKEEP, 2004; LUCY, 2001; SANTOS ET AL., 2004b; SARTORI ET AL., 2002b).

Falhas de fertilização explicam apenas em parte os baixos índices reprodutivos das vacas lactantes. Relatos mostram uma taxa de fertilização em vacas de corte lactantes de 75%, contra 98,6% e 88% de vacas de corte não lactantes e novilhas respectivamente, enquanto que em vacas leiteiras, as taxas de fertilização foram semelhantes para animais lactantes (76,2%) ou não (78,1%) (SANTOS ET AL., 2004b). No entanto, a concepção quase sempre se limita a índices médios de prenhez inferiores a 45% no diagnóstico com 25-49 dias de gestação de vacas leiteiras submetidos à IATF (CHEBEL ET AL., 2004; CHEBEL ET AL., 2006; CHEBEL ET AL., 2010; CHEBEL E SANTOS, 2010; PEREIRA ET AL., 2013a; PEREIRA ET AL., 2013b; PEREIRA ET AL., 2014; VASCONCELOS ET AL., 1999) ou inseminados após observação de cio natural (CHEBEL ET AL., 2004; CHEBEL E SANTOS, 2010; PURSLEY ET AL., 1997; PURSLEY ET AL., 2012; SANTOS ET AL., 2004a) o que mostra claramente, a morte embrionária é um grande entrave para a reprodução. Aos 5-6 dias após inseminação, 50% das estruturas avaliadas são viáveis em vacas lactantes, 57,9% em vacas não lactantes e 71% em novilhas, submetidas à inseminação convencional (sem superovulação) (SANTOS ET AL., 2004b). Em animais superovulados relatou-se uma taxa de 66,8% de embriões viáveis aos 7d após a inseminação, sendo 64,3% em vacas não lactantes e 75,2% em vacas lactantes (MOREIRA ET AL., 2002a).

Thatcher et al. (1994), estimaram uma perda de cerca de 40% dos 8 aos 17 dias de gestação. Santos et al. (2004b) reuniram informações e estimaram perda embrionária de aproximadamente 12,8% entre 30 e 45d de gestação, o que representa uma perda de aproximadamente 0,85 pontos percentuais ao dia. Vasconcelos et al. (2011c) relatam perda de gestação entre 28 e 60 dias de 13% na IATF e 19% na TETF. Em outro trabalho a taxa de perda relatada foi de 6,2% em animais submetidos à IATF, e 17,6% na TETF (PEREIRA ET AL., 2013b). No verão, Pereira et al. (2013a) observaram uma

perda de 15,4% em animais submetidos à IATF. Chebel et al. (2006) reportaram uma taxa geral em torno de 20% de perda de gestação entre 31 e 60d após IA.

Estimam-se índices menores que 20% de perda fetal, dos 42 d até o parto (SANTOS ET AL., 2004b). Fica evidente que as mortes embrionárias são mais intensas no início da gestação e diminuem à medida que a gestação avança, representando cerca de 60% de perda desde a fertilização até o parto.

Um dos pontos cruciais para a manutenção da prenhez é o reconhecimento materno da gestação, que ocorre por volta do dia 17 após IA, mediado pela ação do interferon-tau (IFN- τ), hormônio produzido pelo embrião durante seu desenvolvimento e alongamento, cuja ação parácrina no endométrio materno suprime a transcrição de genes para receptores de ocitocina (OTR) e de estradiol (E2R), impedindo assim o início da cascata de produção da PGF2 α , inibindo a luteólise (THATCHER ET AL., 1994). Cabe aqui mencionar a importância da unidade materna nesse processo, através da produção e secreção endometrial de histotrofo, modulação e secreção de fatores de crescimento e outras proteínas para o oviduto e útero, que influenciam no desenvolvimento embrionário, e consequentemente no reconhecimento da gestação (THATCHER ET AL., 1994). Evidentemente, quaisquer fatores que afetem a unidade conceito-materna podem afetar o reconhecimento materno e a manutenção da gestação.

O estresse térmico, por exemplo, pode afetar negativamente o reconhecimento materno, pois reduziu o tamanho do conceito recuperado 17 dias após IA em vacas de corte (BIGGERS ET AL., 1987) e também foi associado à maior produção de PGF2a *in vitro* (PUTNEY ET AL., 1988) e *in vivo* (WOLFENSON ET AL., 1993). Além disso, o calor promove efeitos deletérios nos folículos, oócitos (ROTH ET AL., 2000; ROTH ET AL., 2001a; ROTH ET AL., 2001b; WOLFENSON ET AL., 1995; WOLFENSON ET AL., 2000) e embriões no início do desenvolvimento (EALY ET AL., 1993; HANSEN, 2007; PUTNEY ET AL., 1988).

Fica claro que as perdas embrionárias precoces representam um dos principais problemas para fertilidade da vaca de alta produção, portanto algumas estratégias devem ser utilizadas, visando reduzir as perdas e favorecer o reconhecimento materno, e consequentemente melhorar a manutenção de gestação.

2.2. Hormônio do crescimento bovino (bGH ou bST), Fator de crescimento semelhante a insulina (IGF) e eixo somatotrópico

2.2.1. Hormônio do crescimento bovino (bGH) ou Somatotropina bovina (bST)

O hormônio do crescimento bovino (bGH) ou somatotropina bovina (bST) é um hormônio naturalmente produzido e secretado pela pituitária anterior em bovinos (ETHERTON E BAUMAN, 1998). O bGH é conhecido há quase um século, e no início da década de 1980 foi desenvolvido o bGH sintético, chamado de somatotropina bovina recombinante (rbST), pois foi desenvolvida através da tecnologia molecular recombinante. Com o advento da rbST se intensificaram os estudos relacionados a esse hormônio. Para facilitar o entendimento durante essa revisão, usamos a sigla bST para reportar ao hormônio sintético e bGH para o hormônio endógeno.

O bGH é uma cadeia polipeptídica com quatro variantes: 190 aminoácidos com uma fenilalanina no radical amina (NH_2) ou 191 aminoácidos com uma alanina na terminação NH_2 , e ambas podem apresentar uma Leucina ou uma Valina na posição 127 da cadeia (WOOD ET AL., 1989). A bST comercial (Monsanto, St. Louis, MO) é uma cadeia de 190 aminoácidos com leucina na posição 127, diferenciada do bGH pela adição de uma metionina extra na terminação NH_2 .

A regulação da produção e secreção do bGH é realizada por um sistema que envolve hormônios, receptores e segundos mensageiros (ETHERTON E BAUMAN, 1998). Os principais hormônios envolvidos são dois peptídeos hipotalâmicos que controlam a secreção do GH: o hormônio liberador de GH (GHRH), que estimula a síntese e secreção da somatotropina; e a somatostatina que inibe a secreção sem alterar a síntese do hormônio de crescimento (CUTTLER, 1996). Outros fatores como idade, composição corporal, esteroides, alimentação, stress, exercícios e gênero estão envolvidos na regulação da secreção de GH.

Como o próprio nome diz, o bGH afeta o crescimento animal. Contudo, sua atividade não se restringe aos animais em crescimento, estando hoje claro que muitos processos metabólicos e fisiológicos nos animais adultos são controlados pela pelo bGH, através do chamado eixo somatotrófico, composto pelo bGH, fatores de crescimento semelhante a insulina 1 e 2 (IGF1 e 2), proteínas de ligação (GHBP e

IGFBP 1 a 6) e seus respectivos receptores celulares (ETHERTON E BAUMAN, 1998; LUCY, 2011).

A maioria dos receptores de GH (GHR) é encontrada no fígado (HAUSER ET AL., 1990) e sua ativação causa aumento da síntese e secreção dos fatores de crescimento semelhante à insulina (IGFs) (ETHERTON E BAUMAN, 1998). No entanto, após ser liberada pela pituitária, o bGH é capaz de atuar em praticamente todos os tecidos, pois seus receptores são encontrados em todo o corpo, inclusive nos tecidos reprodutivos como ovário, oviduto, endométrio, miométrio (KIRBY ET AL., 1996), células do cúmulo de ovócitos e em células da massa embrionária e trofoblastos de embriões (IZADYAR ET AL., 1997; IZADYAR ET AL., 2000).

2.2.2. Fator de crescimento semelhante a insulina (IGF)

O IGF1 e o IGF2 são fatores de crescimento peptídicos, membros de um grande grupo de hormônios relacionados à insulina, e possuem 70 e 67 aminoácidos respectivamente (HUMBEL, 1990). Ambos têm a estrutura molecular e função intimamente relacionadas, mas aparentemente IGF1 exerce papel primário nos tecidos (LUCY, 2011), portanto nessa dissertação, nos reportaremos primariamente ao IGF1.

A produção e liberação de IGF1 é 100% dependente da ação endócrina da somatotropina (GLUCKMAN ET AL., 1987), e como mencionado anteriormente, a maioria dos GHRs estão no fígado, e sua ativação aumenta a produção e secreção de IGF1, que é liberado na circulação exercendo ação endócrina nos tecidos. Enquanto que a ativação dos GHRs em outros tecidos promove a produção local de IGF, que nesse caso pode exercer também função parácrina ou autócrina. Nos ovários, por exemplo, tanto a ação sistêmica como a ação local dos fatores de crescimento, estão envolvidas no controle fisiológico da função reprodutiva (LUCY, 2011).

Os receptores de IGF1 são glicoproteínas encontradas na superfície celular em praticamente todos os tecidos do organismo, tais como tecidos reprodutivos, onde é expressa na maioria das células (SPICER E ECHTERNKAMP, 1995).

2.2.3. Eixo somatotrófico

O eixo somatotrófico, composto pelo bGH, IGF1, proteínas de ligação (GHBP e IGFBP 1 a 6) e seus respectivos receptores celulares, controla o crescimento em animais

jovens, e muitos processos metabólicos e fisiológicos nos animais adultos, como por exemplo lactação e reprodução (ETHERTON E BAUMAN, 1998; LUCY, 2011). Esse sistema funciona através da sensibilização de receptores de bGH nos tecidos, principalmente no fígado (HAUSER ET AL., 1990), que estimula a produção e secreção de IGF1, o qual exerce função endócrina, parácrina e autócrina nas células (GLUCKMAN ET AL., 1987).

Quando o eixo está acoplado, ou seja, há grande quantidade de GHR expressa no fígado, a liberação de bGH pela pituitária ativa esses receptores, estimulando a produção e secreção de IGF1, que é liberado para circulação sanguínea e junto com o bGH exercem papel importante para o crescimento e/ou aumento da atividade metabólica das células em praticamente todos os tecidos. Essa condição é evidente em animais jovens no período de crescimento, e nos animais em balanço energético positivo (BEP). No entanto a restrição alimentar, por exemplo, pode levar ao desacoplamento desse eixo, ou seja, quando a expressão e/ou ativação dos GHRs e expressão de GHBP do fígado é reduzida, diminuindo ou até cessando a produção e secreção de IGF1, que também é responsável pelo *feedback* negativo para produção e secreção de bGH. Ocorre, portanto um aumento nos níveis séricos de bGH, enquanto que os níveis de IGF1 se mantêm baixos, condição que claramente está associada ao comprometimento da função reprodutiva (LUCY, 2011). Essa condição é muito frequente em vacas leiteiras no período pós-parto, devido ao intenso balanço energético negativo (BEN). Essa alteração hormonal modifica o metabolismo tecidual e a partição de nutrientes para favorecer a lactação (ETHERTON E BAUMAN, 1998), mas inviabiliza a reprodução (LUCY ET AL., 2001).

A nutrição e balanço energético influenciam diretamente o eixo somatotrópico, pois os níveis séricos de glicose e insulina estão positivamente correlacionados com a concentração sérica de IGF1, portanto níveis mais altos de glicose e insulina estão relacionados ao acoplamento do eixo somatotrópico (LUCY ET AL., 2013), o que é imprescindível para a fisiologia reprodutiva (ARMSTRONG ET AL., 2002; GONG, 2002; LUCY ET AL., 2001; LUCY, 2011).

2.2.4. Efeitos da bST na lactação

Relata-se que utilização de bST em vacas leiteiras resulta em aumento de 7 a 41% na produção de leite, sendo que, na média, o rendimento é aumentado cerca de 10

a 15%, e a eficiência da resposta ao tratamento com bST depende da qualidade de gestão, principalmente da nutrição dos animais (BADINGA ET AL., 1985; BAUMAN, 1992; ETHEERTON E BAUMAN, 1998).

Os efeitos da bST na lactação podem ocorrer pela ação direta do hormônio de crescimento no metabolismo de diferentes tecidos e na partição de nutrientes para a glândula mamária, bem como indiretamente através do eixo somatotrófico pela ação do IGF1 (ETHEERTON E BAUMAN, 1998). Adicionalmente, as respostas ao tratamento com bST na produção de leite parecem ser menos intensos no início da lactação e aumenta com o passar do tempo (MCDOWELL, 1991). Isso reforça a importância do acoplamento do eixo somatotrófico para a lactação e sugere não só o bGH, mas também o IGF1 possui um papel importante para o aumento da produção em resposta a injeção de bST (ETHEERTON E BAUMAN, 1998).

2.2.5. Efeitos da bST nos tecidos reprodutivos e consequências para a fertilidade em vacas leiteiras

A bST pode atuar diretamente no controle das funções reprodutivas, pois a expressão de GHR foi observada no ovário, oviduto, endométrio, miométrio (KIRBY ET AL., 1996), células do cumulus de ovócitos e em células da massa embrionária e trofoblastos em todas as fases de desenvolvimento até 9 dias após fertilização (IZADYAR ET AL., 1997; IZADYAR ET AL., 2000). Lucy et al. (1993a), relatou que a maioria dos GHRs encontrados no ovário, está expressa em células lúteas grandes. No entanto, no organismo, a maioria desses receptores é encontrada no fígado (HAUSER ET AL., 1990), e quando ativados pelo hormônio de crescimento, causa aumento da produção e secreção de IGF1 (ETHEERTON E BAUMAN, 1998), que também exerce papel importante no metabolismo e função reprodutiva (LUCY, 2011). O IGF-I age em sinergia com as gonadotropinas e favorece o crescimento folicular (GONG, 2002; LUCY, 2000; SPICER ET AL., 2002). Alguns trabalhos mostraram o tratamento com bST altera o recrutamento folicular, aumentando o número de folículos recrutados (DE LA SOTA ET AL., 1993; GONG ET AL., 1991; GONG ET AL., 1993a; GONG ET AL., 1997; KIRBY ET AL., 1997a), e também pode aumentar o tamanho dos folículos (DE LA SOTA ET AL., 1993; KIRBY ET AL., 1997b; LUCY ET AL., 1993b).

Jimenez-Krassel et al. (1999) relataram efeito da bST nos folículos grandes, observando aumento do número de folículos dominantes e aumento da taxa de ovulação

de vacas leiteiras tratadas, nesse caso, com infusão pulsátil de bST. Lucy et al. (1993b) não observou efeito da bST na taxa de ovulação.

Além da ação no recrutamento, e no crescimento folicular, outros estudos mostraram alteração no momento da emergência e comprimento das ondas foliculares (KIRBY ET AL., 1997a; KIRBY ET AL., 1997b; LUCY ET AL., 1994), o que pode explicar em partes as alterações no tamanho folicular observadas em animais tratados com bST.

A maioria dos estudos não observou efeito do tratamento em aumentar o número de folículos que atingem dominância (GONG ET AL., 1991; GONG ET AL., 1993a; GONG ET AL., 1993b; KIRBY ET AL., 1997a; KIRBY ET AL., 1997b; LUCY ET AL., 1993a; LUCY ET AL., 1993b; LUCY ET AL., 1994), sugerindo que bST não aumenta ovulações múltiplas e gestações gemelares. No entanto o tratamento com bST, aumenta a produção de leite e a sensibilidade das vacas ao estresse térmico, o que pode então levar à menor esteroidogênese causada pelo efeito do calor nos folículos (ROTH ET AL., 2000; WILSON ET AL., 1998; WOLFENSON ET AL., 1995), associada ainda, à maior metabolização de esteroides devido à alta produção (SANGSRITAVONG ET AL., 2002; VASCONCELOS ET AL., 2003), fatores que podem prejudicar a dominância folicular e consequentemente aumentar a taxa de ovulações múltiplas.

Estudos e revisões mais detalhadas sobre o papel do IGF1 no crescimento, desvio e dominância folicular mostraram que dentre inúmeros outros fatores, IGF1 endócrino provavelmente tenha maior importância para o crescimento inicial de folículos pré-antrais, enquanto que o IGF local (intra-folicular), provavelmente seja mais importante para processo que determina a dominância, bem como para o crescimento e desenvolvimento do folículo dominante (ARMSTRONG ET AL., 1998; BURATINI ET AL., 2007; BURATINI E PRICE, 2011; BURATINI JR, 2007; FORTUNE ET AL., 2004; SANCHEZ E SMITZ, 2012; SPICER E ECHTERNKAMP, 1995; SPICER ET AL., 2002; SPICER E AAD, 2007; WEBB ET AL., 2004; WEBB ET AL., 2007).

Alguns estudos também observaram efeitos da bST na função e manutenção do CL. Lucy et al. (1994) observou um maior área do tecido luteal, maior concentração de progesterona durante o ciclo estral, bem como uma luteólise mais lenta em novilhas tratadas com bST. Outros autores não observaram efeito da bST na concentração de progesterona em novilhas (GONG ET AL., 1991; GONG ET AL., 1997), vacas não lactantes (DE LA SOTA ET AL., 1993) ou vacas lactantes (DE LA SOTA ET AL., 1993; KIRBY ET AL., 1997b). Alguns estudos observaram menor concentração de P4 em vacas tratadas com bST (JIMENEZ-KRASSEL ET AL., 1999; KIRBY ET AL., 1997a), o que pode não ser uma

resposta direta, mas sim devido ao aumento na produção de leite em resposta ao tratamento, que confere maior metabolização hepática dos hormônios esteroides nesses animais (SANGSRITAVONG ET AL., 2002; VASCONCELOS ET AL., 2003).

Ao avaliar os efeitos da bST no oviduto e endométrio alguns estudos observaram que o tratamento pode alterar a expressão gênica de diferentes formas nesses tecidos (KIRBY ET AL., 1996; PERSHING ET AL., 2002). Ambos os estudos mostraram que o tratamento com bST pode alterar as quantidades de RNAm para receptores de GH, IGF1 e proteínas de ligação. Pershing et al. (2002) observou uma redução na expressão GHR em vacas tratadas com bST, mas não observou efeito do tratamento na quantidade de RNAm para IGF1. Resultados semelhantes foram obtidos por Kirby et al. (1996), que demonstraram ainda, que vacas prenhas apresentavam maior quantidade de RNAm para IGF1 nos tecidos reprodutivos (CL, ovário, miométrio, endométrio e oviduto) em comparação com as vacas vazias.

Cultivando células endometriais *in vitro*, a adição de bGH ou IFN- τ ao meio de cultivo resultou em uma redução na produção de PGF, sendo ainda observado efeito aditivo quando ambos (bGH e IFN- τ) foram utilizados (BADINGA ET AL., 2002). Além disso, quando o endométrio foi recolhido com 3 e 7 dias após uma ovulação sincronizada de vacas tratadas com bST as concentrações de proteína PGHS-2 foram diminuídos em comparação com os controles não tratados (BALAGUER ET AL., 2005), sugerindo menor ativação da cascata de produção de PGF2a em animais tratados com bST.

Além dos efeitos da bST nos tecidos reprodutivo, muitos estudos tem demonstrado efeitos diretos do sistema GH-IGF1 nos oócitos e embriões. Tais efeitos podem interferir na qualidade e desenvolvimento do conceito, e consequentemente, interferir na manutenção da gestação.

Izadyar et al. (1997) demonstraram que a adição de bGH no meio de maturação *in vitro* favoreceu a expansão das células do cúmulos que leva à maturação oocitária. Num estudo posterior, (IZADYAR ET AL., 2000) adicionaram bGH no meio de cultivo embrionário, para avaliarem a expressão de GHR no embrião após fertilização, bem como o efeito da bST no desenvolvimento embrionário. Os autores encontraram GHR em células trofoblásticas e também em células embrionárias de blastocisto eclodido e, além disso, observaram maior taxa de clivagem, e maior taxa de recuperação de blastocistos e blastocistos eclodidos a partir do dia 9 após fertilização (IZADYAR ET AL., 2000). A adição de bGH no meio de maturação melhorou a taxa de clivagem observada

3 dias após fertilização (MOREIRA ET AL., 2002b), provavelmente devido ao efeito do hormônio favorecer a maturação e antecipar a clivagem, como referido por (IZADYAR ET AL., 1997). A adição de bGH ou de IGF1 nos meios de cultivo embrionário aumentou a taxa de recuperação de blastocistos e blastocistos eclodidos, bem como o número de blastômeros (MOREIRA ET AL., 2002b) de embriões com 8 dias. Block et al. (2003) demonstraram que a adição de IGF1 ao meio de cultivo aumentou a taxa de recuperação de blastocisto e blastocisto expandido aos 7 e 8 dias após fertilização.

Cabe aqui salientar que *in vivo*, alguns fatores externos como, por exemplo, a nutrição, status produtivo, balanço energético, entre outros, também podem afetar a expressão sistêmica e local de componentes do sistema GH-IGF, podendo haver efeito no crescimento dos folículos, maturação e a qualidade oocitária, bem como na fertilização e desenvolvimento embrionário pós-fertilização (ADAMIAK ET AL., 2005; ARMSTRONG ET AL., 2001; ARMSTRONG ET AL., 2002), o que pode alterar a resposta ao tratamento com bST.

In vivo, a aplicação bST no momento da inseminação de doadoras superovuladas resultou em menor número de estruturas não fertilizadas, maior número de blastocistos recuperados por lavado, bem como maior porcentagem de embriões transferíveis 7 dias após inseminação, em comparação às doadoras não tratadas. Além disso, a transferência desses embriões resultou em maior prenhez dos embriões tratados em comparação aos embriões controle, no diagnóstico de gestação em receptoras que não recebiam bST, no entanto, nenhum efeito do tratamento foi observado na prenhez de embriões transferidos para receptoras tratadas com bST (MOREIRA ET AL., 2002a).

Jousan e Hansen (2004) produziram embriões *in vitro*, comparando meios de cultivo com ou sem IGF1, submetidos ou não ao choque térmico (41°C por 9h no d5 pós IA). Os resultados mostraram que embriões cultivados com IGF1 apresentaram maior porcentagem de clivagem e maior porcentagem de embriões que chegaram ao estágio de blastocisto. Além disso, os autores observaram que o choque térmico reduziu número total de blastômeros, aumentou o número de blastômeros apoptóticos e reduziu a porcentagem de embriões que desenvolvem para blastocistos, no entanto, no meio de cultivo tratado com IGF1, os efeitos do choque térmico foram minimizados, demonstrando que esse hormônio promove um efeito protetor contra o estresse térmico nos estágios iniciais de desenvolvimento embrionário (JOUSAN E HANSEN, 2004). Resultados semelhantes foram observados em outros estudos (BONILLA ET AL., 2011; JOUSAN E HANSEN, 2007). Adicionalmente, a transferência de embriões produzidos *in*

vitro tratados com bGH ou IGF-1 para receptoras sob estresse térmico resultou em melhores índices de concepção (Block et al., 2003; Block e Hansen, 2007).

A aquisição de termo tolerância está relacionada às alterações na expressão e ativação de genes responsáveis pela síntese de proteínas contra o choque térmico, que promovem estabilização de proteínas e organelas intracelulares, inibindo apoptose (EDWARDS E HANSEN, 1997). Essas alterações ocorrem à medida que o embrião desenvolve, conferindo resistência ao embrião quando atinge estágios mais avançados (EDWARDS E HANSEN, 1997; PAULA-LOPES E HANSEN, 2002b). Efeitos protetores em embriões com menos de 16 células são importantes para permitir que o embrião possa continuar a desenvolver após uma agressão ambiental e consiga adquirir resistência em estágio avançado (BONILLA ET AL., 2011; JOUSAN E HANSEN, 2007; PAULA-LOPES E HANSEN, 2002b,a; ROTH E HANSEN, 2004b,a; SAKATANI ET AL., 2013). Sakatani et al. (2013) relataram que as alterações que conferem resistência ao embrião são reguladas pelo embrião durante seu desenvolvimento, o que possivelmente seja uma estratégia adaptativa para prevenir o acúmulo de proteínas desnaturadas e ação de radicais livres no início do desenvolvimento embrionário. O mesmo parece acontecer para alterações mediadas pela ação do IGF1. Bonilla et al. (2011), demonstraram que a expressão de receptores de IGF1 (IGFR) e moléculas envolvidas na sinalização (RAF1 e MAPK) é maior em embriões com duas células que em embriões com 5 dias de desenvolvimento, no entanto, a adição de IGF1 no meio de cultivo embrionário apresentou efeito protetor contra choque térmico a 42°C apenas em embriões com mais de 16 células (5dias), mas não protegeu embriões de 2 células, sugerindo que o efeito protetor do IGF1 é regulado pelo desenvolvimento do embrião, e pode estar relacionado a alterações na transcrição de genes durante o desenvolvimento embrionário.

O período em torno dos 17 dias de gestação é muito importante, pois é quando ocorre o reconhecimento materno, por isso Bilby et al. (2004) e Bilby et al. (2006) realizaram estudos com vacas lactantes e não lactantes, tratadas ou não com bST a partir da inseminação, para avaliar os efeitos do tratamento nesse período crítico para manutenção da gestação. Os autores observaram que o tratamento aumentou o tamanho do concepto e a concentração de interferon-tau 17 dias após a inseminação, e isso foi correlacionado positivamente com a maior concentração sérica de IGF-1. Thatcher et al. (2006) reuniram informações desses estudos e observaram que vacas lactantes que receberam bST apresentaram maior taxa de prenhez que os animais não tratados, enquanto que vacas não lactantes tratadas com bST apresentaram menor prenhez do que

as controle. Adicionalmente, quando correlacionaram os dados de prenhez com a concentração plasmática de IGF1, sugeriram que concentrações muito altas de IGF1 podem levar a um desenvolvimento exacerbado do embrião, que possivelmente prejudica a manutenção da gestação, sugerindo que pode haver um nível ideal de IGF-1 que proporciona melhor fertilidade em vacas leiteiras.

2.3.Estratégias para melhorar a fertilidade das vacas de alta produção.

2.3.1. Utilização de bST.

Além de aumentar a produção de leite, a injeção de bST ativa os receptores no fígado, aumentando a produção e secreção de IGF1, e como foi relatado no capítulo anterior, o sistema GH-IGF exerce diversas funções nos tecidos reprodutivos, com ações importantes no controle do crescimento e dominância folicular (LUCY, 2011), na maturação oocitária (IZADYAR ET AL., 1997; IZADYAR ET AL., 2000), no o desenvolvimento embrionário (BILBY ET AL., 2004; BILBY ET AL., 2006; BLOCK ET AL., 2003; IZADYAR ET AL., 2000; MOREIRA ET AL., 2002b), além de minimizar efeitos do estresse térmico no embrião (BONILLA ET AL., 2011; JOUSAN E HANSEN, 2004,2007), ações essas que são imprescindíveis para o sucesso da reprodução da vaca. No entanto, alguns trabalhos prévios relacionaram o uso de bST com efeito negativo para os índices reprodutivos (COLE ET AL., 1991; COLE ET AL., 1992; ESTEBAN ET AL., 1994; MORBECK ET AL., 1991), resultados que provavelmente estavam associados a menor de expressão de estro dos animais que recebiam bST. Entretanto, com o advento dos protocolos de sincronização (PURSLEY ET AL., 1997), esses efeitos foram minimizados e com isso, delineamentos mais específicos para avaliar os efeitos da bST na fertilidade tem sido realizados. Cabe aqui mencionar que a resposta ao tratamento com bST e seus efeitos, podem ser influenciados por vários fatores como nutrição, DEL, balanço energético, genética, status produtivo, nível de produção, estresse térmico, entre outros (ETHERTON E BAUMAN, 1998; LUCY, 2011).

Moreira et al. (2000) trataram vacas lactantes com 500mg de bST a cada 14 dias, e testaram o efeito do tratamento na fertilidade ao primeiro serviço, comparando um grupo que recebeu a primeira injeção de bST aos 63 ± 3 dias após o parto (início do protocolo ovsynch) com um grupo controle, que iniciou o tratamento apenas com 105 ± 3 dias após o parto. Os autores observaram que as vacas do grupo tratado com bST aos

63±3 apresentaram maior prenhez no diagnóstico de gestação com 45 dias do que as vacas controle. Em outro trabalho, Moreira et al. (2001) testou 3 diferentes grupos de tratamento com bST, o primeiro iniciando aos 63±3 (coincidindo com o início do ovsynch), o segundo aos 73±3 (coincidindo com o dia da IA) e o controle iniciando apenas com 147±3 dias após o parto, e observaram que tanto o tratamento com bST aos 63±3, quanto aos 73±3 dias pós parto resultou em melhor concepção ao primeiro serviço de vacas cíclicas submetidos a IATF com ou sem pré-sincronização. Santos et al. (2004a) observaram que vacas tratadas com bST aos 63±3 apresentaram melhor taxa de concepção aos 45 dias após IATF ou detecção de cio. Jousan et al. (2007), também utilizaram bST com 14 dias de intervalo, iniciando o tratamento simultaneamente ao primeiro dia do protocolo de IATF para o primeiro serviço, e observaram aumento na produção de leite e na temperatura retal e vaginal dos animais tratados com bST, entretanto não houve nenhuma diferença na fertilidade em comparação ao grupo controle. É interessante lembrar que pode haver um nível ideal de IGF-1 que proporciona melhor fertilidade para as vacas, como observado por (THATCHER ET AL., 2006), onde níveis muito altos ou muito baixos de IGF1 foram associados a menor prenhez aos 17 dias de gestação. Um estudo recente testou aplicação de dose reduzida (325mg) de bST, sendo que um grupo recebeu apenas uma dose de bST no momento da IA, outro grupo recebeu uma segunda dose após 14 dias, e o grupo controle recebeu apenas placebo. Nesse estudo os autores observaram que o grupo que recebeu 2 doses de bST apresentou maior taxa de prenhez aos 66 dias de gestação, e menor perda de gestação entre 31 e 66 dias, comparado aos grupos que receberam placebo ou apenas uma injeção de bST na IA (RIBEIRO ET AL., 2014).

2.3.2. Transferência de embriões.

Muitos trabalhos têm demonstrado que a transferência de embriões apresenta melhores taxas de concepção quando comparada às taxas obtidas com inseminação artificial, tanto nos Estados Unidos (AL-KATANANI ET AL., 2002; DROST ET AL., 1999), como no Brasil (DEMETRIO ET AL., 2007; PEREIRA ET AL., 2013b; VASCONCELOS ET AL., 2006; VASCONCELOS ET AL., 2011c; VASCONCELOS ET AL., 2011a; VASCONCELOS ET AL., 2011b).

Melhores índices obtidos com TETF em comparação à IATF em vacas leiteiras, podem ser explicados devido a transferência de embriões viáveis de boa qualidade com

7 dias de desenvolvimento, os quais já passaram pelo período de maior sensibilidade, eliminando assim efeitos prejudiciais do estresse térmico no folículo, oócito, e nos estágios iniciais de desenvolvimento embrionário (HANSEN, 2007). Além disso, a transferência de embriões (TE) elimina efeitos de outros fatores que podem prejudicar a qualidade oocitária e embrionária, como o período de dominância folicular (CERRI ET AL., 2009; SANTOS ET AL., 2010), a baixa concentração de P4 durante desenvolvimento do folículo ovulatório (WILTBANK ET AL., 2012) ou do embrião (MANN ET AL., 2006), e a concentração inadequada de IGF-1 durante o crescimento folicular e desenvolvimento inicial do embrião (BILBY ET AL., 2004; BILBY ET AL., 2006; LUCY, 2011).

2.3.3. Associação das duas técnicas

Para explorar os benefícios das duas estratégias, a associação de ambas é uma alternativa interessante para minimizar a morte embrionária e melhorar os índices de fertilidade em vacas leiteiras.

Existem evidências de que o bGH adicionado ao meio de maturação *in vitro* promove maior expansão das células do cúmulos, favorecendo a maturação oocitária (IZADYAR ET AL., 1997). A adição de bGH e/ou IGF1 no meio de cultivo embrionário *in vitro* acelera a clivagem e o desenvolvimento embrionário inicial, aumentando a taxa de recuperação de blastocistos a partir de 7 dias após IA (BLOCK ET AL., 2003; IZADYAR ET AL., 2000; MOREIRA ET AL., 2002b). *In vivo*, o tratamento com bST no momento da inseminação em vacas superovuladas também aumentou a taxa de recuperação de blastocistos 7 dias após IA. Além disso, relatos mostram que a adição de IGF1 ao meio de cultivo embrionário minimiza efeitos do choque térmico (BONILLA ET AL., 2011; JOUSAN E HANSEN, 2004,2007), favorecendo o desenvolvimento embrionário e recuperação de blastocistos, consequentemente, favorece o reconhecimento materno e manutenção da gestação.

A transferência de embriões produzidos *in vitro* tratados com bGH ou IGF-1 para receptoras sob estresse térmico resultou em melhores índices de concepção (BLOCK ET AL., 2003; BLOCK E HANSEN, 2007).

Quando doadoras de embriões superovuladas foram tratadas com 500mg bST, a transferência desses embriões para receptoras não tratadas com bST, resultou em melhores índices de prenhez que os embriões das doadoras controle. Além disso,

receptoras tratadas com bST apresentaram maior prenhez após receberem embriões de doadoras controle, demonstrando que o bGH e IGF1 tem efeito diretamente no conceito, ou indiretamente através da unidade materna (MOREIRA ET AL., 2002a).

Em suma, dose reduzida de bST, associada ao protocolo de superovulação de doadoras não lactantes para produção *in vivo* de embriões pode ser uma estratégia interessante para melhorar a produção e a fertilidade de embriões, levando a uma maior manutenção da gestação após TE para receptoras lactantes.

3. Referências

ADAMIAK, S. J.; MACKIE, K.; WATT, R. G.; WEBB, R.; SINCLAIR, K. D. Impact of nutrition on oocyte quality: cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle. **Biol Reprod**, v. 73, n. 5, p. 918-26, 2005.

AL-KATANANI, Y. M.; DROST, M.; MONSON, R. L.; RUTLEDGE, J. J.; KRININGER, C. E., 3RD; BLOCK, J.; THATCHER, W. W.; HANSE, P. J. Pregnancy rates following timed embryo transfer with fresh or vitrified *in vitro* produced embryos in lactating dairy cows under heat stress conditions. **Theriogenology**, v. 58, n. 1, p. 171-82, 2002.

AL-KATANANI, Y. M.; WEBB, D. W.; HANSEN, P. J. Factors affecting seasonal variation in 90-day nonreturn rate to first service in lactating Holstein cows in a hot climate. **J Dairy Sci**, v. 82, n. 12, p. 2611-6, 1999.

ARMSTRONG, D. G.; BAXTER, G.; GUTIERREZ, C. G.; HOGG, C. O.; GLAZYRIN, A. L.; CAMPBELL, B. K.; BRAMLEY, T. A.; WEBB, R. Insulin-like growth factor binding protein -2 and -4 messenger ribonucleic acid expression in bovine ovarian follicles: effect of gonadotropins and developmental status. **Endocrinology**, v. 139, n. 4, p. 2146-54, 1998.

ARMSTRONG, D. G.; GONG, J. G.; GARDNER, J. O.; BAXTER, G.; HOGG, C. O.; WEBB, R. Steroidogenesis in bovine granulosa cells: the effect of short-term changes in dietary intake. **Reproduction**, v. 123, n. 3, p. 371-8, 2002.

ARMSTRONG, D. G.; MCEVOY, T. G.; BAXTER, G.; ROBINSON, J. J.; HOGG, C. O.; WOAD, K. J.; WEBB, R.; SINCLAIR, K. D. Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production *in vitro*: associations with the ovarian insulin-like growth factor system. **Biol Reprod**, v. 64, n. 6, p. 1624-32, 2001.

BADINGA, L.; COLLIER, R. J.; THATCHER, W. W.; WILCOX, C. J. Effects of climatic and management factors on conception rate of dairy cattle in subtropical environment. **J Dairy Sci**, v. 68, n. 1, p. 78-85, 1985.

BADINGA, L.; GUZELOGLU, A.; THATCHER, W. W. Bovine somatotropin attenuates phorbol ester-induced prostaglandin F₂ α production in bovine endometrial cells. **J Dairy Sci**, v. 85, n. 3, p. 537-43, 2002.

BALAGUER, S. A.; PERSHING, R. A.; RODRIGUEZ-SALLABERRY, C.; THATCHER, W. W.; BADINGA, L. Effects of bovine somatotropin on uterine genes related to the prostaglandin cascade in lactating dairy cows. **J Dairy Sci**, v. 88, n. 2, p. 543-52, 2005.

BAUMAN, D. E. Bovine somatotropin: review of an emerging animal technology. **J Dairy Sci**, v. 75, n. 12, p. 3432-51, 1992.

BIGGERS, B. G.; GEISERT, R. D.; WETTEMAN, R. P.; BUCHANAN, D. S. Effect of heat stress on early embryonic development in the beef cow. **J Anim Sci**, v. 64, n. 5, p. 1512-8, 1987.

BILBY, T. R.; BLOCK, J.; DO AMARAL, B. C.; SA FILHO, O.; SILVESTRE, F. T.; HANSEN, P. J.; STAPLES, C. R.; THATCHER, W. W. Effects of dietary unsaturated fatty acids on oocyte quality and follicular development in lactating dairy cows in summer. **J Dairy Sci**, v. 89, n. 10, p. 3891-903, 2006.

BILBY, T. R.; GUZELOGLU, A.; KAMIMURA, S.; PANCARCI, S. M.; MICHEL, F.; HEAD, H. H.; THATCHER, W. W. Pregnancy and bovine somatotropin in nonlactating dairy cows: I. Ovarian, conceptus, and insulin-like growth factor system responses. **J Dairy Sci**, v. 87, n. 10, p. 3256-67, 2004.

BLOCK, J.; DROST, M.; MONSON, R. L.; RUTLEDGE, J. J.; RIVERA, R. M.; PAULA-LOPES, F. F.; OCON, O. M.; KRININGER, C. E., 3RD; LIU, J.; HANSEN, P. J. Use of insulin-like growth factor-I during embryo culture and treatment of recipients with gonadotropin-releasing hormone to increase pregnancy rates following the transfer of in vitro-produced embryos to heat-stressed, lactating cows. **J Anim Sci**, v. 81, n. 6, p. 1590-602, 2003.

BLOCK, J.; HANSEN, P. J. Interaction between season and culture with insulin-like growth factor-1 on survival of in vitro produced embryos following transfer to lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 67, n. 9, p. 1518-29, 2007.

BLOCK, J.; WRENZYCKI, C.; NIEMANN, H.; HERRMANN, D.; HANSEN, P. J. Effects of insulin-like growth factor-1 on cellular and molecular characteristics of bovine blastocysts produced in vitro. **Mol Reprod Dev**, v. 75, n. 5, p. 895-903, 2008.

BONILLA, A. Q.; OLIVEIRA, L. J.; OZAWA, M.; NEWSOM, E. M.; LUCY, M. C.; HANSEN, P. J. Developmental changes in thermoprotective actions of insulin-like growth factor-1 on the preimplantation bovine embryo. **Mol Cell Endocrinol**, v. 332, n. 1-2, p. 170-9, 2011.

BURATINI, J., JR.; PINTO, M. G.; CASTILHO, A. C.; AMORIM, R. L.; GIOMETTI, I. C.; PORTELA, V. M.; NICOLA, E. S.; PRICE, C. A. Expression and function of fibroblast growth factor 10 and its receptor, fibroblast growth factor receptor 2B, in bovine follicles. **Biol Reprod**, v. 77, n. 4, p. 743-50, 2007.

BURATINI, J.; PRICE, C. A. Follicular somatic cell factors and follicle development. **Reprod Fertil Dev**, v. 23, n. 1, p. 32-9, 2011.

BURATINI JR, J. Controle endócrino e local da foliculogênese em bovinos. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 31, n. 2, p. 190-196, 2007.

BUTLER, W. R. Review: effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. **J Dairy Sci**, v. 81, n. 9, p. 2533-9, 1998.

CERRI, R. L.; RUTIGLIANO, H. M.; CHEBEL, R. C.; SANTOS, J. E. Period of dominance of the ovulatory follicle influences embryo quality in lactating dairy cows. **Reproduction**, v. 137, n. 5, p. 813-23, 2009.

CHEBEL, R. C.; AL-HASSAN, M. J.; FRICKE, P. M.; SANTOS, J. E.; LIMA, J. R.; MARTEL, C. A.; STEVENSON, J. S.; GARCIA, R.; AX, R. L. Supplementation of progesterone via controlled internal drug release inserts during ovulation synchronization protocols in lactating dairy cows. **J Dairy Sci**, v. 93, n. 3, p. 922-31, 2010.

CHEBEL, R. C.; SANTOS, J. E. Effect of inseminating cows in estrus following a presynchronization protocol on reproductive and lactation performances. **J Dairy Sci**, v. 93, n. 10, p. 4632-43, 2010.

CHEBEL, R. C.; SANTOS, J. E.; CERRI, R. L.; RUTIGLIANO, H. M.; BRUNO, R. G. Reproduction in dairy cows following progesterone insert presynchronization and resynchronization protocols. **J Dairy Sci**, v. 89, n. 11, p. 4205-19, 2006.

CHEBEL, R. C.; SANTOS, J. E.; REYNOLDS, J. P.; CERRI, R. L.; JUCHEM, S. O.; OVERTON, M. Factors affecting conception rate after artificial insemination and pregnancy loss in lactating dairy cows. **Anim Reprod Sci**, v. 84, n. 3-4, p. 239-55, 2004.

COLE, W. J.; EPPARD, P. J.; BOYSEN, B. G.; MADSEN, K. S.; SORBET, R. H.; MILLER, M. A.; HINTZ, R. L.; WHITE, T. C.; RIBELIN, W. E.; HAMMOND, B. G.; ET AL. Response of dairy cows to high doses of a sustained-release bovine somatotropin administered during two lactations. 2. Health and reproduction. **J Dairy Sci**, v. 75, n. 1, p. 111-23, 1992.

COLE, W. J.; MADSEN, K. S.; HINTZ, R. L.; COLLIER, R. L. Effect of recombinantly-derived bovine somatotropin on reproductive performance of dairy cattle. **Theriogenology**, v. 36, n. 4, p. 573-95, 1991.

CUTTLE, L. The regulation of growth hormone secretion. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v. 25, n. 3, p. 541-71, 1996.

DE LA SOTA, R. L.; LUCY, M. C.; STAPLES, C. R.; THATCHER, W. W. Effects of recombinant bovine somatotropin (sometribove) on ovarian function in lactating and nonlactating dairy cows. **J Dairy Sci**, v. 76, n. 4, p. 1002-13, 1993.

DEMETRIO, D. G.; SANTOS, R. M.; DEMETRIO, C. G.; VASCONCELOS, J. L. Factors affecting conception rates following artificial insemination or embryo transfer in lactating Holstein cows. **J Dairy Sci**, v. 90, n. 11, p. 5073-82, 2007.

DROST, M.; AMBROSE, J. D.; THATCHER, M. J.; CANTRELL, C. K.; WOLFSDORF, K. E.; HASLER, J. F.; THATCHER, W. W. Conception rates after artificial insemination or embryo transfer in lactating dairy cows during summer in Florida. **Theriogenology**, v. 52, n. 7, p. 1161-7, 1999.

- EALY, A. D.; DROST, M.; HANSEN, P. J. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. **J Dairy Sci**, v. 76, n. 10, p. 2899-905, 1993.
- EDWARDS, J. L.; HANSEN, P. J. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. **Mol Reprod Dev**, v. 46, n. 2, p. 138-45, 1997.
- ESTEBAN, E.; KASS, P. H.; WEAVER, L. D.; ROWE, J. D.; HOLMBERG, C. A.; FRANTI, C. E.; TROUTT, H. F. Reproductive performance in high producing dairy cows treated with recombinant bovine somatotropin. **J Dairy Sci**, v. 77, n. 11, p. 3371-81, 1994.
- ETHERTON, T. D.; BAUMAN, D. E. Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. **Physiol Rev**, v. 78, n. 3, p. 745-61, 1998.
- FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M.; YANG, M. Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Anim Reprod Sci**, v. 82-83, p. 109-26, 2004.
- GLUCKMAN, P. D.; BREIER, B. H.; DAVIS, S. R. Physiology of the somatotrophic axis with particular reference to the ruminant. **J Dairy Sci**, v. 70, n. 2, p. 442-66, 1987.
- GONG, J. G. Influence of metabolic hormones and nutrition on ovarian follicle development in cattle: practical implications. **Domest Anim Endocrinol**, v. 23, n. 1-2, p. 229-41, 2002.
- GONG, J. G.; BAXTER, G.; BRAMLEY, T. A.; WEBB, R. Enhancement of ovarian follicle development in heifers by treatment with recombinant bovine somatotrophin: a dose-response study. **J Reprod Fertil**, v. 110, n. 1, p. 91-7, 1997.
- GONG, J. G.; BRAMLEY, T.; WEBB, R. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: follicular populations and peripheral hormones. **Biol Reprod**, v. 45, n. 6, p. 941-9, 1991.
- GONG, J. G.; BRAMLEY, T. A.; WEBB, R. The effect of recombinant bovine somatotrophin on ovarian follicular growth and development in heifers. **J Reprod Fertil**, v. 97, n. 1, p. 247-54, 1993a.
- GONG, J. G.; BRAMLEY, T. A.; WILMUT, I.; WEBB, R. Effect of recombinant bovine somatotropin on the superovulatory response to pregnant mare serum gonadotropin in heifers. **Biol Reprod**, v. 48, n. 5, p. 1141-9, 1993b.
- HANSEN, L. B. Consequences of selection for milk yield from a geneticist's viewpoint. **J Dairy Sci**, v. 83, n. 5, p. 1145-50, 2000.
- HANSEN, P. J. To be or not to be--determinants of embryonic survival following heat shock. **Theriogenology**, v. 68 Suppl 1, p. S40-8, 2007.
- HAUSER, S. D.; MCGRATH, M. F.; COLLIER, R. J.; KRIVI, G. G. Cloning and in vivo expression of bovine growth hormone receptor mRNA. **Mol Cell Endocrinol**, v. 72, n. 3, p. 187-200, 1990.
- HUMBEL, R. E. Insulin-like growth factors I and II. **Eur J Biochem**, v. 190, n. 3, p. 445-62, 1990.

INSKEEP, E. K. Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. **J Anim Sci**, v. 82 E-Suppl, p. E24-39, 2004.

IZADYAR, F.; VAN TOL, H. T.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M. Stimulatory effect of growth hormone on in vitro maturation of bovine oocytes is exerted through cumulus cells and not mediated by IGF-I. **Mol Reprod Dev**, v. 47, n. 2, p. 175-80, 1997.

IZADYAR, F.; VAN TOL, H. T.; HAGE, W. G.; BEVERS, M. M. Preimplantation bovine embryos express mRNA of growth hormone receptor and respond to growth hormone addition during in vitro development. **Mol Reprod Dev**, v. 57, n. 3, p. 247-55, 2000.

JIMENEZ-KRASSEL, F.; BINELLI, M.; TUCKER, H. A.; IRELAND, J. J. Effect of long-term infusion with recombinant growth hormone-releasing factor and recombinant bovine somatotropin on development and function of dominant follicles and corpora lutea in Holstein cows. **J Dairy Sci**, v. 82, n. 9, p. 1917-26, 1999.

JOUSAN, F. D.; DE CASTRO E PAULA, L. A.; BLOCK, J.; HANSEN, P. J. Fertility of lactating dairy cows administered recombinant bovine somatotropin during heat stress. **J Dairy Sci**, v. 90, n. 1, p. 341-51, 2007.

JOUSAN, F. D.; HANSEN, P. J. Insulin-like growth factor-I as a survival factor for the bovine preimplantation embryo exposed to heat shock. **Biol Reprod**, v. 71, n. 5, p. 1665-70, 2004.

JOUSAN, F. D.; HANSEN, P. J. Insulin-like growth factor-I promotes resistance of bovine preimplantation embryos to heat shock through actions independent of its anti-apoptotic actions requiring PI3K signaling. **Mol Reprod Dev**, v. 74, n. 2, p. 189-96, 2007.

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, n. 2, p. 273-85, 1997a.

KIRBY, C. J.; THATCHER, W. W.; COLLIER, R. J.; SIMMEN, F. A.; LUCY, M. C. Effects of growth hormone and pregnancy on expression of growth hormone receptor, insulin-like growth factor-I, and insulin-like growth factor binding protein-2 and -3 genes in bovine uterus, ovary, and oviduct. **Biol Reprod**, v. 55, n. 5, p. 996-1002, 1996.

KIRBY, C. J.; WILSON, S. J.; LUCY, M. C. Response of dairy cows treated with bovine somatotropin to a luteolytic dose of prostaglandin F2 alpha. **J Dairy Sci**, v. 80, n. 2, p. 286-94, 1997b.

LOPEZ-GATIUS, F. Is fertility declining in dairy cattle? A retrospective study in northeastern Spain. **Theriogenology**, v. 60, n. 1, p. 89-99, 2003.

LUCY, M.; JIANG, H.; KOBAYASHI, Y. Changes in the somatotrophic axis associated with the initiation of lactation. **J Dairy Sci**, v. 84, p. E113-E119, 2001.

LUCY, M. C. Growth hormone regulation of follicular growth. **Reprod Fertil Dev**, v. 24, n. 1, p. 19-28, 2011.

LUCY, M. C. Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. **J Dairy Sci**, v. 83, n. 7, p. 1635-47, 2000.

LUCY, M. C. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? **J Dairy Sci**, v. 84, n. 6, p. 1277-93, 2001.

LUCY, M. C.; COLLIER, R. J.; KITCHELL, M. L.; DIBNER, J. J.; HAUSER, S. D.; KRIVI, G. G. Immunohistochemical and nucleic acid analysis of somatotropin receptor populations in the bovine ovary. **Biol Reprod**, v. 48, n. 6, p. 1219-27, 1993a.

LUCY, M. C.; CURRAN, T. L.; COLLIER, R. J.; COLE, W. J. Extended function of the corpus luteum and earlier development of the second follicular wave in heifers treated with bovine somatotropin. **Theriogenology**, v. 41, n. 2, p. 561-72, 1994.

LUCY, M. C.; DE LA SOTA, R. L.; STAPLES, C. R.; THATCHER, W. W. Ovarian follicular populations in lactating dairy cows treated with recombinant bovine somatotropin (sometribove) or saline and fed diets differing in fat content and energy. **J Dairy Sci**, v. 76, n. 4, p. 1014-27, 1993b.

LUCY, M. C.; ESCALANTE, R. C.; KEISLER, D. H.; LAMBERSON, W. R.; MATHEW, D. J. Short communication: Glucose infusion into early postpartum cows defines an upper physiological set point for blood glucose and causes rapid and reversible changes in blood hormones and metabolites. **J Dairy Sci**, v. 96, n. 9, p. 5762-8, 2013.

MANN, G. E.; FRAY, M. D.; LAMMING, G. E. Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon-tau production in the cow. **Vet J**, v. 171, n. 3, p. 500-3, 2006.

MCDOWELL, G. H. Somatotropin and endocrine regulation of metabolism during lactation. **J Dairy Sci**, v. 74 Suppl 2, p. 44-62, 1991.

MORBECK, D. E.; BRITT, J. H.; MCDANIEL, B. T. Relationships among milk yield, metabolism, and reproductive performance of primiparous Holstein cows treated with somatotropin. **J Dairy Sci**, v. 74, n. 7, p. 2153-64, 1991.

MOREIRA, F.; BADINGA, L.; BURNLEY, C.; THATCHER, W. W. Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. **Theriogenology**, v. 57, n. 4, p. 1371-87, 2002a.

MOREIRA, F.; ORLANDI, C.; RISCO, C. A.; MATTOS, R.; LOPES, F.; THATCHER, W. W. Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. **J Dairy Sci**, v. 84, n. 7, p. 1646-59, 2001.

MOREIRA, F.; PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J.; BADINGA, L.; THATCHER, W. W. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on development of in vitro derived bovine embryos. **Theriogenology**, v. 57, n. 2, p. 895-907, 2002b.

MOREIRA, F.; RISCO, C. A.; PIRES, M. F.; AMBROSE, J. D.; DROST, M.; THATCHER, W. W. Use of bovine somatotropin in lactating dairy cows receiving timed artificial insemination. **J Dairy Sci**, v. 83, n. 6, p. 1237-47, 2000.

PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Apoptosis is an adaptive response in bovine preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 295, n. 1, p. 37-42, 2002a.

PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. **Biol Reprod**, v. 66, n. 4, p. 1169-77, 2002b.

PEREIRA, M. H.; RODRIGUES, A. D.; DE CARVALHO, R. J.; WILTBANK, M. C.; VASCONCELOS, J. L. Increasing length of an estradiol and progesterone timed artificial insemination protocol decreases pregnancy losses in lactating dairy cows. **J Dairy Sci**, v. 97, n. 3, p. 1454-64, 2014.

PEREIRA, M. H.; RODRIGUES, A. D.; MARTINS, T.; OLIVEIRA, W. V.; SILVEIRA, P. S.; WILTBANK, M. C.; VASCONCELOS, J. L. Timed artificial insemination programs during the summer in lactating dairy cows: comparison of the 5-d Cosynch protocol with an estrogen/progesterone-based protocol. **J Dairy Sci**, v. 96, n. 11, p. 6904-14, 2013a.

PEREIRA, M. H.; SANCHES, C. P.; GUIDA, T. G.; RODRIGUES, A. D.; ARAGON, F. L.; VERAS, M. B.; BORGES, P. T.; WILTBANK, M. C.; VASCONCELOS, J. L. Timing of prostaglandin F2 α treatment in an estrogen-based protocol for timed artificial insemination or timed embryo transfer in lactating dairy cows. **J Dairy Sci**, v. 96, n. 5, p. 2837-46, 2013b.

PERSHING, R. A.; LUCY, M. C.; THATCHER, W. W.; BADINGA, L. Effects of BST on oviductal and uterine genes encoding components of the IGF system in lactating dairy cows. **J Dairy Sci**, v. 85, n. 12, p. 3260-7, 2002.

PURSLEY, J. R.; KOSOROK, M. R.; WILTBANK, M. C. Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. **J Dairy Sci**, v. 80, n. 2, p. 301-6, 1997.

PURSLEY, J. R.; MARTINS, J. P.; WRIGHT, C.; STEWART, N. D. Compared to dinoprost tromethamine, cloprostenol sodium increased rates of estrus detection, conception and pregnancy in lactating dairy cows on a large commercial dairy. **Theriogenology**, v. 78, n. 4, p. 823-9, 2012.

PUTNEY, D. J.; MALAYER, J. R.; GROSS, T. S.; THATCHER, W. W.; HANSEN, P. J.; DROST, M. Heat stress-induced alterations in the synthesis and secretion of proteins and prostaglandins by cultured bovine conceptuses and uterine endometrium. **Biol Reprod**, v. 39, n. 3, p. 717-28, 1988.

RIBEIRO, E. S.; BRUNO, R. G.; FARIAS, A. M.; HERNANDEZ-RIVERA, J. A.; GOMES, G. C.; SURJUS, R.; BECKER, L. F.; BIRT, A.; OTT, T. L.; BRANEN, J. R.; SASSER, R. G.; KEISLER, D. H.; THATCHER, W. W.; BILBY, T. R.; SANTOS, J. E. Low doses of bovine somatotropin enhance conceptus development and fertility in lactating dairy cows. **Biol Reprod**, v. 90, n. 1, p. 10, 2014.

ROTH, Z.; ARAV, A.; BOR, A.; ZERON, Y.; BRAW-TAL, R.; WOLFENSON, D. Improvement of quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of

impaired follicles from previously heat-stressed cows. **Reproduction**, v. 122, n. 5, p. 737-44, 2001a.

ROTH, Z.; HANSEN, P. J. Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. **Biol Reprod**, v. 71, n. 6, p. 1898-906, 2004a.

ROTH, Z.; HANSEN, P. J. Sphingosine 1-phosphate protects bovine oocytes from heat shock during maturation. **Biol Reprod**, v. 71, n. 6, p. 2072-8, 2004b.

ROTH, Z.; MEIDAN, R.; BRAW-TAL, R.; WOLFENSON, D. Immediate and delayed effects of heat stress on follicular development and its association with plasma FSH and inhibin concentration in cows. **J Reprod Fertil**, v. 120, n. 1, p. 83-90, 2000.

ROTH, Z.; MEIDAN, R.; SHAHAM-ALBALANCY, A.; BRAW-TAL, R.; WOLFENSON, D. Delayed effect of heat stress on steroid production in medium-sized and preovulatory bovine follicles. **Reproduction**, v. 121, n. 5, p. 745-51, 2001b.

SAKATANI, M.; BONILLA, L.; DOBBS, K. B.; BLOCK, J.; OZAWA, M.; SHANKER, S.; YAO, J.; HANSEN, P. J. Changes in the transcriptome of morula-stage bovine embryos caused by heat shock: relationship to developmental acquisition of thermotolerance. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 11, p. 3, 2013.

SANCHEZ, F.; SMITZ, J. Molecular control of oogenesis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1822, n. 12, p. 1896-912, 2012.

SANGSRITAVONG, S.; COMBS, D. K.; SARTORI, R.; ARMENTANO, L. E.; WILTBANK, M. C. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17beta in dairy cattle. **J Dairy Sci**, v. 85, n. 11, p. 2831-42, 2002.

SANTOS, J. E.; JUCHEM, S. O.; CERRI, R. L.; GALVAO, K. N.; CHEBEL, R. C.; THATCHER, W. W.; DEI, C. S.; BILBY, C. R. Effect of bST and reproductive management on reproductive performance of Holstein dairy cows. **J Dairy Sci**, v. 87, n. 4, p. 868-81, 2004a.

SANTOS, J. E.; NARCISO, C. D.; RIVERA, F.; THATCHER, W. W.; CHEBEL, R. C. Effect of reducing the period of follicle dominance in a timed artificial insemination protocol on reproduction of dairy cows. **J Dairy Sci**, v. 93, n. 7, p. 2976-88, 2010.

SANTOS, J. E.; THATCHER, W. W.; CHEBEL, R. C.; CERRI, R. L.; GALVAO, K. N. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. **Anim Reprod Sci**, v. 82-83, p. 513-35, 2004b.

SARTORI, R.; ROSA, G. J.; WILTBANK, M. C. Ovarian structures and circulating steroids in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. **J Dairy Sci**, v. 85, n. 11, p. 2813-22, 2002a.

SARTORI, R.; SARTOR-BERGFELT, R.; MERTENS, S. A.; GUENTHER, J. N.; PARRISH, J. J.; WILTBANK, M. C. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. **J Dairy Sci**, v. 85, n. 11, p. 2803-12, 2002b.

SPICER, L. J.; AAD, P. Y. Insulin-like growth factor (IGF) 2 stimulates steroidogenesis and mitosis of bovine granulosa cells through the IGF1 receptor: role of follicle-stimulating hormone and IGF2 receptor. **Biol Reprod**, v. 77, n. 1, p. 18-27, 2007.

SPICER, L. J.; CHAMBERLAIN, C. S.; MACIEL, S. M. Influence of gonadotropins on insulin- and insulin-like growth factor-I (IGF-I)-induced steroid production by bovine granulosa cells. **Domest Anim Endocrinol**, v. 22, n. 4, p. 237-54, 2002.

SPICER, L. J.; ECHTERNKAMP, S. E. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. **Domest Anim Endocrinol**, v. 12, n. 3, p. 223-45, 1995.

THATCHER, W.; STAPLES, C.; DANET-DESNOYERS, G.; OLDICK, B.; SCHMITT, E. Embryo health and mortality in sheep and cattle. **J Anim Sci**, v. 72, n. suppl 3, p. 16-30, 1994.

THATCHER, W. W.; BILBY, T. R.; BARTOLOME, J. A.; SILVESTRE, F.; STAPLES, C. R.; SANTOS, J. E. Strategies for improving fertility in the modern dairy cow. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 30-44, 2006.

VASCONCELOS, J. L.; COOKE, R. F.; JARDINA, D. T.; ARAGON, F. L.; VERAS, M. B.; SORIANO, S.; SOBREIRA, N.; SCARPA, A. B. Associations among milk production and rectal temperature on pregnancy maintenance in lactating recipient dairy cows. **Anim Reprod Sci**, v. 127, n. 3-4, p. 140-7, 2011a.

VASCONCELOS, J. L.; DEMETRIO, D. G.; SANTOS, R. M.; CHIARI, J. R.; RODRIGUES, C. A.; SA FILHO, O. G. Factors potentially affecting fertility of lactating dairy cow recipients. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 192-200, 2006.

VASCONCELOS, J. L.; JARDINA, D. T.; SA FILHO, O. G.; ARAGON, F. L.; VERAS, M. B. Comparison of progesterone-based protocols with gonadotropin-releasing hormone or estradiol benzoate for timed artificial insemination or embryo transfer in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 75, n. 6, p. 1153-60, 2011b.

VASCONCELOS, J. L.; SA FILHO, O. G.; JUSTOLIN, P. L.; MORELLI, P.; ARAGON, F. L.; VERAS, M. B.; SORIANO, S. Effects of postbreeding gonadotropin treatments on conception rates of lactating dairy cows subjected to timed artificial insemination or embryo transfer in a tropical environment. **J Dairy Sci**, v. 94, n. 1, p. 223-34, 2011c.

VASCONCELOS, J. L.; SANGSRITAVONG, S.; TSAI, S. J.; WILTBANK, M. C. Acute reduction in serum progesterone concentrations after feed intake in dairy cows. **Theriogenology**, v. 60, n. 5, p. 795-807, 2003.

VASCONCELOS, J. L.; SILCOX, R. W.; ROSA, G. J.; PURSLEY, J. R.; WILTBANK, M. C. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 52, n. 6, p. 1067-78, 1999.

WEBB, R.; GARNSWORTHY, P. C.; CAMPBELL, B. K.; HUNTER, M. G. Intra-ovarian regulation of follicular development and oocyte competence in farm animals. **Theriogenology**, v. 68 Suppl 1, p. S22-9, 2007.

WEBB, R.; GARNSWORTHY, P. C.; GONG, J. G.; ARMSTRONG, D. G. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. **J Anim Sci**, v. 82 E-Suppl, p. E63-74, 2004.

WILSON, S. J.; KIRBY, C. J.; KOENIGSFELD, A. T.; KEISLER, D. H.; LUCY, M. C. Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 2. Heifers. **J Dairy Sci**, v. 81, n. 8, p. 2132-8, 1998.

WILTBANK, M.; SOUZA, A.; GIORDANO, J.; NASCIMENTO, A.; VASCONCELOS, J.; PEREIRA, M.; FRICKE, P.; SURJUS, R.; ZINSLY, F.; CARVALHO, P. Positive and negative effects of progesterone during timed AI protocols in lactating dairy cattle. **Anim. Reprod**, v. 9, p. 231-241, 2012.

WOLFENSON, D.; BARTOL, F. F.; BADINGA, L.; BARROS, C. M.; MARPLE, D. N.; CUMMINS, K.; WOLFE, D.; LUCY, M. C.; SPENCER, T. E.; THATCHER, W. W. Secretion of PGF2alpha and oxytocin during hyperthermia in cyclic and pregnant heifers. **Theriogenology**, v. 39, n. 5, p. 1129-41, 1993.

WOLFENSON, D.; ROTH, Z.; MEIDAN, R. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. **Anim Reprod Sci**, v. 60-61, p. 535-47, 2000.

WOLFENSON, D.; THATCHER, W. W.; BADINGA, L.; SAVIO, J. D.; MEIDAN, R.; LEW, B. J.; BRAW-TAL, R.; BERMAN, A. Effect of heat stress on follicular development during the estrous cycle in lactating dairy cattle. **Biol Reprod**, v. 52, n. 5, p. 1106-13, 1995.

WOOD, D. C.; SALSGIVER, W. J.; KASSER, T. R.; LANGE, G. W.; ROWOLD, E.; VIOLAND, B. N.; JOHNSON, A.; LEIMGRUBER, R. M.; PARR, G. R.; SIEGEL, N. R.; ET AL. Purification and characterization of pituitary bovine somatotropin. **J Biol Chem**, v. 264, n. 25, p. 14741-7, 1989.

CAPÍTULO 2

**EFEITO DE DOSE REDUZIDA DE SOMATOTROPINA BOVINA
RECOMBINANTE ASSOCIADA A PROTOCOLOS DE
SUPEROVULAÇÃO NA FERTILIDADE DE EMBRIÕES
TRANSFERIDOS PARA RECEPTORAS EM LACTAÇÃO**

Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar se aplicação de dose reduzida de bST (333mg), associada ao protocolo de superovulação de doadoras não lactantes, aumenta a produção de embriões e a manutenção de gestação após transferência para receptoras em lactação. Um total de 267 doadoras foram submetidas ao protocolo de superovulação, e subdivididas em 3 grupos: CONT (grupo controle = não tratados com bST), bST/IA (grupo recebeu uma dose de bST no dia da IA) e bST/InIA (grupo recebeu duas doses de bST, uma no início de protocolo e outra no dia da IA). A coleta não cirúrgica dos embriões foi realizada 6,5 dias após a inseminação. Os embriões frescos foram transferidos para receptoras lactantes previamente sincronizadas. Os diagnósticos de gestação foram realizados no d30 e d60. A concentração sérica de IGF1 nas doadoras no dia da coleta de embriões foi maior ($p < 0,01$) para os grupos bST/IA ($306,4 \pm 13,0$ ng/mL) e bST/InIA ($307,3 \pm 12,4$ ng/mL) em relação ao CONT ($195,8 \pm 13,3$ ng/mL). A aplicação de bST no momento da IA aumentou a proporção de embriões transferíveis por coleta (69,9%), em relação ao controle (54,7%) e aos animais que receberam duas doses de bST (55,8%), resultando em $3,4 \pm 0,6$ embriões por coleta no grupo controle, $4,7 \pm 0,6$ embriões por coleta no grupo tratado com duas doses e $6,0 \pm 0,6$ no grupo tratado com uma dose na IA. O tratamento com bST na IA aumentou o número de blastocistos recuperados por coleta ($3,0 \pm 0,4$) em relação ao controle ($1,6 \pm 0,4$), enquanto o grupo que recebeu duas aplicações de bST tendeu de aumentar o número de blastocistos ($2,6 \pm 0,4$) em relação ao controle. A prenhez aos 60 dias foi 25,6%, 30% e 28,6% para os grupos CONT, bST/IA e bST/InIA respectivamente. Foi detectada interação entre tratamento e o estágio de desenvolvimento do embrião na prenhez por TE, em que blastocistos dos grupos tratados com bST apresentaram maior P/TE aos 60 dias em relação aos blastocistos do grupo controle, enquanto que mórulas dos grupos tratados apresentaram menor P/TE que mórulas do grupo controle. Em conclusão, o tratamento com dose reduzida de bST em doadoras de embriões não lactantes aumentou a concentração de IGF1, a recuperação de embriões por coleta e a manutenção da gestação de embriões em estágio de blastocisto.

Palavras chave: somatotropina; transferencia de embriões; fertilidade; vacas leiteiras

Abstract

The objective of this study was evaluate if a low-dose of bST (333mg), associated with the superovulation protocol of non-lactating donors, would increases the embryo production and pregnancy maintenance after transfer to lactating recipients. For this, 267 donors were subjected to the superovulation protocol and subdivided into 3 groups: CONT (control group = no bST), bST/IA (group received one dose of bST at AI) and bST/INIA (group received two doses of bST, one at the beginning protocol and another at AI). Non-surgical collection of embryos occurred 6.5 days after insemination. The fresh embryos were transferred to previously synchronized lactating recipients. The pregnancy diagnoses were performed at d30 and d60. The The donors IGF1 serum concentration at embryo recovery day was higher ($p < 0.01$) for bST/IA groups (306.4 ± 13.0 ng / mL) and bST/INIA (307.3 ± 12.4 ng / ml) compared to the CONT (195.8 ± 13.3 ng / ml). The bST application at AI increased proportion of transferable embryos per collection (69.9%), when compared with the control (54.7%) and with the animals that received two doses of somatotropin (55.8%) resulting 3.4 ± 0.6 embryos per collection in the control group, 4.7 ± 0.6 embryos per collection in two doses group and 6.0 ± 0.6 in the one dose at IA group. Treatment with bST at AI increased the number of blastocysts recovered by collection (3.0 ± 0.4) compared to control (1.6 ± 0.4), while the group that received two bST applications tended to increase number of blastocysts (2.6 ± 0.4) compared to the control. Pregnancy at 60 days was 25.6%, 30% and 28.6% for the CONT group, bST/AI and bST/INIA respectively. Was detected interaction between treatment and embryo development stage in pregnancy by ET, when blastocysts in the bST treated groups had higher P/ET at 60 days compared to the control group blastocysts, while morulae of the treated groups had lower P/ET that morulae of the control group. In conclusion, treatment with reduced dose of bST in non-lactating embryo donors increased the concentration of IGF1, recovering embryos per collection and pregnancy maintenance in blastocyst stage embryos.

Keywords: somatotropin; embryo transfer; fertility; dairy cows

1. Introdução e justificativas do estudo

A produção de leite por vaca aumentou durante os últimos anos, devido combinação de melhor gestão, nutrição e seleção genética, porém ocorreu diminuição na eficiência reprodutiva [1]. Apesar da correlação genética antagônica entre produção de leite e reprodução, a herdabilidade para características que medem a fertilidade é baixa, portanto há outros fatores que influenciam a fertilidade da vaca [2], como por exemplo, estresse térmico [3], nutrição e hormônios metabólicos [4], e sanidade [5].

Vacas em lactação sofrem com os efeitos deletérios do estresse térmico, com menor taxa de fertilização e menor desenvolvimento embrionário [6]. Além disso, maior produtividade está associada à maior sensibilidade das vacas aos efeitos negativos do estresse calórico na fertilidade, como demonstrado por al-Katanani, et al. [7] nos Estados Unidos, por Lopez-Gatius [8] na Espanha, e por Vasconcelos, et al. [9] no Brasil.

Vacas em lactação apresentam menor concentração de IGF1 [10,11] que vacas não lactantes, principalmente no pós-parto, quando ocorre redução na concentração de IGF1 [12]. Esse fator de crescimento é importante para o crescimento folicular [1,4,13] e desenvolvimento do embrião [10,11,14,15], além de promover efeito protetor contra o choque térmico no embrião [3,16-18]. A somatotropina bovina tem efeito benéfico para a maturação oocitária e clivagem [19,20], aumenta a produção de IGF1 [21,22], e a utilização de bST e/ou IGF1 *in vivo*, ou *in vitro* é uma estratégia que tem se mostrado eficiente para aumentar a manutenção da gestação em vacas leiteiras [14,15,22-25].

A TE vem sendo utilizada como estratégia para aumentar a fertilidade, pois permite que as vacas recebam um embrião de boa qualidade, minimizando possíveis problemas na qualidade do oócito e do embrião, devido maior período de dominância folicular [26,27]; e baixa concentração de progesterona durante o crescimento do folículo ovulatório [28] e durante o desenvolvimento inicial do embrião [29]. A TE minimiza os efeitos deletérios do estresse térmico prévios a TE [3], aumentando a concepção quando comparada às taxas obtidas com IA, tanto nos Estados Unidos [30,31], como no Brasil [9,32-36].

O presente trabalho pretende avaliar se dose reduzida de bST associada a protocolo de superovulação aumenta a produção de embriões e a manutenção da gestação. A hipótese é que o aumento do hormônio de crescimento durante o

desenvolvimento embrionário inicial melhora a produção *in vivo* de embriões e a manutenção da gestação.

2. Materiais e métodos

2.1. Animais e tratamentos

O trabalho foi realizado na FMVZ – UNESP – Campus de Botucatu, no programa de pós-graduação em Zootecnia, junto ao Departamento de Produção Animal.

O experimento foi realizado na Central Pioneiros de doadoras de embriões localizada em Carambeí-PR. Foram utilizadas doadoras da raça Holandesa, sendo vacas secas alojadas em barracão climatizado com sistema de ventilação cruzada, e novilhas alojadas em *freestall*. Os animais receberam alimentação a base de silagem de milho e de sorgo, silagem pré-secada de aveia e azevém, e ração concentrada, com acesso a piquetes com forragem tifton durante a noite.

Todas as doadoras foram submetidas ao seguinte protocolo de superovulação (**Figura 1**): Colocação de um dispositivo intravaginal de P4 (CIDR®, 1,9g de P4, Zoetis, SP, Brasil) no d-9 pela manhã; 2mg de benzoato de estradiol (BE, 2,0mL, IM – Estrogin®, Farmavet, SP, Brasil) no d-9 à tarde; tratamentos superestimulatórios com a aplicação de duas doses diárias (2,0; 1,5; 1,0 e 0,5 mL = 200mg em novilhas e 400mg em vacas) e decrescentes do hormônio folículo-estimulante (FSH 20mg/mL, IM – Folltropin-V®, Bioniche Animal Health, Belleville, ON, Canadá) do d-5 à tarde ao d-1 de manhã; uma injeção de PGF2 α (25,0mg, IM – Lutalyse®, Zoetis, SP, Brasil) no d-3 à tarde e outra dose com 12h de intervalo; o CIDR foi removido no d-1 pela manhã; na manhã do d0 as doadoras receberam gonadorelina (2 ml GnRH, 200 μ g – IM – Fertagyl®, Intervet/Schering-Plough, SP, Brasil) e foram inseminadas 12 e 24h após. No início do protocolo, os animais de ambas as categorias (Vaca seca ou Novilha) foram distribuídas aleatoriamente entre os tratamentos. Foi utilizado sêmen comercial descongelado de touros da raça holandesa (n=25), distribuídos de forma balanceada entre os tratamentos.

O grupo controle (**CONT** = 87 animais, 72 novilhas e 15 vacas) não recebeu bST; o grupo **bST/IA** (89 animais, 75 novilhas e 14 vacas) recebeu uma dose de bST no dia da IA (0,8ml de bST, SC - 333 mg de sometribove zinco; Lactotropin®, Elanco

Saúde Animal); e o grupo **bST/InIA** (91 animais, 76 novilhas e 15 vacas) recebeu duas doses de 333mg de bST, uma no início do protocolo e outra no dia da IA.

Com 6,5 dias após a primeira inseminação foi realizada a coleta não cirúrgica dos embriões, os quais foram selecionados e classificados em laboratório e foram transferidos a fresco, conforme descrito por [33].

Figura 1: Esquematização do delineamento experimental.

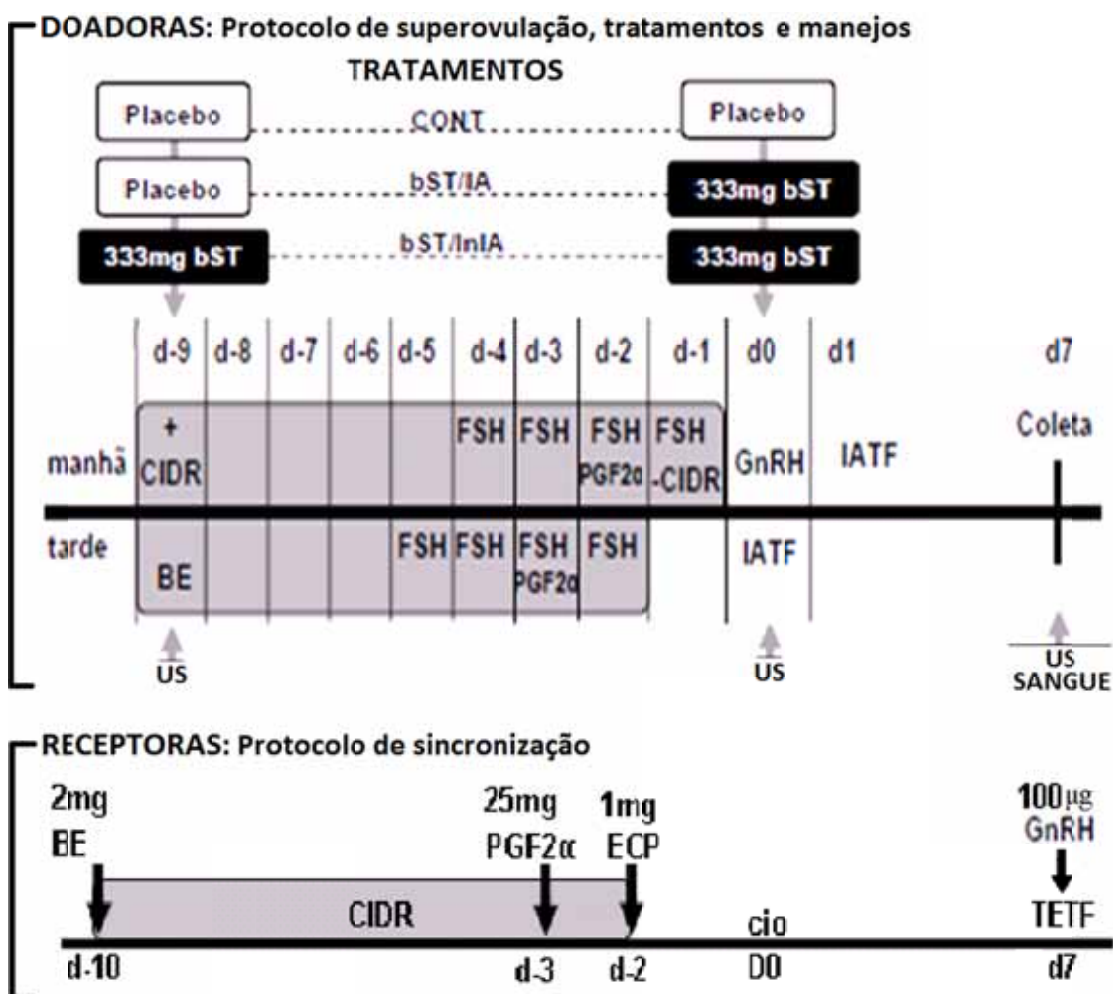


Figura 1: Protocolo de superovulação das doadoras: CIDR no d-9 pela manhã; 2mg de BE no d-9 à tarde; tratamento superovulatório com FSH (20mg/ml - duas doses de 2,0; 1,5; 1,0 e 0,5ml para novilhas e duas doses de 4,0; 3,0; 2,0; e 1ml para vacas secas) do d-5 a tarde ao d-1 de manhã; 25mg de PGF2α no d-3 a tarde e no d-2 de manhã; remoção do CIDR no d-1 de manhã; 200μg de GnRH no d0 pela manhã; IATF no d0 a tarde e d1 de manhã; Coleta de embriões no d7 de manhã. **Tratamentos:** grupo controle (CONT = injeções placebo no d-9 e d0); grupo que recebeu apenas uma dose de bST (bST/IA = injeção placebo no d-9 e 333mg de bST no d0); grupo que recebeu duas doses de bST (bST/InIA = injeção de 333mg de bST e no d0). **Protocolo de sincronização das receptoras:** CIDR + BE no d-10; PGF2α no d-3; ECP no d-2; TETE no d7 + injeção de GnRH.

2.2. Coleta e transferência de embriões

Coleta:

A coleta não cirúrgica foi realizada 6,5 dias após a primeira inseminação, utilizando um sistema de infusão com duas vias, acoplado a uma sonda de foley, a qual foi instalada nos cornos uterinos para lavagem individual dos mesmos com solução de coleta (D-PBS, Vitrocell®, Vitrocell Embriolife, SP, Brasil), recuperando as estruturas em filtro estéril. As estruturas foram selecionadas e classificadas em laboratório de acordo com a IETS (1998). Os embriões transferíveis foram classificados de acordo com o grau de qualidade como grau 1 (G1 = Excelente) ou grau 2 (G2 = bom); e quanto ao estágio de desenvolvimento, foram classificados como mórula (Mo), blastocisto inicial (Bi), blastocisto (Bl) e blastocisto expandido (Bx) para os estágios 4, 5, 6 e 7 respectivamente. Embriões em estágio atrasado (<12 células), bem como embriões com grau de qualidade pobre (grau ≥ 3), foram considerados degenerados.

Transferência:

Receptoras holandesas em lactação, alojadas em *freestall* com sistema de ventilação forçada e aspersão, produção média de leite de $37,0 \pm 8,9$, DEL médio de $226,9 \pm 89,7$ e escore de condição corporal médio de $3,2 \pm 0,54$; recebendo bST com intervalo de 14 dias, iniciado a partir de 80 ± 20 dias de lactação, foram previamente sincronizadas para TETF, iniciado o protocolo (**Figura 1**) um dia antes das doadoras com CIDR + BE no d-10; PGF2 α no d-3; remoção do CIDR + cipionato de estradiol (ECP, IM - 0.5 mL de E.C.P.®, Zoetis, SP, Brasil) no d-2. A ovulação foi determinada pela presença de CL avaliado por ultrassom no d7, e as receptoras ovuladas receberam embriões oriundos dos três grupos de tratamento, sendo distribuídos entre elas de forma aleatória. Após assepsia da região vulvar e peri-vulvar, foi realizada a inovulação de um único embrião fresco por via transcervical, sendo feita a deposição no terço final do corno ipsilateral ao CL como descrito por [33]. Todas as receptoras receberam 100 μ g de gonadorelina no momento da TE [34]. Foram transferidos 188 embriões CONT; 264 embriões do grupo bST/IA e 272 do grupo bST/InIA, devido a produção de quantidade diferente de embriões por tratamento.

2.3. Avaliações ultrassonográficas e diagnóstico de gestação

Avaliação ultrassonográfica no momento da TETF foi realizada na receptoras utilizando o aparelho de ultrassom Honda portátil, com transdutor linear multifrequencial na opção 7,5MHz, para determinar a presença do CL, indicado o corno a ser inovulado o embrião. As vacas que receberem embrião foram avaliadas para diagnóstico de gestação precoce aos 30 dias, e em caso positivo, reavaliadas para confirmação aos 60 dias de gestação (23 e 53 dias após a TE respectivamente).

2.4. Amostras de sangue, escore de condição corporal, produção de leite e DEL.

Foi colhida uma amostra de sangue da veia coccígea utilizando tubos com vácuo sem anticoagulante (Vacutainer[®]) no d7 (dia da coleta de embriões) para dosagem de IGF1. Após a colheita, o sangue foi imediatamente acondicionado na posição vertical, em recipiente isolante térmico com gelo, e logo após, mantido por 12 - 24h em refrigerador a 4°C em média. As amostras foram centrifugadas a 3000 g por 10 minutos à temperatura ambiente, para separação do soro, armazenado em freezer em torno de – 20°C até a realização das dosagens.

As dosagens para IGF1 total foram realizadas no Grupo São Camilo – Medicina Diagnóstica (Veterinária)/Maringá, sendo analisadas amostras de 181 doadoras (CONT = 56; bST/IA = 62 e bST/InIA = 63), utilizando a técnica de Imunoensaio imunométrico de fase sólida, marcado enzimaticamente por quimio-luminescência (IMMULITE 2000 IGF-I - Erlangen, Alemanha) para dosagem de IGF1 total. Todas as amostras foram analisadas num único ensaio, e o CV intra-ensaio foi de 6,4%.

O ECC foi avaliado no momento do início do protocolo para as doadoras e no momento da TE para as receptoras, seguindo a classificação descrita por [33].

A produção de leite das receptoras foi medida diariamente entre d0 e d7, e a média diária de produção nesse intervalo foi utilizada nas análises. Também foi considerado para as análises o DEL das receptoras no dia da TE.

2.5. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo método dos quadrados mínimos ANOVA do SAS®, e a comparação das médias das dessas variáveis dentro dos tratamentos foi feita através do teste de Tukey-Kramer. Variáveis dependentes contínuas como concentração de IGF1 das doadoras, número de estruturas recuperadas por coleta de embriões (estruturas totais, não fertilizadas, degeneradas e transferíveis), e número de embriões viáveis por coleta de acordo com estágio de desenvolvimento (mórula, blastocisto e blastocisto expandido) e grau de qualidade (G1, G2), foram avaliadas pelo procedimento MIXED do SAS, incluindo no modelo o efeito do tratamento, categoria da doadora e interações. Utilizou-se o teste Qui-Quadrado para analisar o efeito do tratamento na proporção de estruturas transferíveis, não fertilizadas e degeneradas em relação ao total de estruturas recuperadas, e a distribuição das estruturas transferíveis de acordo com o estágio de desenvolvimento e grau de qualidade. Nesta análise foram retirados os dados de 6 doadoras do grupo CONT, 6 do grupo bST/IA e 5 do grupo bST/InIA devido não classificação das estruturas coletadas. As variáveis binomiais, taxa de aproveitamento das doadoras e taxa de concepção das receptoras aos 30 e 60 dias foram analisadas pelo PROC GLIMMIX do SAS. No modelo para análise da prenhez das receptoras incluiu-se o efeito do tratamento, estágio de desenvolvimento e grau de qualidade do embrião, ordem de lactação e apresentação de cio das receptoras 7 dias antes da TE, bem como o DEL e produção de leite das receptoras como co-variáveis. Aproximação Satterthwaite foi utilizada para determinar os graus de liberdade do denominador para os testes de efeitos fixos com a instrução aleatória contendo o efeito do grupo. Variáveis com nível de significância $P > 0,10$ foram removidas do modelo estatístico. Os resultados são expressos como médias ajustadas (LSM) $\pm$ o erro padrão médio (SEM) para variáveis contínuas e porcentagem (LSM) para as variáveis binomiais. As diferenças foram consideradas significativas quando $P \leq 0,05$, e diferenças entre $P > 0,05$ e $P \leq 0,10$ foram consideradas como tendência.

3. Resultados

A concentração de IGF1 no d7 foi maior ($P < 0,01$) para animais tratados com uma ou duas doses de bST, em comparação ao grupo controle, e não foram diferentes entre si (**Tabela 1**). Novilhas ($280,8 \pm 9,3$ ng/mL) apresentaram maior ($P = 0,04$) concentração de IGF1 que vacas secas ($238,0 \pm 18,7$ ng/mL).

Tabela 1. Concentração de IGF1 no d7, número de estruturas por coleta (estruturas totais, não fertilizadas, degeneradas e transferíveis) por tratamento e categoria da doadora – LSM $\pm$ SEM.

Variável	Tratamento				Categoria Doadora		
	CONT	bST/IA	bST/InIA	P	Novilha	Vaca Seca	P
IGF1 ¹	195,8 $\pm$ 13,3 b	306,4 $\pm$ 13,0 a	307,3 $\pm$ 12,4 a	0,01	280,8 $\pm$ 9,3 a	238,0 $\pm$ 18,7 b	0,04
Aproveitamento ²	65,2% b	75,7% ^a	78,8% ^a	0,05	72,3% ^x	86% ^y	0,07
Estruturas/coleta ³							
Totais	6,2 $\pm$ 0,9 x	8,6 $\pm$ 0,9 y	8,5 $\pm$ 0,9 y	0,1	6,3 $\pm$ 0,5 a	15 $\pm$ 1,1 b	0,01
Não Fertilizadas	2,1 $\pm$ 0,5 xy	1,3 $\pm$ 0,5 x	2,6 $\pm$ 0,5 y	0,26	1,2 $\pm$ 0,3 a	5,7 $\pm$ 0,7 b	0,01
Degeneradas	0,7 $\pm$ 0,2 x	1,3 $\pm$ 0,2 y	1,2 $\pm$ 0,2 y	0,09	1,1 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,3	0,73
Transferíveis	3,4 $\pm$ 0,6 ax	6,0 $\pm$ 0,6 by	4,7 $\pm$ 0,6 z	0,01	4,0 $\pm$ 0,3 a	8,1 $\pm$ 0,7 b	0,01

¹ Concentração de IGF1 total no soro, em ng/mL;

² Número de doadoras que produziram ao menos uma estrutura, sobre o total de doadoras superovuladas;

³ Número de estruturas recuperadas por coleta (número de estruturas / número de coletas) ;

abc: letras diferentes na mesma linha = diferença estatística - $P \leq 0,05$;

xyz: letras diferentes na mesma linha = tendência estatística - $0,05 \leq P \leq 0,1$;

A taxa de aproveitamento dos grupos tratados com bST foi maior ($P < 0,05$) que do grupo controle, e não foram diferentes entre si (**Tabela 1**). Vacas secas tenderam ($P = 0,07$) a apresentar maior aproveitamento que novilhas (86% vs 72,3%).

Houve tendência de tratamento com bST aumentar o número de estruturas totais em relação ao grupo controle (CONT). O número de estruturas não fertilizadas no grupo bST/IA não diferiu do controle e tendeu a ser menor que do grupo bST/InIA. Animais tratados com uma ou duas doses de bST tenderam a apresentar maior número de estruturas degeneradas que animais não tratados. O grupo bST/IA apresentou maior número de embriões transferíveis por coleta em relação ao grupo CONT, e tendeu a ser maior que o grupo bST/InIA (**Tabela 1**).

Vacas secas apresentaram maior ($P < 0,01$) número de estruturas totais (15,5 $\pm$ 1,1 vs 6,3 $\pm$ 0,5), não fertilizadas (5,7 $\pm$ 0,7 vs 1,2 $\pm$ 0,3) e viáveis (8,1 $\pm$ 0,7 vs 4,0 $\pm$ 0,3)

em comparação as novilhas, no entanto não houve efeito de categoria ($P=0,73$) no número de estruturas degeneradas ($1,2 \pm 0,3$ vs $1,1 \pm 0,1$) (**Tabela 1**).

Houve efeito do tratamento na proporção de estruturas não fertilizadas e transferíveis em relação ao total de estruturas recuperadas. O grupo bST/IA apresentou menor ($P<0,05$) proporção de estruturas não fertilizadas ($15,4\% = 117/762$) que o grupo CONT ($33,3\% = 181/543$) e que o grupo bST/InIA ($29,7\% = 229/770$). Foi detectado efeito de tratamento na proporção de embriões transferíveis, sendo maior para animais do grupo bST/IA ($69,9\% = 533/762$), do que para animais CONT e bST/InIA ($54,7\% = 297/543$ e $55,8\% = 430/770$ respectivamente). Vacas secas apresentaram maior proporção de estruturas não fertilizadas ($37,9\% = 250/660$ vs $19,6\% = 277/1415$), menor proporção de degenerados ($8,0\% = 51/660$ vs $16,7\% = 237/1415$) e de transferíveis ($54,4\% = 359/660$ vs $63,7\% = 901/1415$) em relação as novilhas.

Animais que receberam uma dose de bST tenderam a apresentar maior número de mórulas em relação aos animais do grupo controle, mas não diferiu dos animais que receberam duas doses de bST. O grupo CONT não diferiu do grupo bST/InIA. Os grupos que receberam uma ou duas doses de bST não apresentaram diferença no número de blastocistos recuperados por coleta, no entanto o grupo bST/IA teve maior número de blastocistos em relação ao controle, e tendência do grupo bST/InIA aumentar o número de blastocistos por coleta em relação ao controle (**Tabela 2**). Quanto ao grau de qualidade, o tratamento com uma dose de bST (bST/IA) aumentou o número de embriões excelentes (grau 1) recuperados por coleta em relação ao controle (CONT), enquanto que animais que receberam duas doses de bST (bST/InIA) apresentaram valores intermediários, não diferindo dos demais grupos (CONT e bST/IA) (**Tabela 2**). Os tratamentos com bST (bST/IA ou bST/InIA) tenderam a aumentar o número de embriões bons (grau 2) em relação aos animais controle (CONT), e não diferiram entre si (**Tabela 2**).

O grupo controle apresentou maior proporção de mórulas e consequentemente menor proporção de blastocistos [CONT = $53,0$ e $47,0\%$ (272)] que os demais grupos [bST/IA = $47,8$ e $52,2\%$ (475) e bST/InIA = 46 e 54% (411)], que não diferiram entre si (**Tabela 2**). A proporção quanto a qualidade dos embriões recuperados não foi influenciada pelos tratamentos (**Tabela 2**), animais do grupo CONT, bST/IA e bST/InIA apresentaram respectivamente 79% ($214/272$), 80% ($378/475$) e 76% ($311/411$) de embriões grau 1; e 21% ($58/272$), 20% ($97/475$) e 24% ($100/411$) de embriões grau 2.

Tabela 2. Número de embriões por coleta de acordo com o estágio de desenvolvimento e grau de qualidade por tratamento e categoria da doadora – LSM±SEM.

Variável ¹	Tratamentos				Categoria Doadora		
	CONT	bST-IA	bST-INIA	P	Novilha	Vaca Seca	P
Estágio							
Mórula	1,8 ±0,4 y	2,7 ±0,4 x	2,2 ±0,3 xy	0,2	2,3±0,2	2,1±0,5	0,8
Blastocisto	1,6 ±0,4 by	3,0 ±0,4 a	2,6 ±0,4 x	0,04	1,8±0,2 a	5,9±0,6 b	0,01
Qualidade							
Excelente	2,7 ±0,5 b	4,6 ±0,5 a	3,6 ±0,5 ab	0,02	3,2±0,3 a	6,3±0,7 b	0,01
Bom	0,7 ±0,2 y	1,1 ±0,2 x	1,2 ±0,2 x	0,08	0,9±0,1 a	1,8±0,2 b	0,01

¹ Número de estruturas recuperadas por coleta (número de estrutura/número de doadoras);

ab: letras diferentes na mesma linha = diferença estatística - $P \leq 0,05$;

xy: letras diferentes na mesma linha = tendência estatística - $0,05 \leq P \leq 0,1$;

A categoria da doadora afetou ($P < 0,05$) o número de blastocistos por coleta e o número de embriões grau 1 e 2, mas não afetou ($P = 0,8$) o número de mórulas recuperadas por coleta (**Tabela 2**). Vacas secas ($n = 281$ embriões) apresentaram menor proporção de mórulas (26,7%) e maior proporção de blastocistos (73,3%) que novilhas (55,3% de mórulas e 44,7% de blastocistos $n = 877$). A proporção de embriões grau 1 ($n = 77,9\%$ vs $78,0\%$) e grau 2 (22,1% e 22,0%) em vacas secas e novilhas, respectivamente, não foi diferente. (**Tabela 2**).

3.1. Transferência de embriões

A qualidade morfológica do embrião, ordem de lactação da receptora e expressão de estro afetaram ($P < 0,1$) a P/TE aos 30 e 60 dias (**Tabela 3**).

Tabela 3. Prenhez por TE (P/TE) aos 30 e 60 dias de acordo com a qualidade do embrião, ordem de lactação apresentação de cio da receptora – LSM %.

Variáveis			PRENHEZ POR TE	
			P/TE d30	P/TE d60
Qualidade ¹	G1	537	40,7%	32,8%
	G2	187	32,4%	23,3%
			$P = 0,06$	$P = 0,02$
Ordem ²	Primípara	330	43,0%	32,2%
	Múltipara	394	30,0%	24,0%
			$P = 0,001$	$P = 0,03$
Cio ³	Sim	353	43,1%	33,5%
	Não	286	30,0%	22,6%
			$P = 0,0006$	$P = 0,003$

¹ Qualidade embrionária: G1 = excelente; G2 = Bom;

² Ordem de lactação da receptora

³ Cio: apresentação de cio das receptoras 7 dias antes da TE (Obtidos por observação natural mais dados de Pedometria)

Foi detectada interação ($P < 0,01$) entre tratamento e estágio de desenvolvimento do embrião na Prenhez por TE (**Tabela 4**). Nos grupos tratados com uma (bST/IA) ou duas doses de bST (bST/InIA) blastocistos apresentaram maior ($P < 0,05$) P/TE aos 30 e 60 dias que blastocistos do grupo controle (CONT), enquanto que as mórulas de doadoras tratadas apresentaram menor fertilidade que as não tratadas.

Tabela 4. Prenhez por TE (P/TE) aos 30 e 60 dias por tratamento de acordo com o estágio de desenvolvimento do embrião transferido – LSM % (com n/n entre parênteses).

	Estágio	Tratamentos			Valor de P
		CONT	bST/IA	bST/InIA	
P/TE d30	Mórula	44,5%(47/107) a	29,9%(38/127) b	36,7%(47/119) ab	0,04
	Blastocisto	25,2%(26/81) b	39,3%(57/137) a	42,7%(69/153) a	0,04
	Valor de P	0,007	0,13	0,3	
P/TE d60	Mórula	35,3%(38/107) y	24,4%(32/127) x	24,8%(31/119) x	0,17
	Blastocisto	15,8%(17/81) b	35,5%(52/137) a	32,4%(56/153) a	0,02
	Valor de P	0,006	0,06	0,2	

ab: letras diferentes na mesma linha = diferença estatística - $P \leq 0,05$;

xy: letras diferentes na mesma linha = tendência estatística - $0,05 \leq P \leq 0,1$;

4. Discussão

O objetivo deste estudo foi avaliar se aplicação de dose reduzida de bST (333mg) no protocolo de superovulação melhora a produção de embriões e a manutenção da gestação após transferência de embriões para receptoras em lactação, pois estudos mostram que o IGF1 possui efeito protetor contra o choque térmico, com redução na apoptose celular, e aumento no desenvolvimento embrionário.

O tratamento com uma ou duas doses de bST aumentou a concentração sérica de IGF1, em comparação às doadoras controle. Ribeiro, et al. [22] utilizaram 325mg de bST no momento da inseminação e observaram diferença no terceiro dia após o tratamento em vacas lactantes. Outros estudos também mostraram resultados similares [10,11,21] utilizando 500 mg de bST. Os dados de literatura mostram que a concentração de IGF em vacas lactantes é menor em comparação às concentrações dos animais não lactantes [10,11,21,22]. Em nosso estudo a concentração de IGF1 também foi diferente entre vacas secas e novilhas após o tratamento com bST.

Nesse estudo observou-se que o tratamento com bST aumentou a taxa de aproveitamento, e o número de estruturas recuperadas por coleta, em comparação aos animais não tratados. Uma possível explicação para esse resultado é que a utilização de bST altera o recrutamento folicular, aumentando o número de folículos [37-41] devido a maior concentração de IGF1 que age em sinergia com o FSH em folículos pré antrais. No entanto resultados deste experimento sugerem que a principal explicação para os resultados são devido à ação do GH e/ou IGF1 na maturação oocitária, fertilização e desenvolvimento inicial do embrião, visto que o grupo que recebeu apenas uma dose no momento da IA (bST/IA), não sofreu efeitos do tratamento sobre o recrutamento folicular, mas ainda assim apresentou resultados semelhantes aos animais previamente tratados com bST no início do protocolo (bST/InIA). A suplementação do meio de maturação com bGH resultou em maior expansão das células do cumulus, favorecendo a maturação nuclear e reativação da meiose nos oócitos [19,20,42]. Além disso, a ação endócrina do bGH e do IGF1 em folículos dominantes, promove alteração na concentração de IGF2 e outros fatores de crescimento intrafoliculares que estão associados à maturação e ovulação [43-46]. Esses efeitos podem explicar a melhora na fertilidade e na recuperação de embriões viáveis observada no presente estudo. Observou-se que a dose de bST no dia IA (bST/IA) promoveu melhora na fertilização em relação ao controle. Moreira, et al. [15] também observaram aumento na proporção de estruturas viáveis recuperadas, quando usou 500mg de bST no momento da IA. No presente estudo, o tratamento com duas doses de bST, sendo a primeira no início do protocolo de superovulação, não alterou a proporção de embriões transferíveis em relação ao controle, mas tendeu a aumentar o número de embriões transferíveis, porém tendeu a apresentar menor número de embriões viáveis em relação ao grupo que recebeu uma dose de bST no momento da IA. Isso pode estar relacionado a possíveis efeitos negativos da concentração muito alta de IGF1, no momento da fertilização e desenvolvimento inicial do embrião, visto que no grupo bST/InIA a concentração de IGF1 provavelmente já estava mais alta nesse momento devido a dose prévia de bST no início do protocolo. Isso sugere que concentrações altas de IGF1 podem prejudicar a qualidade dos oócitos e/ou de embriões no início do desenvolvimento. Outros trabalhos demonstraram que excesso de IGF1 prejudicou a fertilidade em roedores, sugerindo que esse efeito possa estar relacionado a *downregulation* dos receptores de IGF1 no embrião [47,48], que prejudicam a absorção de glicose e metabolismo das células embrionárias, aumentando a apoptose celular. Mulheres policísticas, com hiperinsulenemia, e

consequentemente maior concentração de IGF1, apresentam menor sobrevivência embrionária que mulheres saudáveis [49]. Em bovinos, existem relatos que avaliaram o efeito de diferentes níveis nutricionais na concentração dos hormônios metabólicos e demonstraram que dietas altamente energéticas resultam em aumento na concentração de insulina e IGF1, que foi associado a maior crescimento folicular em detrimento a qualidade oocitária, resultando em menor recuperação de blastocistos viáveis [50-52].

O tratamento com uma dose de bST (bST/IA) aumentou o número de blastocistos, e duas doses (bST/InIA) tendeu a aumentar o número de blastocistos recuperados em relação ao controle. A proporção de blastocistos tendeu ser maior em animais tratados com duas doses, em relação aos demais grupos. Trabalhos *in vitro* mostram que a utilização de GH no meio de maturação antecipou a clivagem além de aumentar a proporção de blastocistos recuperados (IZADYAR ET AL., 1997; IZADYAR ET AL., 2000). Em outros estudos, resultados semelhantes foram observados com adição de IGF1 ao meio de cultivo [14,20,23]. O aumento da recuperação de blastocistos também foi observada *in vivo* com a utilização de bST no momento da inseminação de doadoras superovuladas [15]. Além disso, duas doses consecutivas com 11 dias de intervalo a partir da inseminação, aumentou o tamanho do conceito e a concentração de interferon-tau aos 17 dias de gestação [10,11]. Alguns estudos ainda observaram efeito protetor do IGF1 ao choque térmico, pois o IGF aumentou a clivagem e recuperação de blastocistos em meios de cultivo submetidos ao estresse térmico, devido provavelmente a alterações na expressão gênica para fatores que reduzem a apoptose das células embrionárias [17,18,53].

A manifestação de cio influenciou na manutenção da gestação nas receptoras, o que provavelmente esteja relacionado com maior concentração de estrógeno próximo à ovulação que propicia ambiente uterino mais favorável à manutenção da gestação [33,62,63]. De fato, o ambiente uterino favorável garante uma produção ótima de histotrofo, que favorece o crescimento do embrião, e consequentemente favorece a secreção de interferon-tau para o reconhecimento materno e manutenção da gestação.

A hipótese deste experimento era que embriões de doadoras tratadas com bST aumentasse a fertilidade na TE, devido ao efeito do bGH na maturação, bem como ao efeito do bGH e/ou IGF1 no desenvolvimento inicial do embrião. Além disso, quando blastocistos produzidos *in vitro* em meio com adição de IGF1, ocorreu aumento da prenhez após transferência para receptoras que se encontravam em estresse térmico [14,23], sugerindo efeito protetor do IGF1 em embriões desafiados com calor.

No presente estudo, observou-se interação entre tratamento e estágio de desenvolvimento do embrião na manutenção da gestação. Os resultados mostraram que blastocistos de doadoras tratadas com uma ou duas doses de bST, tiveram maior manutenção da gestação que blastocistos do grupo controle. Não foi avaliado a condição de estresse calórico das receptoras, mas no Brasil as vacas estão com estresse térmico em praticamente todos os períodos do ano. Estes resultados estão de acordo com o observado por Block, et al. [14] e Block and Hansen [23], que verificaram que blastocistos cultivados *in vitro* com IGF1 aumentaram a prenhez em receptoras em estresse calórico. Interessante observar que o efeito do tratamento observado apenas nos blastocistos corroboram com outros trabalhos que demonstraram que os embriões são mais resistentes, quando em estágios mais avançados [3,17,18,69-73]. Outros estudos mostraram que o tratamento com bST acelera o desenvolvimento do embrião, por reduzir apoptose de células embrionárias iniciais, favorecendo o reconhecimento materno de gestação e melhorando a prenhez [11,15,22,24,25,74]. Pode-se sugerir que os tratamentos com bST promoveram o desenvolvimento de algumas estruturas até estágio de mórula, mas essas estruturas que já eram atrasadas e de pior qualidade e não foram capazes de continuar o seu desenvolvimento, o que explica em parte, a menor prenhez de mórulas dos grupos tratado. Acredita-se que as alterações mediadas pelo IGF1 no embrião são moduladas pelo desenvolvimento embrionário, ou seja, a ativação dos receptores, e ação do IGF1 é mais evidente à medida que o embrião se desenvolve. Isso foi observado em trabalho que avaliou a resposta embrionária ao IGF1 adicionado em meio de cultivo *in vitro*, onde o IGF não foi capaz de prevenir os efeitos do choque térmico em embriões com 2 células, mas reduziu os efeitos do calor em embriões com mais de 16 células, apesar de os primeiros apresentarem maior quantidade de RNAm de receptores de IGF e componentes de ligação do IGF1 [53], sugerindo que a ação do IGF1 no embrião é regulada pelo desenvolvimento do mesmo. Esse provavelmente é um mecanismo de prevenção contra danos provenientes de acúmulo de proteínas degeneradas e/ou radicais livres no embrião inicial [71].

Como conclusão, o tratamento com dose reduzida (333mg) de bST em doadoras não lactantes aumentou a concentração de IGF1 7 dias após aplicação, o aproveitamento e a recuperação de estruturas totais, mas apenas o grupo que recebeu uma única dose na IA (bST/IA) aumentou o número de embriões transferíveis. Os tratamentos com bST aumentaram a manutenção de gestação de blastocistos, mas não de mórulas.

5. Referencias

- [1] Lucy MC. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? *J Dairy Sci* 2001;84: 1277-93.
- [2] Hansen LB. Consequences of selection for milk yield from a geneticist's viewpoint. *J Dairy Sci* 2000;83: 1145-50.
- [3] Hansen PJ. To be or not to be--determinants of embryonic survival following heat shock. *Theriogenology* 2007;68 Suppl 1: S40-8.
- [4] Lucy MC. Growth hormone regulation of follicular growth. *Reprod Fertil Dev* 2011;24: 19-28.
- [5] Pereira MH, Cooke RF, Alfieri AA, Vasconcelos JL. Effects of vaccination against reproductive diseases on reproductive performance of lactating dairy cows submitted to AI. *Anim Reprod Sci* 2013;137: 156-62.
- [6] Sartori R, Sartor-Bergfelt R, Mertens SA, Guenther JN, Parrish JJ, Wiltbank MC. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J Dairy Sci* 2002;85: 2803-12.
- [7] al-Katanani YM, Webb DW, Hansen PJ. Factors affecting seasonal variation in 90-day nonreturn rate to first service in lactating Holstein cows in a hot climate. *J Dairy Sci* 1999;82: 2611-6.
- [8] Lopez-Gatius F. Is fertility declining in dairy cattle? A retrospective study in northeastern Spain. *Theriogenology* 2003;60: 89-99.
- [9] Vasconcelos JL, Cooke RF, Jardina DT, Aragon FL, Veras MB, Soriano S, Sobreira N, Scarpa AB. Associations among milk production and rectal temperature on pregnancy maintenance in lactating recipient dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2011;127: 140-7.
- [10] Bilby TR, Guzeloglu A, Kamimura S, Pancarci SM, Michel F, Head HH, Thatcher WW. Pregnancy and bovine somatotropin in nonlactating dairy cows: I. Ovarian, conceptus, and insulin-like growth factor system responses. *J Dairy Sci* 2004;87: 3256-67.
- [11] Bilby TR, Block J, do Amaral BC, Sa Filho O, Silvestre FT, Hansen PJ, Staples CR, Thatcher WW. Effects of dietary unsaturated fatty acids on oocyte quality and follicular development in lactating dairy cows in summer. *J Dairy Sci* 2006;89: 3891-903.
- [12] Lucy M, Jiang H, Kobayashi Y. Changes in the somatotrophic axis associated with the initiation of lactation. *J Dairy Sci* 2001;84: E113-E19.
- [13] Lucy MC. Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. *J Dairy Sci* 2000;83: 1635-47.
- [14] Block J, Drost M, Monson RL, Rutledge JJ, Rivera RM, Paula-Lopes FF, Ocon OM, Krininger CE, 3rd, Liu J, Hansen PJ. Use of insulin-like growth factor-I during embryo culture and treatment of recipients with gonadotropin-releasing

- hormone to increase pregnancy rates following the transfer of in vitro-produced embryos to heat-stressed, lactating cows. *J Anim Sci* 2003;81: 1590-602.
- [15] Moreira F, Badinga L, Burnley C, Thatcher WW. Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. *Theriogenology* 2002;57: 1371-87.
 - [16] Block J, Wrenzycki C, Niemann H, Herrmann D, Hansen PJ. Effects of insulin-like growth factor-1 on cellular and molecular characteristics of bovine blastocysts produced in vitro. *Mol Reprod Dev* 2008;75: 895-903.
 - [17] Jousan FD, Hansen PJ. Insulin-like growth factor-I as a survival factor for the bovine preimplantation embryo exposed to heat shock. *Biol Reprod* 2004;71: 1665-70.
 - [18] Jousan FD, Hansen PJ. Insulin-like growth factor-I promotes resistance of bovine preimplantation embryos to heat shock through actions independent of its anti-apoptotic actions requiring PI3K signaling. *Mol Reprod Dev* 2007;74: 189-96.
 - [19] Izadyar F, Van Tol HT, Colenbrander B, Bevers MM. Stimulatory effect of growth hormone on in vitro maturation of bovine oocytes is exerted through cumulus cells and not mediated by IGF-I. *Mol Reprod Dev* 1997;47: 175-80.
 - [20] Moreira F, Paula-Lopes FF, Hansen PJ, Badinga L, Thatcher WW. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on development of in vitro derived bovine embryos. *Theriogenology* 2002;57: 895-907.
 - [21] Aboin AC, Cooke RF, Vieira FVR, Leiva T, Vasconcelos JLM. Effects of bovine somatotropin injection on serum concentrations of progesterone in non-lactating dairy cows. *Livestock Science* 2013;154: 240-45.
 - [22] Ribeiro ES, Bruno RG, Farias AM, Hernandez-Rivera JA, Gomes GC, Surjus R, Becker LF, Birt A, Ott TL, Branen JR, Sasser RG, Keisler DH, Thatcher WW, Bilby TR, Santos JE. Low doses of bovine somatotropin enhance conceptus development and fertility in lactating dairy cows. *Biol Reprod* 2014;90: 10.
 - [23] Block J, Hansen PJ. Interaction between season and culture with insulin-like growth factor-1 on survival of in vitro produced embryos following transfer to lactating dairy cows. *Theriogenology* 2007;67: 1518-29.
 - [24] Moreira F, Orlandi C, Risco CA, Mattos R, Lopes F, Thatcher WW. Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2001;84: 1646-59.
 - [25] Moreira F, Risco CA, Pires MF, Ambrose JD, Drost M, Thatcher WW. Use of bovine somatotropin in lactating dairy cows receiving timed artificial insemination. *J Dairy Sci* 2000;83: 1237-47.
 - [26] Cerri RL, Rutigliano HM, Chebel RC, Santos JE. Period of dominance of the ovulatory follicle influences embryo quality in lactating dairy cows. *Reproduction* 2009;137: 813-23.

- [27] Santos JE, Narciso CD, Rivera F, Thatcher WW, Chebel RC. Effect of reducing the period of follicle dominance in a timed artificial insemination protocol on reproduction of dairy cows. *J Dairy Sci* 2010;93: 2976-88.
- [28] Wiltbank M, Souza A, Giordano J, Nascimento A, Vasconcelos J, Pereira M, Fricke P, Surjus R, Zinsly F, Carvalho P. Positive and negative effects of progesterone during timed AI protocols in lactating dairy cattle. *Anim Reprod* 2012;9: 231-41.
- [29] Mann GE, Fray MD, Lamming GE. Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon-tau production in the cow. *Vet J* 2006;171: 500-3.
- [30] Al-Katanani YM, Drost M, Monson RL, Rutledge JJ, Krininger CE, 3rd, Block J, Thatcher WW, Hanse PJ. Pregnancy rates following timed embryo transfer with fresh or vitrified in vitro produced embryos in lactating dairy cows under heat stress conditions. *Theriogenology* 2002;58: 171-82.
- [31] Drost M, Ambrose JD, Thatcher MJ, Cantrell CK, Wolfsdorf KE, Hasler JF, Thatcher WW. Conception rates after artificial insemination or embryo transfer in lactating dairy cows during summer in Florida. *Theriogenology* 1999;52: 1161-7.
- [32] Demetrio DG, Santos RM, Demetrio CG, Vasconcelos JL. Factors affecting conception rates following artificial insemination or embryo transfer in lactating Holstein cows. *J Dairy Sci* 2007;90: 5073-82.
- [33] Pereira MH, Sanches CP, Guida TG, Rodrigues AD, Aragon FL, Veras MB, Borges PT, Wiltbank MC, Vasconcelos JL. Timing of prostaglandin F2alpha treatment in an estrogen-based protocol for timed artificial insemination or timed embryo transfer in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2013;96: 2837-46.
- [34] Vasconcelos JL, Sa Filho OG, Justolin PL, Morelli P, Aragon FL, Veras MB, Soriano S. Effects of postbreeding gonadotropin treatments on conception rates of lactating dairy cows subjected to timed artificial insemination or embryo transfer in a tropical environment. *J Dairy Sci* 2011;94: 223-34.
- [35] Vasconcelos JL, Jardina DT, Sa Filho OG, Aragon FL, Veras MB. Comparison of progesterone-based protocols with gonadotropin-releasing hormone or estradiol benzoate for timed artificial insemination or embryo transfer in lactating dairy cows. *Theriogenology* 2011;75: 1153-60.
- [36] Vasconcelos JL, Demetrio DG, Santos RM, Chiari JR, Rodrigues CA, Sa Filho OG. Factors potentially affecting fertility of lactating dairy cow recipients. *Theriogenology* 2006;65: 192-200.
- [37] Gong JG, Baxter G, Bramley TA, Webb R. Enhancement of ovarian follicle development in heifers by treatment with recombinant bovine somatotrophin: a dose-response study. *J Reprod Fertil* 1997;110: 91-7.
- [38] Gong JG, Bramley T, Webb R. The effect of recombinant bovine somatotrophin on ovarian function in heifers: follicular populations and peripheral hormones. *Biol Reprod* 1991;45: 941-9.

- [39] Gong JG, Bramley TA, Webb R. The effect of recombinant bovine somatotrophin on ovarian follicular growth and development in heifers. *J Reprod Fertil* 1993;97: 247-54.
- [40] Kirby CJ, Smith MF, Keisler DH, Lucy MC. Follicular function in lactating dairy cows treated with sustained-release bovine somatotropin. *J Dairy Sci* 1997;80: 273-85.
- [41] De la Sota RL, Lucy MC, Staples CR, Thatcher WW. Effects of recombinant bovine somatotropin (sometribove) on ovarian function in lactating and nonlactating dairy cows. *J Dairy Sci* 1993;76: 1002-13.
- [42] Izadyar F, Van Tol HT, Hage WG, Bevers MM. Preimplantation bovine embryos express mRNA of growth hormone receptor and respond to growth hormone addition during in vitro development. *Mol Reprod Dev* 2000;57: 247-55.
- [43] Buratini Jr J. Controle endócrino e local da foliculogênese em bovinos. *Rev Bras Reprod Anim* 2007;31: 190-96.
- [44] Fortune JE, Rivera GM, Yang MY. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Anim Reprod Sci* 2004;82-83: 109-26.
- [45] Spicer LJ, Aad PY. Insulin-like growth factor (IGF) 2 stimulates steroidogenesis and mitosis of bovine granulosa cells through the IGF1 receptor: role of follicle-stimulating hormone and IGF2 receptor. *Biol Reprod* 2007;77: 18-27.
- [46] Webb R, Garnsworthy PC, Campbell BK, Hunter MG. Intra-ovarian regulation of follicular development and oocyte competence in farm animals. *Theriogenology* 2007;68 Suppl 1: S22-9.
- [47] Chi MM, Schlein AL, Moley KH. High insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and insulin concentrations trigger apoptosis in the mouse blastocyst via down-regulation of the IGF-1 receptor. *Endocrinology* 2000;141: 4784-92.
- [48] Pinto AB, Schlein AL, Moley KH. Preimplantation exposure to high insulin-like growth factor I concentrations results in increased resorption rates in vivo. *Hum Reprod* 2002;17: 457-62.
- [49] Balen AH, Tan SL, MacDougall J, Jacobs HS. Miscarriage rates following in-vitro fertilization are increased in women with polycystic ovaries and reduced by pituitary desensitization with buserelin. *Hum Reprod* 1993;8: 959-64.
- [50] Adamiak SJ, Mackie K, Watt RG, Webb R, Sinclair KD. Impact of nutrition on oocyte quality: cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle. *Biol Reprod* 2005;73: 918-26.
- [51] Armstrong DG, McEvoy TG, Baxter G, Robinson JJ, Hogg CO, Woad KJ, Webb R, Sinclair KD. Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production in vitro: associations with the ovarian insulin-like growth factor system. *Biol Reprod* 2001;64: 1624-32.

- [52] Webb R, Garnsworthy PC, Gong JG, Armstrong DG. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. *J Anim Sci* 2004;82 E-Suppl: E63-74.
- [53] Bonilla AQ, Oliveira LJ, Ozawa M, Newsom EM, Lucy MC, Hansen PJ. Developmental changes in thermoprotective actions of insulin-like growth factor-1 on the preimplantation bovine embryo. *Mol Cell Endocrinol* 2011;332: 170-9.
- [54] Etherton TD, Bauman DE. Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. *Physiol Rev* 1998;78: 745-61.
- [55] Gong JG. Influence of metabolic hormones and nutrition on ovarian follicle development in cattle: practical implications. *Domest Anim Endocrinol* 2002;23: 229-41.
- [56] Spicer LJ, Chamberlain CS, Maciel SM. Influence of gonadotropins on insulin- and insulin-like growth factor-I (IGF-I)-induced steroid production by bovine granulosa cells. *Domest Anim Endocrinol* 2002;22: 237-54.
- [57] Armstrong DG, Gong JG, Gardner JO, Baxter G, Hogg CO, Webb R. Steroidogenesis in bovine granulosa cells: the effect of short-term changes in dietary intake. *Reproduction* 2002;123: 371-8.
- [58] Echternkamp SE, Aad PY, Eborn DR, Spicer LJ. Increased abundance of aromatase and follicle stimulating hormone receptor mRNA and decreased insulin-like growth factor-2 receptor mRNA in small ovarian follicles of cattle selected for twin births. *J Anim Sci* 2012;90: 2193-200.
- [59] Sanchez F, Smitz J. Molecular control of oogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2012;1822: 1896-912.
- [60] Spicer LJ. Effects of estradiol on bovine thecal cell function in vitro: dependence on insulin and gonadotropins. *J Dairy Sci* 2005;88: 2412-21.
- [61] Spicer LJ, Echternkamp SE. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. *Domest Anim Endocrinol* 1995;12: 223-45.
- [62] Pereira MH, Rodrigues AD, De Carvalho RJ, Wiltbank MC, Vasconcelos JL. Increasing length of an estradiol and progesterone timed artificial insemination protocol decreases pregnancy losses in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2014;97: 1454-64.
- [63] Pereira MH, Rodrigues AD, Martins T, Oliveira WV, Silveira PS, Wiltbank MC, Vasconcelos JL. Timed artificial insemination programs during the summer in lactating dairy cows: comparison of the 5-d Cosynch protocol with an estrogen/progesterone-based protocol. *J Dairy Sci* 2013;96: 6904-14.
- [64] Kirby CJ, Thatcher WW, Collier RJ, Simmen FA, Lucy MC. Effects of growth hormone and pregnancy on expression of growth hormone receptor, insulin-like growth factor-I, and insulin-like growth factor binding protein-2 and -3 genes in bovine uterus, ovary, and oviduct. *Biol Reprod* 1996;55: 996-1002.

- [65] Lucy MC, Collier RJ, Kitchell ML, Dibner JJ, Hauser SD, Krivi GG. Immunohistochemical and nucleic acid analysis of somatotropin receptor populations in the bovine ovary. *Biol Reprod* 1993;48: 1219-27.
- [66] Pershing RA, Lucy MC, Thatcher WW, Badinga L. Effects of BST on oviductal and uterine genes encoding components of the IGF system in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2002;85: 3260-7.
- [67] Badinga L, Guzeloglu A, Thatcher WW. Bovine somatotropin attenuates phorbol ester-induced prostaglandin F2alpha production in bovine endometrial cells. *J Dairy Sci* 2002;85: 537-43.
- [68] Balaguer SA, Pershing RA, Rodriguez-Sallaberry C, Thatcher WW, Badinga L. Effects of bovine somatotropin on uterine genes related to the prostaglandin cascade in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2005;88: 543-52.
- [69] Ealy AD, Drost M, Hansen PJ. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. *J Dairy Sci* 1993;76: 2899-905.
- [70] Edwards JL, Hansen PJ. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. *Mol Reprod Dev* 1997;46: 138-45.
- [71] Sakatani M, Bonilla L, Dobbs KB, Block J, Ozawa M, Shanker S, Yao J, Hansen PJ. Changes in the transcriptome of morula-stage bovine embryos caused by heat shock: relationship to developmental acquisition of thermotolerance. *Reprod Biol Endocrinol* 2013;11: 3.
- [72] Paula-Lopes FF, Hansen PJ. Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. *Biol Reprod* 2002;66: 1169-77.
- [73] Paula-Lopes FF, Hansen PJ. Apoptosis is an adaptive response in bovine preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;295: 37-42.
- [74] Santos JE, Juchem SO, Cerri RL, Galvao KN, Chebel RC, Thatcher WW, Dei CS, Bilby CR. Effect of bST and reproductive management on reproductive performance of Holstein dairy cows. *J Dairy Sci* 2004;87: 868-81.

CAPÍTULO 3

CONSIDERAÇÕES GERAIS E IMPLICAÇÕES

O presente estudo mostrou que a utilização de dose reduzida de bST (0,8mL - SC -333mg), associado a protocolo de superovulação permite aumentar o numero de embriões viáveis e a manutenção da gestação.

Estes dois fatores em conjunto aumenta o numero de receptoras gestantes por doadora superovulada, o que permite diminuir o custo por gestação. Doadoras nos grupos CONT, bST/IA e bST/InIA produziram média de 3,4, 6,0 e 4,7 embriões viáveis respectivamente, e a taxa de prenhez por TE nos respectivos grupos foi de 25,6%, 30% e 28,6%, resultando em 0,87; 1,80 e 1,34 receptoras prenhas por doadora superovulada nos grupos CONT, bST/IA e bST/InIA.

Além disso, o tratamento com bST em doadoras aumentou a manutenção da gestação dos embriões em estágio de blastocistos, portanto o aperfeiçoamento de protocolos de superovulação, visando aumentar a proporção de blastocistos recuperados por doadora pode ser uma estratégia interessante para aumentar a eficiência na TE.