Anais da XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões

Gramado, RS, Brasil

20 a 23 de Agosto de 2015

Palavra do Presidente

Prezados Colegas,

Tenho o prazer de apresentar os Anais da 29° Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE). Espero que aproveitem a reunião e a oportunidade de atualizar seus conhecimentos científicos, rever amigos e fazer novos contatos. Uma novidade para este ano, graças ao esforço do diretor científico, Dr. Roberto Sartori, é que os Anais passam a ser uma publicação em conjunto com a Sociedade Europeia de Transferência de Embriões (AETE), cuja reunião anual se realizará em setembro/2015. A importância deste feito se dá pela multiplicação do alcance dos trabalhos nacionais, fator essencial para a difusão do conhecimento científico de ponta produzido no Brasil. Além disso, a colaboração entre AETE e SBTE será reforçada, compartilhando de forma mais efetiva conhecimento e experiência, sem deixar de mencionar a maior visibilidade que ganhará a revista brasileira Animal Reproduction onde os anais são publicados. Agradeço ao editor e a equipe da revista Animal Reproduction pelo apoio e pelo excelente trabalho realizado. Semelhante aos anos anteriores, o evento foi planejado e organizado considerando o interesse de técnicos de campo, pesquisdores e acadêmicos. O diretor científico da SBTE, juntamente com a comissão cientifica, reuniu diversos tópicos e palestrantes que com certeza estimularão novas idéias e discussões. Além das plenárias tradicionais, o programa inclui módulos temáticos separados em "SBTE Ciência " e "SBTE Tecnologia". Mesas-redondas para discutir assuntos relevantes também fazem parte da programação, juntamente com a premiação de estudantes e profissionais. Mais de 250 resumos foram submetidos e aprovados, os quais serão apresentados na sessão de poster acompanhados de um bom vinho da Serra Gaúcha. A realização desta reunião,assim como das anteriores, depende totalmente do apoio financeiro das empresas do condomínio assim como das agências de fomento - CNPq and CAPES, aos quais sou profundamente agradecida. Gostaria também de agradecer a todos os palestrantes, que aceitaram o convite para participar e compartilhar conosco seus conhecimentos. Meu especial agradecimento aos diretores e colaboradores da SBTE, equipe maravilhosa, sem a qual essa reunião não teria se tornado realidade.

Esperamos vocês em Gramado.

Margot Alves Nunes Dode
Presidente
(2014-2015)

Palavra do Diretor Científico

Saudações e boas-vindas à 29ª Reunião Anual da SBTE! O Comitê Científico está muito feliz em dar continuidade aos trabalhos do ano passado. Por isso, mantivemos a maior parte da estrutura do programa para este ano. Convidamos renomados palestrantes do Brasil e do mundo e os incentivamos a apresentar seus dados mais recentes no campo da tecnologia de embriões. A novidade para este ano são as mesas redondas em temas atuais e controversos, em que vários palestrantes farão uma apresentação curta e haverá, desta forma, mais tempo para debate. Vamos incentivar o público a participar e se envolver mais nos debates. A cerimônia de abertura terá a palestra tradicional do Presidente IETS, além de uma palestra muito interessante sobre Gametas derivados de células-tronco embrionárias. O programa principal terá três sessões plenárias e seis sessões paralelas: Espermatozoide, Ovócito e Embrião ("SBTE Ciência"), e Produção embrionária, Desenvolvimento e Criopreservação de Embriões, e Saúde ("SBTE Tecnologia"). Para as sessões plenárias, palestrantes renomados foram cuidadosamente escolhidos para trazer conteúdos de interesse geral para a Sociedade. Nas demais sessões, os participantes irão escolher entre sessões simultâneas, sendo uma focada em aspectos mais básicos ("SBTE Ciência") e outra enfatizando os aspectos mais aplicados ("SBTE Tecnologia"). Ênfase especial deve ser direcionada aos Workshops. Teremos cinco Workshops, com novidades. 1. Inseminação Artificial (com foco em bovinos de corte, este ano); 2. GIFT: Melhoramento genômico de características reprodutivas (mostrando uma visão geral do Consórcio GIFT - Brasil e Dinamarca); 3. O III Simpósio do Consórcio de Pesquisa Sul Americano em Clonagem e Transgênese em Ruminantes; 4. O Workshop de Produção *in vitro* de embriões, que irá discutir vários temas, incluindo questões de sanidade, sêmen sexado, e sobre o mercado internacional para importação/exportação de embriões; e 5. O Workshop de Andrologia e Tecnologia do Sêmen. A SBTE quer agradecer a todos os membros que enviaram o seu melhor trabalho a ser apresentado nesta reunião. Para a sessão de pôster, todas as apresentações serão simultâneas, entretanto, com uma duração maior, para que os congressistas possam discutir com mais calma os assuntos de maior interesse. Finalmente, a SBTE agradece aos palestrantes, que se empenharam muito na preparação dos excelentes manuscritos e palestras para o encontro desse ano. Também quero agradecer à toda a equipe da SBTE e especialmente, ao Comitê Científico e todos os revisores que trabalharam incansavelmente e com muito entusiasmo. Esta lista inclui todas as pessoas da Diretoria da SBTE, os coordenadores das sessões de resumos, os revisores de resumos, os revisores dos trabalhos científicos, os editores científicos e todo o pessoal de apoio. Neste grupo, especial lembrança aos colegas que auxiliaram nas versões para a língua portuguesa dos artigos de revisão. Mais uma vez, agradecemos de forma muito especial aos editores e funcionários da revista Animal Reproduction, que, sob a estrutura do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, apoiou tremendamente a SBTE na elaboração dos anais desse ano. Nesse sentido, gostaria de destacar a maior novidade do ano, que é a co-publicação na revista Animal Reproduction dos nossos Anais simultaneamente aos Anais da 31ª Reunião Anual da Sociedade Europeia de Transferência de Embrião (AETE). Esperamos que você, leitor, ache esse volume informativo e útil. Vemo-nos em Gramado!

Roberto Sartori, PhD
Diretor Científico da SBTE
(2014-2015)

Diretoria da SBTE (2014-2015)
Margot Alves Nunes Dode (Presidente)
José Buratini Junior (Vice-presidente)
Regivaldo Vieira de Sousa (1º Secretário)
Bianca Damiani Marques Silva (2ª Secretária)
Alexandre Rossetto Garcia (1° Tesoureiro)
Maurício Machaim Franco (2° Tesoureiro)
Marcelo Fábio Gouveia Nogueira (Diretor de comunicação)
Maurício Peixer (Diretor de negócios)
José de Oliveira Carvalho (Especialista em informação e tecnologia)
Osnir Yoshime Watanabe (Industry Liaison)
Carlos Alberto Zanenga (Veterinary Practitioners Representative)
Roberto Sartori (Scientific Committee Chair)

Editor Chefe
Roberto Sartori Filho

Coordenadores dos Workshop
Alexandre Rosseto Garcia
José Luiz Moraes Vasconcelos
Luiz Sérgio de Almeida Camargo
Marcelo Bertolini
Marcelo Fábio Gouveia Nogueira
Maurício PeixerRubens Paes de Arruda
Yeda Watanabe

Revisores de Artigos

Alexandre Henryli de Souza
Alexandre Rosseto Garcia
Fernanda da Cruz Landin
Gerson Barreto Mourão
Henderson Ayres
Jo Leroy
João Henrique Moreira Viana
José Buratini Junior
José Eduardo Portela Santos
José Luiz Moraes Vasconcelos
Lawrence Smith
Luiz Sérgio de Almeida Camargo
Marcelo Marcondes Seneda
Margot Alves Nunes Dode
Mário Binelli
Maurício Machaim Franco
Milo Wiltbank
Reuben J. Mapletoft
Roberto Sartori
Rubens Paes de Arruda
Urban Besenfelder
William W. Thatcher

Coordenadores de Avaliação de Resumos
Alexandre Henryli de Souza
Eneiva Carla Carvalho Celeghini
Felipe Perecin
Fernanda da Cruz Landim
Jo Leroy
José Buratini Junior
Manoel Francisco de Sá Filho
Marcelo Marcondes Seneda
Paula de Carvalho Papa
Urban Besenfelder

Revisores de Resumos

Alberto Lopes Gusmão
Alex Sander Dias Machado
Alexandre Henryli de Souza
Alicio Martins Junior
Ana Augusta Pagnano Derussi
André Furugen Cesar De Andrade
Anthony Cesar Souza Castilho
Antônio Chaves de Assis Neto
Bernardo Gasperin
Carlos Antônio Carvalho Fernandes
Carlos Eduardo Bezerra de Moura
Cezinande Meira
Claudia Lima Verde Leal
Claudia Maria Bertan Membrive
Daniel LeBourghis
Danila Barreiro Campos
Dimitrios Rizos
Emiliana de Oliveria Santana Batista
Eneiva Carla Carvalho Celeghini
Ester Caixeta
Eunice Oba
Fabiana Bressan
Fabíola Freitas Paula Lopes
Felipe Perecin
Fernanda Landin Alvarenga
Fernando Silveira Mesquita
Flávia Lombardi Lopes
Frank Becker
Gabriel Bó
Gisele Zoccal Mingoti
Guilherme de Paula Nogueira
Guilherme Pugliesi
Henderson Ayres
Ian Kippax
Inês Cristina Giometti
Jeferson Ferreira da Fonseca
Jo Leroy
José Buratini Junior
José Luiz Moraes Vasconcelos
José Nélio S. Sales
José Roberto Viana Silva
João Carlos Pinheiro Ferreira
João Henrique Moreira Viana
Juliana Corrêa Borges Silva
Juliano Coelho da Silveira
Juliano Rodrigues Sangalli
Klibs N. Galvão
Lais Mendes Vieira
Letícia Zoccolaro Oliveira
Lia de Alencar Coelho
Lindsay Unno Gimenes
Liza Margareth Medeiros de Carvalho Sousa
Luciana Alves de Fátima
Luciana Simões Rafagnin Marinho
Luciano Andrade Silva
Luiz Sérgio Almeida Camargo
Maite Del Collado Barrondo
Manoel Francisco de Sá Filho
Mara Iolanda Batistella Rubin
Marcella Pecora Milazzotto
Marcelo Demarchi Goissis
Marcelo Fábio Gouveia Nogueira
Marcelo Marcondes Seneda
Marcílio Nichi
Maria Clara Caldas Bussiere
Maria Helena de Matos
Mariana Marques Groke
Mário Binelli
Marja Mikkola
Mateus José Sudano
Mayra Elena Ortiz D`Avila Assumpção
Monique Mendes Guardieiro
Moysés dos Santos Miranda
Naiara Zoccal Saraiva
Nelcio Antonio Tonizza de Carvalho
Nereu Carlos Prestes
Paula de Carvalho Papa
Peter Vos
Rafael Augusto Satrapa
Rafael Bisinotto
Rafael Vilar Sampaio
Rainer Saner
Renata Simões
Reno Roldi de Araújo
Ricarda Maria dos Santos
Roberta Machado Ferreira
Roberto Sartori
Rodrigo Freitas Bittencourt
Rogério Ferreira
Ronaldo Luis Aoki Cerri
Rui Machado
Serge Lacaze
Tatiane Almeida Drummond Tetzner
Thales Ricardo Rigo Barreiros
Ticiano Guimarães Leite
Urban Besenfelder
Valério Marques Portela
Vilceu Bordignon

Equipe

Alexandre Barbieri Prata
Ana Luiza Silva Guimarães
Anaclady Aguiar
Andrielle Thainar Mendes Cunha
Camila Spies
Jéssica Nora Drum
José de Oliveira Carvalho
José Felipe Warmiling Sprícigo
Ligiane Oliveira Leme
Louise Helen de Oliveira
Pedro Leopoldo Jerônimo Monteiro Jr.

Apoio Financeiro

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa do Nível Superior (CAPES)
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Conteúdo

ARTIGOS CONFERÊNCIA PRINCIPAL

Citometria de fluxo multiparamétrica: uma ferramenta relevante para a avaliação da função espermática
F.J. Peña 28

Status da produção de embriões no mundo
P. Blondin 33

Novos aspectos da fisiologia espermática e interações entre espermatozoides e oócitos
F.J. Peña 36

Espionando uma conversa privada entre a tuba uterina e gametas/embriões
C. Almiñana 43

Produção *in vivo* e *in vitro* de embrião bovino. Atualizações sobre estratégias de produção de embriões
P.S. Baruselli, L.M. Vieira, E.O.S. Batista, R.M. Ferreira, J.N.S. Sales, L.U. Gimenes, J.R.S. Torres-Junior, C.M. Martins, M.F. Sá Filho, G.A. Bó 52

Produção *in vivo* e *in vitro* de embriões em doadoras bovinas superestimuladas com FSH por 7 dias
R.J. Mapletoft, A. García Guerra, F.C.F. Dias, J. Singh, G.P. Adams 61

Seleção genômica de embriões produzidos *in vitro* e por transferência nuclear de células somáticas para a aceleração do melhoramento genético na produção bovina
H.N. Kadarmideen, G. Mazzoni, Y.F. Watanabe, L. Strøbech, P.S. Baruselli, F.V. Meirelles, H. Callesen, P. Hyttel, J.B.S. Ferraz, M.F.G. Nogueira 67

Competência no desenvolvimento oócitário e qualidade embrionária: melhorias e novas perspectivas
I. Gilbert, A. Macaulay, C. Robert 76

Metabolismo do oócito e do embrião pré-implantação
M.L. Sutton-McDowall, J.G. Thompson 88

Quais os avanços na criopreservação de embriões?
C. Almiñana, C. Cuello 99

Programação fetal durante o período pré-implantacional: podemos explorar este evento para melhorar a função pós-natal em bovinos?
P.J. Hansen 110

Metaboloepigenética: fornecendo hipóteses alternativas para a regulação da expressão gênica em embriões iniciais
H.M. Brown, T.C.Y. Tan, J.G. Thompson 119

Desafios da pesquisa envolvendo interações embrião-patógenos
J.A. Gard 126

O triângulo epidemiológico infeccioso das doenças uterinas de bovinos
V.S. Machado, R.C. Bicalho 133

Produção in vitro de embriões bovinos: Reconsiderando o desenvolvimento oócitário e a aplicação da biologia de sistemas
L. Stroebech, G. Mazzoni, H.S. Pedersen, K.K. Freude, H.N. Kadarmideen, H. Callesen, P. Hyttel 148

Estado da arte da IATF com protocolos a base de GnRH em bovinos de corte
M.L. Day 157

O número de folículos antrais é um bom critério de seleção para a fertilidade em bovinos?
F. Morotti, T.R.R. Barreiros, F.Z. Machado, S.M. González, L.S.R. Marinho, M.M. Seneda 164

AMH e fertilidade em bovinos
Correlação entre população follicular, concentração de AMH e fertilidade em bovinos
P.S. Baruselli, E.O.S. Batista, L.M. Vieira, A.H. Souza 173

RESUMOS

Fisiologia da Reprodução do Macho e Tecnologia do Sêmen (Resumos SBTE 001 a SBTE 024)		
SBTE 001	**Alterações morfológicas das células espermáticas de garanhões da raça nordestina após descongelamento** Maria Alice Maranhão Santos; Adriana Gradela; Elenice Andrade Moraes	187
SBTE 002	**Avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal e do potencial mitocondrial de espermatozoides bovinos criopreservados com ou sem a presença do plasma seminal** Suzane Peres Campanholi; Fabio Morato Monteiro; Claudia Cristina Paz; Erika Aline Ribeiro Dias; José Antonio Junior Dell`Aqua; Frederico Ozanam Papa; Camila Paula Freitas-Dell`Aqua; Guilherme Fazan Rossi	188
SBTE 003	**Avaliação de sistemas de refrigeração na cinética espermática e integridade de membrana plasmática e acrossomal de sêmen bovino** Erika Aline Ribeiro Dias; Fabio Morato Monteiro; Suzane Peres Campanholi; Guilherme Fazan Rossi; Mariana Furtado Zorzetto; Frederico Ozanam Papa; José Antonio Junior Dell`Aqua; Maria Eugenia Zerlotti Mercadante	189
SBTE 004	**Avaliação termográfica escrotal e qualidade seminal de touros bubalinos *(Bubalus bubalis)* mantidos em ambiente tropical úmido** Daniel Vale Barros; Lílian Ximenes Silva; Priscila Reis Kahwage; Aluízio Otávio Silva; André Guimarães Silva; Irving Montanar Franco; Lucieta Guerreiro Martorano[2]; José De Brito Lourenço Junior; Narian Romanello; Alexandre Rossetto Garcia[3]	190
SBTE 005	**Capacidade de termólise testicular de ovinos morada nova submetidos a teste de termotolerância ao calor: resultados preliminares** Priscila Reis Kahwage; Sergio N. Esteves[2]; Manoel A.C Jacinto; Rui Machado; Messy Hannear De Andrade Pantoja; Narian Romanello; Leticia F. Passeri; Caio A Volante; Kaue Mahlmeister; Alexandre Rossetto Garcia	191
SBTE 006	**Cellrox deep red® é eficiente para detecção de estresse oxidativo em espermatozoide bovino: estudos preliminares** Maíra Rodrigues Bianchi-Alves; Sâmara Cristine Costa Pinto; Diego Santos Almeida; Rubens Paes De Arruda; Andre Furugen Cesar De Andrade; Eneiva Carla Carvalho Celeghini	192
SBTE 007	**Centrifugação em camada única melhora motilidade espermática de garanhões após refrigeração a 15ºC** Márcio Menezes Nunes; Fernanda Carlini Cunha Santos; Amauri Anselmo; José Domingos Guimaraes	193
SBTE 008	**Comparação da perfusão sanguínea da artéria testicular, dosagem hormonal e qualidade espermática entre carneiros da raça texel e santa inês** Yamê Fabres Robaina Sancler-Silva; Lorenzo Garrido Segabinazzi; Rubia Alves Schimith; Carlos Ramires Neto; Gabriela Mothe; Luis Fernando Mercês Chaves Silva; Endrigo Adonis Braga De Araujo; Sidnei Nunes De Oliveira; Frederico Ozanam Papa; Eunice Oba	194
SBTE 009	**Diferentes desafios espermáticos *in vitro* e sua relação com a fertilidade *in vivo* do sêmen bovino** Leticia Zoccolaro Oliveira; Lucas Bernardes Ribeiro; Fabio Morato Monteiro; Erika Aline Ribeiro Dias; Suzane Peres Campanholi; José Mario Pozetti Filho; Marcelo Zoccolaro Costa; Carla Braga Martins; Clara Slade Oliveira; Halim Atique Netto	195
SBTE 010	**Efeito da criopreservação na viabilidade e longevidade de espermatozoides do epidídimo de touros expostos ou não ao plasma seminal** Andrielle Mendes Cunha; José Oliveira Carvalho; Margot Alves Nunes Dode	196
SBTE 011	**Efeito da criopreservação sobre a motilidade espermática de garanhões da raça nordestina** Elenice Andrade Moraes; Maria Alice Maranhão Santos; Adriana Gradela	197
SBTE 012	**Efeito do choque térmico sobre a motilidade e o citoesqueleto de espermatozoides de bovinos** Bárbara Do Do Carmo Simões Da Silva; Daniela Franco Da Silva; Thaís Alves Rodrigues; Fabiola Freitas De Paula Lopes	198
SBTE 013	**Efeitos da concentração de testosterona plasmática e de proteína total do plasma seminal sobre os parâmetros espermáticos de touros doadores de sêmen da raça nelore** Renata Barbosa Faria; Renata Sanches Calegari; Fernanda Nunes Marqui; Diego Gouvêa Souza; Tairini Erica Cruz; Alício Martins Jr	199

SBTE 014	**Eficácia da água destilada para o teste hiposmótico em sêmen congelado de ovino** Walkíria M Barreto; Rodrigo Freitas Bittencourt; Mariana Santos Ribeiro De Barros; Edivânia Oliveira De Jesus; Antonio De Lisboa Ribeiro Filho; Marcos Chalhoub; Fernando De Lima Cardoso; Jéssica De Jesus Pinheiro; Tiago Oliveira Brandão; Alair Daiana Da Paixão Sampaio	200
SBTE 015	**Estimativa da capacidade fecundante de espermatozoides de catetos (*Pecari tajacu*) por análise de interação com oócitos suínos** Lívia Batista Campos; Ana Liza Paz Souza; Alexsandra Fernandes Pereira; Alexandre Rodrigues Silva	201
SBTE 016	**Estudo comparativo da qualidade seminal em cães de companhia e trabalho da raça australian cattle dog** Pamela Cristina Batista Gomes; Graziela Martins De Souza Luciano; Joice Caroliny Candeias; Julio Cesar Carvalho Balieiro; Priscila Carvalho De Oliveira	202
SBTE 017	**Importância da avaliação morfológica e funcional do sêmen de búfalos para o sucesso de programas de iatf** Giulia Kiyomi Vechiato Kawai; João Diego De Agostini Losano; Andressa Dalmazzo; Diego Cavalcante De Souza; Bruno Moura Monteiro; Nelcio Antonio Tonizza De Carvalho; Pietro Sampaio Baruselli; Marcilio Nichi	203
SBTE 018	**Influência de diferentes métodos de seleção de espermatozoides ovinos congelados sobre a capacitação e vitalidade espermática após incubação** Carolina Cerqueira Sarmento Olivares; Joanna Maria Gonçalves De Souza Fabjan; Anna Beatriz Veltri Peneiras; Mário Felipe Alvarez Balaro; Vicente José De Figueirêdo Freitas; Jeferson Ferreira Da Fonseca; Felipe Zandonadi Brandao	204
SBTE 019	**Influência do sêmen bovino congelado com ou sem a presença do plasma seminal na produção *in vitro* de embriões bovinos** Fabio Morato Monteiro; Claudia Cristina Paz; José Antonio Junior Dell`Aqua; Frederico Ozanam Papa; Camila Paula Freitas-Dell`Aqua; Erika Aline Ribeiro Dias; Suzane Peres Campanholi; Guilherme Fazan Rossi; Roberta Vantini; Joaquim Mansano Garcia	205
SBTE 020	**Inseminação cervical profunda por cateterização da cérvix em ovelhas leiteiras** Renata Casali; Larissa G. Silva; Maicon Lorena Gaissler Pinto; Fabricio D. Mozzaquatro; Alceu Mezzalira	206
SBTE 021	**Modelo de estresse térmico *in vitro* para espermatozoides *Bos taurus taurus*** Daniela Franco Da Silva; Juliana Vieira Lopes; Thaís Alves Rodrigues; Cássia Maria Barroso Orlandi; Fabiola Freitas De Paula Lopes	207
SBTE 022	**O uso de uma solução de amortecimento durante a seleção espermática *in vitro* reduz o estresse oxidativo** Cecília Isabel Inês Urquiza Falcão Machado; Daniele Missio; Natália Picoli Folchini; Karine De Mattos; Francielli Weber Santos; Fábio Gallas Leivas; Daniela Dos Santos Brum	208
SBTE 023	**Uso da melatonina e do ácido ferúlico como promotores da função do espermatozoide criopreservado equino** Renata Lançoni; Eneiva Carla Carvalho Celeghini; Maíra Rodrigues Bianchi-Alves; Gabriel De Carli Dos Santos; Shirley Andrea Florez-Rodriguez; Ticiano Guimarães Leite; Rubens Paes De Arruda	209
SBTE 024	**Vitrificação de sêmen epididimário de cabra montés *(Capra pyrenaica)*** Jorgea Pradieé; Emma O`Brien; Milagros Cristina Esteso; Cristina Castaño; Adolfo Toledano Diaz; Antonio Lopez Sebastian; Julian Santiago Moreno	210
Folliculogênese, Oogênese e Ovulação (Resumos SBTE 032 a SBTE 066)		
SBTE 032	**Associação da via de sinalização PI3K-AKT com competência de oócitos bovinos através de perfis de expressão de miRNA e avaliação da capacidade de desenvolvimento** Gabriella Mamede Andrade; Juliano Coelho Da Silveira; Marcelo Fabio Gouveia Nogueira; Flavio Vieira Meirelles; Felipe Perecin	211
SBTE 033	**Avaliação da produção de glicose e lactato pelas células lúteais caninas no início do diestro cíclico e gestacional** Ana Augusta Pagnano Derussi; Flavia Caroline Destro; Carlos Renato De Freitas Guatolini; Rodrigo Volpato; Gabriela Amorim Campos; Nathalia Celeita Rodriguez; Angie Lagos-Carvajal; Mateus José Sudano; Carla Regina Barbieri Simoes; Maria Denise Lopes	212

SBTE 034	**Avaliação do ciclo estral de ratas submetidas à atividade física e ao hormônio do crescimento** Francislaine Anelize Garcia Santos; Cesar Augusto Zanfolim Bariani; Gabriela Azenha Soriano; Paula De Carvalho Papa; Caliê Castilho; Ronaldo Sena E Silva; Ines Cristina Giometti	213
SBTE 035	**Avaliação ultrassonográfica da dinâmica ovariana em vacas da raça indubrasil submetidas a dois manejos nutricionais.** Paula De Oliveira Figueiredo; Guilherme Gostinhak Azambuja; Luana Custódio Barros; Carolina Gonzales Da Silva; Heidi Christina Bessler; Álvaro Moraes Da Fonseca Neto; Ivo Pivato; Carlos Frederico Martins	214
SBTE 036	**Caracterização do esgotamento da reserva ovariana de folículos em camundongos ames dwarf** Tatiana D. Saccon; Fabiana Moreira; Rafael Gianella Mondadori; Luis Augusto Cruz; Andrzej Bartke; Michal M. Masternak; Ligia Margareth Cantarelli Pegoraro; Augusto Schneider	215
SBTE 037	**Efeitos do chá verde na expressão gênica do VEGF no corpo lúteo de ratas** Ines Cristina Giometti; Caliê Castilho; Francislaine Anelize Garcia Santos; Luciana Machado Guaberto; Ana Paula Matoso Miskulin Cardoso; Paula De Carvalho Papa	216
SBTE 038	**Concentração de estradiol e expressão de mRNA para CYP19A1, PAPP-A e LHR em folículos dominantes e subordinados no momento do desvio folicular em vacas nelore** Jessica Nora Drum; Ricardo Da Silva Surjus; Pedro Leopoldo Jerônimo Monteiro Jr; Mariana Fernandes Machado; Anibal Ballarotti Nascimento; Jose Buratini; Milo Charles Wiltbank; Roberto Sartori	217
SBTE 039	**Conteúdo de vesículas extracelulares isoladas de folículos ovarianos bovinos: associação com a competência oocitária** Juliano Coelho Da Silveira; Gabriella Mamede Andrade; Thais Yuri Nakamura; Marcelo Fabio Gouveia Nogueira; Hélio A Martins-Junior; Roseneide C Simas; Aline S Cesar; Luiz Lehmann Coutinho; Felipe Perecin; Flavio Vieira Meirelles	218
SBTE 040	**Correlação entre fenótipo, genótipo e população folicular antral em novilhas *indicus-taurus*** Fabio Morotti; Gustavo Martins Gomes Santos; Celso Koetz Júnior; Katia Cristina Silva-Santos; Marcelo Marcondes Seneda	219
SBTE 041	**Distribuição regional de folículos ovarianos pré-antrais na espécie equina** Suellen Miguez Gonzalez; Camila Bizarro Da Silva; Andressa Guidugli Lindquist; Isabela Búfalo; Lívia Aires Lisboa; Marcelo Marcondes Seneda	220
SBTE 042	**Efeito da dieta na produção *in vivo* de embriões de vacas holandesas não-lactantes e não-gestantes** Camila Spies; Monique Mendes Guardieiro; Pedro Leopoldo Jerônimo Monteiro Jr; Louise Helen De Oliveira; Jessica Nora Drum; Leonardo De França E Melo; Cássio Airton Müller; Ueliton Alberto Viegas; Flávio Augusto Portela Santos; Roberto Sartori	221
SBTE 043	**Efeito das diferentes concentrações de EGF no cultivo *in vitro* de folículos ovarianos equinos** Andressa Guidugli Lindquist; Marilu Constantino Max; Isabela Búfalo; Camila Bizarro Da Silva; Suellen Miguez Gonzalez; Marcelo Marcondes Seneda; Roberta Gaberlini Gomes; Lívia Aires Lisboa	222
SBTE 044	**Efeito do aumento de insulina circulante sobre o desenvolvimento folicular em vacas holandesas** Louise Helen De Oliveira; Pedro Leopoldo Jerônimo Monteiro Jr; Camila Spies; Anibal Ballarotti Nascimento; Tony Carreira Bruinjé; Bruno Gonzales; Rafaella Miki Hayashi; Milo Charles Wiltbank; Roberto Sartori	223
SBTE 045	**Efeito do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) sobre a morfologia e o desenvolvimento de folículos pré-antrais ovinos cultivados *in situ*** Bruna Bortoloni Gouveia; Maria Éllida Sousa Bezerra; Alane Pains Oliveira Do Monte; Jamile Maiara Da Silva Santos; Ricássio De Sousa Barberino; Taís Jobard Silva Macedo; Vanuzia Gonçalves Menezes; Vanessa Raquel Pinto De Barros; Isabel Bezerra Lima-Verde; Maria Helena Tavares De Matos	224
SBTE 046	**Efeito do polimorfismo IGF1 SnaBI sobre parâmetros reprodutivos e metabolismo em vacas leiteiras** Pedro A S Silveira; Ligia Margareth Cantarelli Pegoraro; Walter R Butler; Marcio Nunes Correa; Augusto Schneider	225

SBTE 047	**Efeito do tipo de fixador e tempo de fixação na morfologia de folículos pré-antrais equinos** Isabela Búfalo; Andressa Guidugli Lindquist; Suellen Miguez Gonzalez; Camila Bizarro Da Silva; Marcelo Marcondes Seneda	226
SBTE 048	**Efeitos de uma dieta rica em gordura e energia sobre a expressão gênica ovariana em camundongos fêmeas jovens e velhas** Joao Alveiro Alvarado Rincón; Driele N. Garcia; Ligia Prietsc; Sandra C. Valle; Elizabete Helbig; Carlos C. Barros; Ligia Margareth Cantarelli Pegoraro; Augusto Schneider	227
SBTE 049	**Efeitos do fator de crescimento dos fibroblastos 8 sobre a progressão da meiose e expansão do cumulus em complexos cumulus-oócito bovinos submetidos à maturação *in vitro* com ampirregulina** Lorena Sanches; Ana Caroline Silva Soares; Rodrigo Garcia Barros; Paula Fernanda De Lima Christopher Price; Jose Buratini	228
SBTE 050	**Efeitos do hormônio folículo estimulante (FSH) e da ampirregulina (AREG) sobre a dinâmica da meiose de oócitos bovinos submetidos à maturação *in vitro*** Ana Caroline Silva Soares; Lorena Sanches; Rodrigo Garcia Barros; Paula Fernanda De Lima; Valentina Lodde; Alberto M. Luciano; Christopher Price; Jose Buratini	229
SBTE 051	**Expressão do receptor de LH em células do cumulus oophorus é modulada pelo diametro folicular e pelo estimulo das gonadrotrofinas** Ramon Cesar Botigelli; Mariana Fernandes Machado; Patrícia Kubo Fontes; Eduardo Montanari Razza; Elisa M Pioltine; Cláudia Lima Verde Leal; Ciro Moraes Barros; Marcelo Fabio Gouveia Nogueira	230
SBTE 052	**Expressão dos receptores de ativina durante a divergência folicular e luteólise em bovinos** Gustavo Freitas Ilha; Monique Tomazele Rovani; Vitor Braga Rissi; Mariana Priotto De Macedo; Fabrício Amadori Machado; Rogério Ferreira; Bernardo Garziera Gasperin; Vilceu Bordignon; Paulo Bayard Dias Gonçalves	231
SBTE 053	**Fator de crescimento epidermal (EGF) induz a proliferação celular durante o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais ovinos** Luciana Da Paz Dos Santos; Jamile Maiara Da Silva Santos; Vanuzia Gonçalves Menezes; Ricássio De Sousa Barberino; Bruna Bortoloni Gouveia; Agnes Yasmin Pitombeira Cavalcante; Thae Lanne Barbosa Gama Lins; Rodrigo José De Sousa Gonçalves; Juliana Jales De Hollanda Celestino; Maria Helena Tavares De Matos	232
SBTE 054	**Incremento da viabilidade de folículos pré-antrais de fêmeas *Bos indicus* cultivados *in vitro* pela adição do hormônio folículo estimulante (FSH)** Camila Bizarro Da Silva; Suellen Miguez Gonzalez; Maira Moreira Santos; Isabela Búfalo; Andressa Guidugli Lindquist; Lívia Aires Lisboa; Marcelo Marcondes Seneda	233
SBTE 055	**Injeção intrafolicular com agonista do pparγ na divergência folicular em vacas** Juliana Germano Ferst; Rogério Ferreira; Monique Tomazele Rovani; Andressa Minussi Pereira Dau; Bernardo Garziera Gasperin; Alfredo Quites Antoniazzi; Dimas Estrasulas Oliveira; Paulo Bayard Dias Gonçalves	234
SBTE 056	**Melatonina na maturação *in vitro* e seu efeito sobre a expressão de genes antioxidantes e relacionados à apoptose de complexos cumulus-oócito murinos** Hugo Fernandes; Fernanda Cavallari Castro; Katia Lancellotti Schwarz; Cláudia Lima Verde Leal	235
SBTE 057	**O fator de crescimento dos fibroblastos 10 (FGF10) e a proteína morfogenética óssea 15 (BMP15) inibem a apoptose nas células do cumulus de complexos cumulus-oócito bovinos submetidos à maturação *in vitro*** Rodrigo Garcia Barros; Debora Jardina Sartor; Paula Fernanda De Lima; Lorena Sanches; Ana Caroline Silva Soares; Camila Paula Freitas-Dell`Aqua; Fernanda Fagali Franchi, Fernanda Cruz Landim Alvarenga; Christopher Price; Jose Buratini	236
SBTE 058	**O receptor de quimiocinas CCR2 desempenha um papel crucial na ativação folicular e foliculogênese pré-antral e sua deficiência acarreta em redução da fecundidade** Paulo Henrique Almeida Campos Junior; Alana Géssica Amaral Santos; Remo Castro Russo; João Henrique Moreira Viana	237
SBTE 059	**O sistema NPPC/NPR2 descrito no modelo murino é aplicável para folículos antrais bovinos?** Elisa M Pioltine; Mariana Fernandes Machado; Juliano Coelho Da Silveira; Ramon Cesar Botigelli; Patrícia Kubo Fontes; Ana Elisa Valencise Quaglio; Cláudia Lima Verde Leal; Reneé Laufer Amorim; Luiz Claudio Di Stasi; Marcelo Fabio Gouveia Nogueira	238

SBTE 060	**Papel da via INOS/NO/GMPC na maturação *in vitro* de COCs bovinos cocultivados com hemisecções da parede folicular** Natália Ferreira Torres; Maria Clara Caldas-Bussiere; Karina Silva Nogueira; Diego Fernando Dubeibe; Carla Sobrinho Paes De Carvalho; Bruna Lomba Dias; Claudio Luiz Melo De Souza	239
SBTE 061	**Perfil proteico do fluido folicular durante a foliculogênese em éguas** Bianca Petrucci Rocha; Henrique De Araujo Bastos; Tamarini Rodrigues Arlas; Gabriel Oliveira Santos; Anita Mylius Pimentel; Sandra Fiala Rechsteiner; Maria Inês Mascarenhas Jobim; Ricardo Macedo Gregory; Rodrigo Costa Mattos	240
SBTE 062	**Perfusão sanguínea no folículo pré-ovulatório em vacas nelore submetidas a protocolos de IATF.** João Ricardo Scaliante; Mauricio Machaim Franco; Sarah De Andrade Dias Rodrigues[3]; Bianca Damiani Marques Silva	241
SBTE 063	**Regulação de membros da família TGFB na divergência e crescimento folicular final em bovinos.** Monique Tomazele Rovani; Gustavo Freitas Ilha; Cristina Sangoi Haas; Vitor Braga Rissi; Rogério Ferreira; Vilceu Bordignon; Paulo Bayard Dias Gonçalves; Bernardo Garziera Gasperin	242
SBTE 064	**Resveratrol mantém a sobrevivência e promove a proliferação celular em folículos pré-antrais ovinos cultivados *in situ*** Maria Éllida Sousa Bezerra; Agnes Yasmin Pitombeira Cavalcante; Alane Pains Oliveira Do Monte; Bruna Bortoloni Gouveia; Jamile Maiara Da Silva Santos; Ricássio De Sousa Barberino; Taís Jobard Silva Macedo; Vanuzia Gonçalves Menezes; Maria Helena Tavares De Matos	243
SBTE 065	**Suplementação de ômega-3 na dieta de leitoas pré-púberes aumenta os níveis de leptina e de seu receptor em oócitos de folículos pré-antrais** Cristina Sangoi Haas; Fabiana Moreira; Ivan Bianchi; Monike Dos Santos Quirino; Carlos Eduardo Ranquetat Ferreira; Bernardo Garziera Gasperin; Thomaz Lucia Jr	244
SBTE 066	**Validação de marcadores moleculares para competência ovocitária em células do cumulus bovinas** Nayara Ribeiro Kussano; Ligiane Oliveira Leme; Ana Luiza Silva Guimarães; Mauricio Machaim Franco; Margot Alves Nunes Dode	245
IATF, TETF e IA (Resumos SBTE 070 a SBTE 137)		
SBTE 070	**Segunga IATF após ressincronização precoce em nulíparas e multíparas nelore** Wendell Amaral Nantes De Oliveira; Moisés Maximo Rodrigues Junior; David Luis Andrea; Adnan Darin Pereira Rodrigues; Izaias Claro Junior; Jose Luiz Moraes Vasconcelos	246
SBTE 071	**A adição de GnRH e/ou PGF2α antecipada em protocolos para IATF a base de progestágeno e estradiol não altera a fertilidade de vacas leiteiras** Guilherme De Souza Floriano Machado De Vasconcellos; Lais Mendes Vieira; Bruna Martins Guerreiro; Bruno Gonzalez De Freitas; Cecilia Rodrigues Alves Silveira; Guilherme Nogueira Borges Filho; Felipe Souza Pires; Regis José De Carvalho; Pietro Sampaio Baruselli	247
SBTE 072	**A utilização do eCG em protocolos de IATF melhora as características foliculares e função luteal de vacas mestiças leiteiras gestantes e não gestantes?** Antonio De Lisboa Ribeiro Filho; Alessandro Bitencourt Nascimento; Aloisio Bitencourt Nascimento; Marcus Vinícius Galvão Loiola; Alexandra Soares Rodrigues; Priscila Assis Ferraz; João Batista Ribeiro Da Silva; Rodrigo Freitas Bittencourt; Alberto Lopes Gusmão; Marcos Chalhoub	248
SBTE 073	**Adição de uma segunda dose de prostaglandina f2α em protocolo de IATF aumenta a fertilidade de vacas leiteiras em anestro e sem hipertermia** Francisco Rebolo Lopes; Marcos Henrique Colombo Pereira; Anderson Kloster Munhoz; Jose Luiz Moraes Vasconcelos	249
SBTE 074	**Ajuste da dose de benzoato de estradiol no início do protocolo de ressincronização sem diagnóstico prévio de gestação em vacas de corte lactantes** Gilson Antonio Pessoa; Ana Paula Martini; Marcio Flores Cunha Chaiben; Lais Mendes Vieira; Renato Wihby Girotto; Guilherme Pugliesi; Thiago Santin; Mara Iolanda Batistella Rubin; Pietro Sampaio Baruselli; Manoel Francisco Sá Filho	250
SBTE 075	**Associação entre o ângulo de garupa, dificuldade de partos e fertilidade em vacas holandesas em lactação** Bruno Gonzales; Emiliana Oliveira Santana Batista; Pietro Sampaio Baruselli; Alexandre Henryli Souza	251

SBTE 076	**Atraso no momento da IATF em novilhas taurinas com ausência de cio após a retirada do dispositivo de progesterona** Verônica Flores Da Cunha Scheeren; Guilherme Machado Zanatta; Gilson Antonio Pessoa; Ana Paula Martini; Janislene Mach Trentin; Julia Brum Spreckelsen Casarin; Mariani Farias Fiorenza; Pietro Sampaio Baruselli; Manoel Francisco Sá Filho; Mara Iolanda Batistella Rubin	252
SBTE 077	**Avaliação do efeito da administração de diferentes eCG comerciais (crescimento folicular e concepção) e validação de sua necessidade em protocolos de IATF em vacas nelore paridas** Lucas De Araújo Souto; Talita Lara Conti; José Nélio De Sousa Sales; Pietro Sampaio Baruselli; Roberta Machado Ferreira	253
SBTE 078	**Comparação das taxas de concepção e perdas gestacionais em receptoras de embrião tratadas com lecirrelina 13 dias após a TETF – resultados preliminares** Thales Ricardo Rigo Barreiros; Douglas Gaitkoski; Luiz Fernando Garro Monteiro; Henrique Goulart Ribeiro De Mendonça; José Carlos Arevalo Junior; Bárbara Pedro Novelli; Crícia Alves Gutjahr; Anna Raquel Grimas Almeida; Wanessa Blaschi	254
SBTE 079	**Comparação das taxas de prenhez em vacas nelore solteiras ou paridas ressincronizadas com lecirrelina 13 dias após a TETF** Wanessa Blaschi; Douglas Gaitkoski; Luiz Fernando Garro Monteiro; Henrique Goulart Ribeiro De Mendonça; Anna Raquel Grimas Almeida; José Carlos Arevalo Junior; Bárbara Pedro Novelli; Crícia Alves Gutjahr; Thales Ricardo Rigo Barreiros	255
SBTE 080	**Comparação dos índices zootécnicos de novilhas nelore precoces ou não quando desafiadas para prenhez entre 12 e 16 meses de idade – resultados preliminares** Rogerio Fonseca Guimaraes Peres; Hugo Borges Graff; Adnan Darin Pereira Rodrigues; Ky Pohler; Jose Luiz Moraes Vasconcelos	256
SBTE 081	**Concentração circulante de AMH e sua relação com fertilidade em vacas em lactação e novilhas da raça holandesa e jersey** Paulo David Carvalho; Emiliana Oliveira Santana Batista; John Verstegen; Milo Charles Wiltbank; Pietro Sampaio Baruselli; Alexandre Henryli Souza	257
SBTE 082	**Concentração de progesterona durante protocolo a base de P4/BE na prenhez a IATF em vacas holandesas em lactação** João Pedro De Albuquerque; Eraldo Laerte Drago Filho; Sergio Soriano; Alex Fagner Sica; Adnan Darin Pereira Rodrigues; Augusto Mesquita Lacerda Madureira; Jose Luiz Moraes Vasconcelos	258
SBTE 083	**Concentração de progesterona e resposta ovariana após a administração de PGF2αlpha no início do protocolo de IATF em novilhas taurinas de corte** Richard Núñez Olivera; Guido Kuffo; Federico Cuadro; Camila Simões; Romina Artagaveytia; Alejo Menchaca	259
SBTE 084	**Concentração endógena de progesterona interfere na liberação deste hormônio por dispositivos intravaginais** Humberto Del Hoyo Neri; Miller Pereira Palhão; Deiler Sampaio Costa; João Henrique Moreira Viana; Ana Cristina Silva De Figueiredo; Carlos Antônio De Carvalho Fernandes	260
SBTE 085	**Diferentes doses de gonadotrofina coriônica equina no protocolo de IATF de vacas taurinas de corte lactantes: impacto no crescimento folicular e na ocorrência de estro** Giovane Wolffenbüttel Carloto; Ana Paula Martini; Gilson Antonio Pessoa; Mityelle Da Costa Chaves Rodrigues; Cassio Cassal Brauner; Pietro Sampaio Baruselli; Mara Iolanda Batistella Rubin; Marcio Nunes Correa; Fábio Gallas Leivas; Manoel Francisco Sá Filho	261
SBTE 086	**Diferentes doses de gonadotrofina coriônica equina no protocolo de inseminação artificial em tempo fixo em vacas taurinas lactantes: impacto sobre a taxa de prenhez** Ana Paula Martini; Gilson Antonio Pessoa; Giovane Wolffenbüttel Carloto; Mityelle Da Costa Chaves Rodrigues; Cassio Cassal Brauner; Pietro Sampaio Baruselli; Mara Iolanda Batistella Rubin; Marcio Nunes Correa; Fábio Gallas Leivas; Manoel Francisco Sá Filho	262
SBTE 087	**Diâmetro do folículo no qual a eCG apresenta efeito sobre o crescimento folicular e fertilidade de vacas *Bos indicus* submetidas à IATF** Miguel Pizzolante Bottino; Renato Wihby Girotto; Pietro Sampaio Baruselli; José Nélio De Sousa Sales	263

SBTE 088	**eCG incorporado ao protocolo de IATF aumenta a concepção de vacas leiteiras mestiças com até 70 del** Alexandre Barbieri Prata; Pedro Leopoldo Jerônimo Monteiro Jr; Guilherme Corrêa De Sousa Pontes; Jessica Nora Drum; Roberto Sartori	264
SBTE 089	**Efecto de la concentracion de progesterona y el momento de la GnRH en las tasas de preñez de vaquillonas holando tratadas con el protocolo j-synch** Gabriel Amilcar Bo; Martin Gonzalo Re; Gustavo Curchod; Damian Alessio	265
SBTE 090	**Efeito da angiotensina-(1-7) na taxa de ovulação de cabras submetidas a inseminação artificial em tempo fixo** Amilton Paulo Raposo Costa; Andréia Da Silva Costa; José Adalmir Torres Souza; Felipe Pereira Da Silva Barçante; Antonio Sousa Junior; Joilson Ferreira Batista; Icaro O. Torres Sousa	266
SBTE 091	**Efeito da associação entre benzoato de estradiol e GnRH no início do protocolo de IATF na fertilidade de vacas holandesas de alta produção** Rafael Ruggeri; Cesar Diniz Narciso; Emiliana Oliveira Santana Batista; Pietro Sampaio Baruselli; Roberto Sartori; Alexandre Henryli Souza	267
SBTE 092	**Efeito da categoria animal na eficiência da TETF em bubalinos** Julia Gleyci Soares; Nelcio Antonio Tonizza De Carvalho; Diego Cavalcante De Souza; Andrea Cristina Basso; Antonio Nogueira Vieira; Rodrigo Mendes Untura; Breno Marcassa De Godoi; Cesar Augusto Moreira Da Silva; José Nélio De Sousa Sales; Pietro Sampaio Baruselli	268
SBTE 093	**Efeito da presença de corpo lúteo em búfalas em lactação na resposta ao protocolo ovsynch durante a estação reprodutiva favorável (resultados preliminares)** Diego Cavalcante De Souza; Nelcio Antonio Tonizza De Carvalho; Julia Gleyci Soares; Bruno Moura Monteiro; Ed Hoffmann Madureira; Pietro Sampaio Baruselli	269
SBTE 094	**Efeito da prostaglandina aplicada no início do protocolo de sincronização de cio com progesterona e estradiol em novilhas *Bos taurus taurus*** Guilherme Machado Zanatta; Verônica Flores Da Cunha Scheeren; Diego Fontoura Simões; Laurence Boligon De Araujo; Luiz Augusto Machado Centeno; Mariani Farias Fiorenza; Ana Paula Martini; Janislene Mach Trentin; Gilson Antonio Pessoa; Mara Iolanda Batistella Rubin	270
SBTE 095	**Efeito do uso de eCG (syncro-part) na resposta ovariana e na taxa de prenhez de vacas *Bos indicus* submetidas à IATF** Maria Clara Costa Mattos; Sandra Fernandez; Alexandre Henryli Souza; Bruna Cerrutti De Godoi; João Paulo Martinelli Massoneto; Luiz Antônio Scandiuzzi Jr; Allan Gledson Ferreira Dos Santos; Lucas Rodrigues De Souza; Miguel Pizzolante Bottino; José Nélio De Sousa Sales	271
SBTE 096	**Eficiência de dois dispositivos de progesterona contendo quantidades diferentes do princípio ativo** Felipe Costa Gonçalves; Carlos Antônio De Carvalho Fernandes; Miller Pereira Palhão; Ana Cristina Silva De Figueiredo; Jairo Pereira Neves; Aécio Silveira Raymundy; Tochimara Aparecida Miyauchi; Romeu Luiz De Podestá Junior; Lucas Freire Pereira; Junior Henrique De Oliveira	272
SBTE 097	**Eficiência reprodutiva de primíparas nelore de 24 meses submetidas à programas de ressincronização após IATF** Bruna Martins Guerreiro; Bruno Gonzalez De Freitas; Rodolfo Daniel Mingoti; Emiliana Oliveira Santana Batista; Gabriel Armond Crepaldi; Manoel Francisco Sá Filho; Lais Mendes Vieira; Bruno Moura Monteiro; Pietro Sampaio Baruselli	273
SBTE 098	**Eficácia de diferentes indutores da ovulação em vacas leiteiras submetidas à inseminação artificial em tempo fixo** Otávia Reis Silva; Juliana Ferreira Rocha; Samuel Rodrigues Bonamichi Couto; Joaquim Esquerdo Ferreira; Osvaldo Almeida Resende; Marco Roberto Bourg Mello	274
SBTE 099	**Estradiol, GnRH ou sua associação no início do protocolo de ressincronização resulta em semelhante eficiência reprodutiva em vacas leiteiras** Lais Mendes Vieira; Bruna Martins Guerreiro; Emiliana Oliveira Santana Batista; Bruno Gonzalez De Freitas; Manoel Francisco Sá Filho; Guilherme De Souza Floriano Machado De Vasconcellos; Julia Gleyci Soares; Luiz Gustavo Martignoni Bragança; Sintia S Plá; Pietro Sampaio Baruselli	275
SBTE 100	**Fatores que afetam a temperatura vaginal em vacas da raça holandesa em lactação de alta produção.** Eraldo Laerte Drago Filho; Augusto Mesquita Lacerda Madureira; Liam B Polsky; Sergio Soriano; Alex Fagner Sica; Jose Luiz Moraes Vasconcelos; Ronaldo Luis Aoki Cerri	276

SBTE 101	**Frequência bacteriana de amostras uterinas de éguas da raça mangalarga marchador** M.P. Moreno, M.A.F. Sá, Melo, D., Dutra, G.A., Gomez, M.A.; Abreu, D.P.B.; J.C.F. Jacob	277
SBTE 102	**Glicoproteína associada a gestação prediz perdas de gestação em vacas de leite** Marcos Henrique Colombo Pereira; Ky Pohler; Francisco Rebolo Lopes; Wedson Maria Costa; Jose Luiz Moraes Vasconcelos	278
SBTE 103	**IATF de acordo com o diâmetro do folículo pré-ovulatório aumenta a taxa de gestação de vacas de corte lactantes** Natália Castro; Luiz Francisco Machado Pfeifer; Jamyle Cestaro; Vitor Torres Melo; Paulo Neves	279
SBTE 104	**Impacto da gonadotrofina coriônica equina associada ao desmame temporário, ao benzoato ou ao cipionato de estradiol na IATF em vacas primíparas *Bos indicus*.** André Luís Bastos Souza; Luiz Ernandes Kozicki; Marcio Saporski Segui; Romildo Romualdo Weiss; Danilo Amadori Martins Oliveira; João Filipi Scheffer Pereira; Melina Andrea Formighieri Bertol	280
SBTE 105	**Impacto da modulação hormonal do proestro sobre a expressão gênica uterina associada à proliferação de células de vacas de corte lactantes em anestro** Manoel Francisco Sá Filho; Angela Maria Gonella-Diaza; Guilherme Pugliesi; Mariana Sponchiado; Márcio Ferreira Mendanha; Roney Santos Ramos; Marcelo Demarchi Goissis; Fernando Silveira Mesquita; Pietro Sampaio Baruselli; Mário Binelli	281
SBTE 106	**Impacto do grupo genético (*B. indicus vs. B. taurus*) e da ingestão de matéria seca (alta vs. baixa) sobre a expressão gênica de enzimas hepáticas relacionadas ao metabolismo de progesterona** Emiliana Oliveira Santana Batista; Carolina Habermann Macabelli; Marcos Roberto Chiaratti; Melina M. Yasuoka; Rodrigo Vasconcellos Sala; Mariana Dulce Delle Vedove Ortolan; Elmeson Ferreira Jesus; Tiago Antonio Del Valle; Francisco Palma Renno; Pietro Sampaio Baruselli	282
SBTE 107	**Impacto dos tratamentos com progesterona injetável de longa ação e/ou hCG 3 dias após a IATF na taxa de concepção de vacas holandesas em lactação** Evandro Davanço Ferreira De Souza; Tiago Carneiro; Emiliana Oliveira Santana Batista; Lais Mendes Vieira; Manoel Francisco Sá Filho; Pietro Sampaio Baruselli	283
SBTE 108	**Impacto na taxa de concepção e expressão de estro com o uso de diferentes estéres de estradiol ou GnRH como indutor de ovulação em protocolos de IATF em vacas de leite cruzadas** Romulo Germano Rezende; Rodolfo Daniel Mingoti; Rodrigo Vasconcellos Sala; Emiliana Oliveira Santana Batista; Bruno Gonzalez De Freitas; Julia Gleyci Soares; Lais Mendes Vieira; João Mendes Padilha Gandara Mendes; Pietro Sampaio Baruselli; Gustavo Guerino Macedo	284
SBTE 109	**Implantes de progesterona de 1 uso no desempenho reprodutivo de novilhas nelore num protocolo de IATF** Luiz Guilherme De Oliveira; Marilú Martins Gioso; Carlos Antônio De Carvalho Fernandes; Jose Antonio D Garcia; Tatimara Maria Miyauchi; Rodrigo Cesar Felicio	285
SBTE 110	**Indução de ciclicidade na eficiência reprodutiva de novilhas nelore de 14 meses de idade submetidas à inseminação artificial em tempo fixo** Bruno Gonzalez De Freitas; Bruna Martins Guerreiro; Rodolfo Daniel Mingoti; Manoel Francisco Sá Filho; Lais Mendes Vieira; Bruno Moura Monteiro; Pietro Sampaio Baruselli	286
SBTE 111	**Influencia do diâmetro do folículo no momento da IATF sobre a ocorrência de estro e a taxa de concepção em vacas de corte taurinas em anestro** Mityelle Da Costa Chaves Rodrigues; Lucas Balinhas Farias; Monique Da Silva Costa; Cassio Cassal Brauner; Marcio Nunes Correa; Manoel Francisco Sá Filho; Carolina Bespalhok Jacometo; Gilson Antonio Pessoa; Fábio Gallas Leivas; Giovane Wolffenbüttel Carloto	287
SBTE 112	**Influência do ambiente uterino (matriz em lactação ou não) e fertilidade da matriz no desempenho reprodutivo futuro da sua prole em vacas holandesas** Alexandre Henryli Souza; Maria Clara Costa Mattos; Bruna Cerrutti De Godoi; Emiliana Oliveira Santana Batista; Pietro Sampaio Baruselli	288
SBTE 113	**Inseminação artificial e iatf em rebanhos leiteiros acrianos: relato de caso** Bruno Pena Carvalho; Francisco Aloísio Cavalcante; José Marques Carneiro Junior	289
SBTE 114	**Intensificação do manejo reprodutivo em um rebanho leiteiro** Pedro Leopoldo Jerônimo Monteiro Jr; Jorge Alberto Hildebrand Gonzales; Bruno Gonzales; Roberto Sartori	290

SBTE 115	**Melhoria da taxa de prenhez com o protocolo de 6 dias j-synch em vacas receptoras de embriões produzidos *in vitro*** A. Menchaca; S Dutra; J M Carrau; F Sapriza; J Salazar; J De La Mata; G Bo	291
SBTE 116	**O descongelamento simultâneo de dez palhetas de sêmen reduz a taxas de concepção de vacas de corte submetidas a IATF** Luciano Penteado; Remolo Rey Quesada; Iara Maris Pires Rosa; Leandro Graeff; Rodolfo Daniel Mingoti; Manoel Francisco Sá Filho; Pietro Sampaio Baruselli	292
SBTE 117	**O processo da inseminação artificial altera a concentração plasmática de cortisol e a hemodinâmica uterina em bovinos?** Bruna Marcele Oliveira; Rubens Paes De Arruda; Milton Maturana Filho; Helder Esteves Thomé; Guilherme Cain De Oliveira; Carina Fátima Guimarães; Luciano A Silva; Eneiva Carla Carvalho Celeghini	293
SBTE 118	**O uso de protocolos de sincronização da emergência de onda folicular e ovulação e de ecg pode acelerar a prenhez de primíparas nelore (*B. Indicus*) entouradas** Roberta Machado Ferreira; Talita Lara Conti; Lucas De Araújo Souto; José Nélio De Sousa Sales; Pietro Sampaio Baruselli	294
SBTE 119	**Perdas de princípio ativo na higienização de dispositivos intravaginais de progesterona visando reutilização posterior** Lucas Freire Pereira; Tochimara Aparecida Miyauchi; Aécio Silveira Raymundy; Romeu Luiz De Podestá Junior; Junior Henrique De Oliveira; Carlos Antônio De Carvalho Fernandes; Ana Cristina Silva De Figueiredo; João Henrique Moreira Viana; Felipe Costa Gonçalves	295
SBTE 120	**Produção embrionária de ovelhas santa inês superovuladas com FSH** Demis Carlos Ribeiro Menezes; Alexandre Floriani Ramos; Ivo Pivato; Jairo Pereira Neves; Itacir Melara; Pablo Oliveira Lopes; Eduardo Meneses Da Silva; Gilvan Rodrigues De Oliveira; Ana Luiza Silva Guimarães; Nathalia Hack Moreira	296
SBTE 121	**Redução do manejo de vacas de corte para realização da inseminação artificial com sêmen sexado** Pietro Sampaio Baruselli; Bruno Gonzalez De Freitas; Bruna Martins Guerreiro; Evanil Pires Campos Filho; Gabriel Armond Crepaldi; Marcio Wasilewski De Castro; Anderson Faquim; Bruno Moura Monteiro; Manoel Francisco Sá Filho	297
SBTE 122	**Relação entre população de folículos antrais e diâmetro uterino em novilhas nelore** Bárbara Pedro Novelli; Crícia Alves Gutjahr; Luiz Fernando Garro Monteiro; Henrique Goulart Ribeiro De Mendonça; Anna Raquel Grimas Almeida; Tamires Korchovei Sanches; José Carlos Arevalo Junior; Wanessa Blaschi; Thales Ricardo Rigo Barreiros	298
SBTE 123	**Ressincronização melhora a eficiência reprodutiva de vacas taurinas lactantes submetidas à estação de monta durante o outono-inverno** Mara Iolanda Batistella Rubin; Ana Paula Martini; Diego Fontoura Simões; José Alberto Rocha De Oliveira; Janislene Mach Trentin; Manoel Francisco Sá Filho; Pietro Sampaio Baruselli; Gilson Antonio Pessoa	299
SBTE 124	**Suplementação com acetato de melengestrol (MGA) pós IATF aumenta fertilidade em vacas nelore paridas** Wedson Maria Costa; Everton Rodolfo Carvalho; Marcos Henrique Colombo Pereira; Rogerio Fonseca Guimaraes Peres; Jose Luiz Moraes Vasconcelos	300
SBTE 125	**Suplementação com semente de girassol altera a composição lipídica do endométrio em vacas de corte** Claudia Bertan Membrive; Mariângela Bueno Cordeiro; Dante Pazzanese Duarte Lanna; Guilherme Pugliesi; Thiago Santin; Manoel Francisco Sá Filho; Mário Binelli	301
SBTE 126	**Taxa de concepção à IATF de vacas nelore (*Bos indicus*) submetidas ao protocolo de 3 ou 4 manejos com sincrogest® ou CIDR®** Rodolfo Daniel Mingoti; Michele Ricieri Bastos; Alessandra Ambrósio Teixeira; Marcus Luciano Guimarães Rezende; Marcio Wasilewski De Castro; Anderson Faquim; Manoel Francisco Sá Filho; Pietro Sampaio Baruselli	302
SBTE 127	**Taxa de gestação de fêmeas nelore suplementadas com progesterona oral após a IATF** Marcos Chalhoub; Alessandro Bitencourt Nascimento; Aloisio Bitencourt Nascimento; Marcus Vinícius Galvão Loiola; Alexandra Soares Rodrigues; Priscila Assis Ferraz; Carlos Henrique Calazans Oliveira; Rodrigo Freitas Bittencourt; Alberto Lopes Gusmão; Antonio De Lisboa Ribeiro Filho	303
SBTE 128	**Taxa de prenhez e tamanho de ninhadas de cadelas da raça bulldog inglês inseminadas com sêmen fresco** Gustavo Henrique Marques Araujo; Bruna M. S. Hernandes; Flavio C. Leme; Anelise Carla Camplesi; Carla Fredrichsen Moya-Araujo	304

SBTE 129	**Taxa de prenhez em novilhas da raça nelore (*Bos taurus indicus*) tratadas com PGF-2α** Evellyn Aryanne Lopes Carvalho; Sebastião Tavares Rolim Filho; Haroldo Francisco Lobato Ribeiro; Keitiane Colares Sousa; Regivany Do Socorro Lima Chaves; Lucas Da Veiga Lima Bastos; Wilson Amaro Moreira Conde Sobrinho	305
SBTE 130	**Tolerana® aumenta a taxa de concepção em vacas inseminadas** Silvio Merenda Filho; Andre Luis Ramos; Elder Francisco Latorraca; Camilo Del Cistia Andrade; Marcelo Dias Baruffi; Erika Silva Carvalho Morani; Marcelo Roncoletta	306
SBTE 131	**Transferência intrafolicular de ovócitos imaturos: uma alternativa para a multiplicação de fêmeas bovinas** José Felipe Warmling Sprícigo; Severio Bernardino Sena Netto; Luiz Manoel Souza Simoes; Ligiane Oliveira Leme; Ana Luiza Silva Guimarães; Ivo Pivato; Margot Alves Nunes Dode	307
SBTE 132	**Tratamento com melatonina ou progesterona em búfalas lactantes durante o anestro estacional** Nelcio Antonio Tonizza De Carvalho; Diego Cavalcante De Souza; Manoel Francisco Sá Filho; Julia Gleyci Soares; Ed Hoffmann Madureira; Sarvpreet Singh Ghuman; Pietro Sampaio Baruselli	308
SBTE 133	**Tratamento com prostaglandina no início do protocolo em vacas de corte com CL aumenta a taxa de concepção após a IATF** Antonio Francisco Chaves Neto; João Guilherme Sartori; Roney Santos Ramos; Michele Ricieri Bastos; Marcus Luciano Guimarães Rezende; Lais Mendes Vieira; Pietro Sampaio Baruselli	309
SBTE 134	**Tratamento de infecções puerperais em vacas leiteiras com antibióticos** Jairo Pereira Neves; Moises Soares; André Oliveira Andrade; Marilú Martins Gioso; Ana Cristina Silva De Figueiredo; Carlos Antônio De Carvalho Fernandes	310
SBTE 135	**Uso de vacinas bioabortogen h® e bioleptogen® como estratégia para reduzir a perda gestacional entre 30 e 60 dias em novilhas de corte** Talita Lara Conti; Lucas De Araújo Souto; José Nélio De Sousa Sales; Pietro Sampaio Baruselli; Roberta Machado Ferreira	311
SBTE 136	**Utilização de duas doses de cloprostenol em diferentes intervalos na sincronização do estro em ovelhas da raça santa inês** Sheylla Foligno De Carvalho Menezes De Almeida; Jeferson Ferreira Da Fonseca; Mário Felipe Alvarez Balaro; José Gabriel De Almeida Pedro Henrique Nicolau Pinto; Ana Beatriz Moura; Rômulo Mendonça Da Rosa; Felipe Zandonadi Brandao	312
SBTE 137	**Vetscore: novo método para avaliação nutricional e seleção de vacas de corte para IATF** Luiz Francisco Machado Pfeifer; Natália Castro; Jamyle Cestaro; Vitor Torres Melo; Paulo Neves	313
OPU-FIV e TE (Resumos SBTE 138 a SBTE 189)		
SBTE 138	**A progesterona injetável longa ação interfere na quantidade e qualidade oocitária e na produção de embriões *in vitro* em novilhas nelore pré-púberes** Rafael Rodrigues Corrêa; Anelise Ribeiro Peres; Jose Ricardo Garla Maio; Joaquim Mansano Garcia; Aderson Mauricio Ifran; Ricardo Perecin Nociti	314
SBTE 139	**Produção *in vitro* de embriões bovinos e bubalinos com adição do óleo essencial lippia origanoides no meio de maturação** Emílio César Martins Pereira; Eunice Oba; Álan Maia Borges; Moysés Dos Santos Miranda; Virgílio Barbosa Andrade; Joyce Kelly Do Rosario Da Silva; João Gabriel Viana De Grázia; Marcus Vinicius Prado Silva	315
SBTE 140	**Avaliação da produção *in vitro* de embriões de acordo com a ciclicidade de vacas nelore (*Bos indicus*) submetidas a aspirações foliculares em diferentes momentos do pós-parto** Júlia Cestari Pierucci; Cecilia Rodrigues Alves Silveira; Gustavo Luís Dos Santos; Walt Yamazaki; Luciana Terumi Sanomiya Yamazaki; Erika Aline Ribeiro Dias; Claudia Cristina Paz; Fabio Morato Monteiro; Pietro Sampaio Baruselli; Lindsay Unno Gimenes	316
SBTE 141	**Avaliação da produção *in vitro* de embriões em vacas nelore (*Bos indicus*) com alta e baixa contagem folicular submetidas a aspirações foliculares em diferentes momentos do pós-parto** Cecilia Rodrigues Alves Silveira; Júlia Cestari Pierucci; Gustavo Luís Dos Santos; Walt Yamazaki; Luciana Terumi Sanomiya Yamazaki; Erika Aline Ribeiro Dias; Lais Mendes Vieira; Fabio Morato Monteiro; Pietro Sampaio Baruselli; Lindsay Unno Gimenes	317

SBTE 142	**Avaliação do uso do micro-ondas como método alternativo para esterilização de materiais usados em reprodução animal assistida** Priscila Helen Duda; Andrea Maria Lazzari; Gislaine Gomes Gonçalves; Marilia Viviane Snel Oliveira; Andrei Antonioni Fidelis	318
SBTE 143	**Capacitação *in vitro* de espermatozoides com L-arginina e heparina em ausência de complexos cumulus-oócitos e seu impacto na produção de embriões** Gester Breda Aguiar; Maria Clara Caldas-Bussiere; Natália Ferreira Torres; Valter Luis Maciel; Claudio Luiz Melo De Souza	319
SBTE 144	**Comparação de diferentes soluções de armazenamento de ovários sobre os parâmetros quanti-qualitativos avaliados por critérios morfológicos e teste de azul cresil brilhante em oócitos bovinos** Luiza Bento De Queiroz Neta; Maria Valéria De Oliveira Santos; Cibelle Anne Dos Santos Costa; Alana Azevedo Borges; Pedro Henrique Fernandes De França; José Teixeira Da Rocha Neto; Magda Lorena Turbano Dos Santos; Alexandre Rodrigues Silva; Alexsandra Fernandes Pereira	320
SBTE 145	**Comparação dos resultados de produção de embriões FIV bovinos e de gestação, com sêmen convencional e sêmen sexado de macho** Patricia Furtado Malard; Luiz Gustavo Araujo Oliveira; Arthur Levantezi Santos; Luis Mauro Valadao Queiroz	321
SBTE 146	**Comparação entre o número de estruturas recuperadas e embriões viáveis de ovelhas submetidas a protocolo de superovulação suplementadas com glicerol.** Alberto Lopes Gusmão; Carlos Henrique Calazans Oliveira; Alexandra Soares Rodrigues; Alana Santana Carvalho; Rodrigo Freitas Bittencourt; Cláudia Kazumi Kiya; Mariana Alves De Andrade Silva; Marcus Vinícius Galvão Loiola; Marcos Chalhoub; Antonio De Lisboa Ribeiro Filho	322
SBTE 147	**Descrição de duas novas técnicas cirúrgicas para o tratamento de prolapso vaginal em vacas doadoras zebuínas: vaginectomia parcial e vaginopexia dorsal** José Abdo De Andrade Hellú	323
SBTE 148	**Desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro* após refrigeração em meio 199 e botuembryo®** Fernanda Nunes Marqui; Alício Martins Jr; Diego Gouvêa Souza; Fernando Franco Polizel; José Antonio Junior Dell`Aqua; Eunice Oba	324
SBTE 149	**Diferentes métodos de coleta de embriões e protocolos de superovulação em fêmeas ovinas da raça crioula lanada.** Arnaldo Diniz Vieira; Monike Dos Santos Quirino; Karina Lemos Goularte; Carlos Eduardo Ranquetat Ferreira; Gustavo Desire Antunes Gastal; Ligia Margareth Cantarelli Pegoraro; Rafael Gianella Mondadori; Bernardo Garziera Gasperin	325
SBTE 150	**Dilatação cervical em ovelhas da raça santa inês induzida por misoprostol, ocitocina e estradiol para desenvolvimento de método não cirúrgico para coleta de embriões** Felipe Zandonadi Brandao; Ceci Ribeiro Leite; Jeferson Ferreira Da Fonseca; Daniel Andrews De Moura Fernandes; Mário Felipe Alvarez Balaro; Ana Clara Sarzedas; Carolina Cerqueira Sarmento Olivares	326
SBTE 151	**Diminuição de grânulos lipídicos de embriões bovinos produzidos *in vitro* com baixas concentrações de forskolin** Daniela Martins Paschoal; Mateus José Sudano; Rosiara Rosaria Dias Maziero; Midyan Daroz Guastali; Luis Carlos Oña Magalhães; Fernanda Cruz Landim Alvarenga; Alício Martins Jr; Cláudia Lima Verde Leal	327
SBTE 152	**Efeito da adição de butafosfan no meio de maturação oocitária na produção de embriões bovinos *in vitro*** Lucas Teixeira Hax; Augusto Schneider; Marcio Nunes Correa; Sofia Del Carmen Bonilla De Souza Leal; Carlos Eduardo Gomez Martin	328
SBTE 153	**Efeito da sincronia do estro entre receptoras e doadoras de embriões, qualidade e estado (congelado ou fresco) do embrião sobre a taxa de prenhez em transferência de embriões** Cassio Cassal Brauner; Mityelle Da Costa Chaves Rodrigues; Ana Lucia Martins Bonotto; Carolina Bespalhok Jacometo; Alice De Moura Benites; Marcio Nunes Correa	329
SBTE 154	**Efeito da suplementação com metionina e colina protegidas em embriões de vacas da raça holandês** Diego Andres Acosta; Ana Denicol; Maria Ines Rivelli; Cassandra Skenandore; Daniel Luchini; Marcio Corrêa; Peter Hansen; Felipe Cardoso Cardoso	330

SBTE 155	**Efeito da utilização do sistema de maturação *in vitro* spom sobre o escore lipídico de embriões bovinos** Gabriela Ramos Leal; Clara Ana Santos Monteiro; Helena Fabiana Reis De Almeida Saraiva; Paola Maria Da Silva Rosa; Agostinho Jorge Dos Reis Camargo; André Luís Rios Rodrigues; Carlos Otávio De Paula Vasconcelos; Luiz Altamiro Garcia Nogueira; Clara Slade Oliveira; Raquel Varella Serapião	331
SBTE 156	**Efeito de dietas com diferentes níveis de proteína degradável e não degradável no rúmen na apoptose de oócitos e células do cumulus-oophurus de vacas girolando** Luciano De Rezende Carvalheira; Jasmin Jasmin; Gustavo Bervian Santos; Clóvis Ribeiro Guimarães; Bruna Rios Coelho Alves; Fernanda Samarini Machado; Mariana Magalhães Campos; André Luís Rios Rodrigues; Luiz Altamiro Garcia Nogueira; Bruno Campos De Carvalho	332
SBTE 157	**Efeito do tratamento com progesterona e FSH na aspiração folicular da primeira onda folicular em ovelhas** Jose Federico Cuadro; P. C. Dos Santos-Neto; Diego Bosolasco; Victoria Brum; Martina Crispo; Alejo Menchaca	333
SBTE 158	**Efeito do uso de moduladores de AMPc na etapa de pré-maturação *in vitro* sobre taxas de produção e conteúdo lipídico de embriões mestiços bovinos** Helena Fabiana Reis De Almeida Saraiva; Gabriela Ramos Leal; Clara Ana Santos Monteiro; Paola Maria Da Silva Rosa; Agostinho Jorge Dos Reis Camargo; Raquel Varella Serapião; Felipe Zandonadi Brandao; Clara Slade Oliveira	334
SBTE 159	**Efeitos da seleção espermática em camada única de percoll®, antes da congelação, sobre as características cinéticas de espermatozoides bovinos pós-descongelação** Jaqueline Poleto Bragato; Fernanda Nunes Marqui; Tatiana Issa Berton; Yamê Fabres Robaina Sancler-Silva; Edjalma Rodrigues Silva-Junior; Diego Gouvêa Souza; Mateus José Sudano; Daniela Martins Paschoal; Fernando Franco Polizel; Alício Martins Jr	335
SBTE 160	**Efeitos moleculares e celulares de exossomos do fluido folicular de vacas nelore submetidas à superestimulação ovariana** Fernanda Fagali Franchi; Patrícia Kubo Fontes; Priscila Helena Santos; Juliano Coelho Da Silveira; Marcelo Fabio Gouveia Nogueira; Ciro Moraes Barros; Anthony César Souza Castilho	336
SBTE 161	**Efeito do cultivo *in vitro* no tamanho e sexo de embriões bovinos no D14 de desenvolvimento** Ana Luiza Silva Guimarães; José Oliveira Carvalho; Ligiane Oliveira Leme; José Felipe Warmling Sprícigo; Ivo Pivato; Margot Alves Nunes Dode	337
SBTE 162	**Efeito do inibidor da enzima conversora de angiotensina na taxa de blastocisto bovino** José Adalmir Torres Souza; Antonio Sousa Junior; Yndyra Nayan Teixeira Carvalho; Luis Harliton Cavalcante Monteiro Mota; Isolda Marcia Rocha Do Nascimento; Marlon De Araújo Castelo Branco; Leopoldina Almeida Gomes; Filipe Barros Nunes; Amilton Paulo Raposo Costa; Felipe Jesus Moraes Jr	338
SBTE 163	**Efeito do resveratrol no meio de fecundação *in vitro* sobre a viabilidade espermática em bovinos** Carolina Marinho De Assunção; Thamiris Dornelas Araújo; Eliza Diniz De Souza; João Gabriel Viana De Grázia; Vivian Rachel Araújo Mendes; João Henrique Moreira Viana; Nadia Barbosa Rezende Raposo; Luiz Sérgio De Almeida Camargo	339
SBTE 164	**Efeito do tempo de tratamento de FSH (4d vs 7d) na resposta superovulatória de vacas holandesas em lactação** Cesar Diniz Narciso; Elliot Martinez; Rafael Ruggeri; Alvaro Garcia-Guerra; Yeda Fumie Watanabe; Marina Chiba; Emiliana Oliveira Santana Batista; Milo Wiltbank; Reuben John Mapletoft; Alexandre Henryli Souza	340
SBTE 165	**Estabelecimento e acompanhamento da gestação em vacas da raça holandesa após transferência de embrião produzido *in vivo* ou *in vitro*** Camila Bortoletto; Cecilia Rodrigues Alves Silveira; Carlos Alberto Rodrigues; Péricles Ricardo Lacerda E Silva; Augusto Castro Neto; Lais Mendes Vieira; Amanda Prudêncio Lemes; Pietro Sampaio Baruselli; Lindsay Unno Gimenes	341
SBTE 166	**Expressão gênica de AREG e EREG nas células do cumulus de oócitos bovinos maturados *in vitro* em meio suplementado com SFB, BSA ou PVA** Fernando Franco Polizel; Diego Gouvêa Souza; Fernanda Nunes Marqui; Andressa Vilas Boas Nogueira; Sabrina Cruz Tfaile Frasnelli; Jaqueline Poleto Bragato; Alício Martins Jr; Eunice Oba	342

SBTE 167	**Identificação do vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) em líquido de lavado uterino e embriões oriundos de cabras leiteiras naturalmente infectadas** Paula Maria Pires Do Nascimento; Gustavo Bervian Santos; André Oliveira Penido; Jeferson Ferreira Da Fonseca; Rômulo Cerqueira Leite	343
SBTE 168	**Influência genética e climática na taxa de gestação em receptoras de embriões bovinos** Tatimara Maria Miyauchi; Rodrigo Cesar Felicio; Tochimara Aparecida Miyauchi; Carlos Antônio De Carvalho Fernandes; Ester Siqueira Caixeta; Ana Cristina Silva De Figueiredo; Jairo Pereira Neves; Miller Pereira Palhão	344
SBTE 169	**Influência do status ovariano na produção *in vitro* de embriões bovinos** Edgar Ricardo Moreno; Alejandra Lisset Arias; Edgar Mauricio Mogollon; Aldemar Chavez Rodriguez; Bruno Pena Carvalho; Diego Fernando Dubeibe	345
SBTE 170	**Influência do temperamento animal nas taxas de resposta ao protocolo hormonal e de prenhez em vacas receptoras de embriões.** Jefferson Viana Alves Diniz; Rafael Augusto Satrapa; João Alexandre Matos Carneiro; Marcos Nereu Luckner; Rosano Ramos Marcelino; Samuel Catuci Fritsch; Eunice Oba	346
SBTE 171	**Inibição da metilação com 5-AZA-2'-deoxycytidine interfere no desenvolvimento de embriões bovinos derivados de oócitos submetidos ao choque térmico** Thamiris Dornelas Araújo; Carolina Capobiango Romano Quintão; Carolina Marinho De Assunção; Eliza Diniz De Souza; João Henrique Moreira Viana; Luiz Sérgio De Almeida Camargo	347
SBTE 172	**Manipulação hormonal em bezerras nelore visando a produção *in vitro* de embriões** Thaís Abritta Zacarias; Ana Luiza Silva Guimarães; João Ricardo Scaliante; Sarah De Andrade Dias Rodrigues; Margot Alves Nunes Dode; Ricardo Alamino Figueiredo	348
SBTE 173	**Ovulação espontânea pós-parto em éguas quarto de milha receptoras de embriões** Ricardo Olimpio Schenatto; Luiz Augusto Machado Centeno; Laurence Boligon De Araujo; Karine De Vargas Aires; Guilherme Machado Zanatta; Julia Brum Spreckelsen Casarin; Mariani Farias Fiorenza; Janislene Mach Trentin; Gilson Antonio Pessoa; Mara Iolanda Batistella Rubin	349
SBTE 174	**Parâmetros de produção *in vitro* em fêmeas bovinas da raça sindi (*Bos taurus indicus*)** Raquel Rodrigues Costa Mello; Sabrina Luzia Gregio De Sousa; Marco Roberto Bourg Mello	350
SBTE 175	**Perfil plasmático de FSH após aplicação de dose única de pFSH diluído em ácido hialurônico** Felipe Pereira Vianna; Lais Mendes Vieira; Bruna Martins Guerreiro; Bruno Gonzalez De Freitas; Guilherme Nogueira Borges Filho; Gabriel A Bo; Reuben John Mapletoft; Pietro Sampaio Baruselli	351
SBTE 176	**Potencial do gnrh em sincronizar a emergência folicular e ovulação em protocolo superovulatório "dia 0" em ovinos** Joanna Maria Gonçalves De Souza Fabjan; Mário Felipe Alvarez Balaro; Teresa Gioia Bon Barbosa; Jeferson Ferreira Da Fonseca; Lucas Machado Figueira; Tarcísio Alves Texeira; Luciano De Rezende Carvalheira; Felipe Zandonadi Brandao	352
SBTE 177	**Produção *in vitro* de embriões bovinos e bubalinos com adição do óleo essencial lippia origanoides no meio de maturação** Emílio César Martins Pereira; Eunice Oba; Álan Maia Borges; Moysés Dos Santos Miranda; Virgílio Barbosa Andrade; Joyce Kelly Do Rosario Da Silva; João Gabriel Viana De Grázia; Marcus Vinicius Prado Silva	353
SBTE 178	**Produção *in vitro* de embriões bovinos e bubalinos, durante dois períodos do ano** Virgílio Barbosa Andrade; Emílio César Martins Pereira; Eunice Oba; Álan Maia Borges; Marcus Vinicius Prado Silva; Eliane Beatriz Magalhães; João Gabriel Viana De Grázia; Natália Vieira Sollecito	354
SBTE 179	**Produção *in vitro* de embriões de doadoras nelore (*Bos indicus*) mantidas durante 12 meses em um programa comercial** Bernardo Marcozzi Bayeux; Fabio Morato Monteiro; Emiliana Oliveira Santana Batista; Lais Mendes Vieira; Monica Ferreira Accorsi; Suzane Peres Campanholi; Erika Aline Ribeiro Dias; Alexandre Henryli Souza; Pietro Sampaio Baruselli	355
SBTE 180	**Reação acrossômica induzida por teofilina associada ou não à heparina no sêmen bovino** Fabiana Cristina Varago; Laíla Pereira Da Silva; Josiane Rossi Ribeiro; Carlos Antônio De Carvalho Fernandes; Bruno Campos De Carvalho; Marilú Martins Gioso; Marcela Gimenez; Jairo Pereira Neves	356

SBTE 181	**Recuperação eficiente de oócitos de onça parda (*Puma concolor*) estimuladas com gonadotrofinas através da lopu (laparoscopic ovum pick-up).** Hernan Baldassare; Juliane Bayão Carelli; Letícia Alecho Requena; Marcia Gonçalves Rodrigues; Sergio Ferreira; Jorge Salomão; Pedro Nacib Jorge Neto	357
SBTE 182	**Redução no volume dos gradientes de percoll incrementa a qualidade e recuperação de espermatozoides bovinos sexados para a PIV** Daniele Missio; Natália Picoli Folchini; Hirya Fernandes Pinto; Fábio Gallas Leivas; Daniela Dos Santos Brum	358
SBTE 183	**Sobrevivência embrionária e taxa de nascimento após a transferência de embriões ovinos produzidos *in vitro* criopreservados por congelação lenta ou vitrificação com métodos de mínimo volume** Pedro Claudino Dos Santos-Neto; Federico Cuadro; Natalibeth Barrera; Andrea Pinczak; Mariano Viz; Martina Crispo; Alejo Menchaca	359
SBTE 184	**Superovulação e colheita de embriões não cirúrgica em ovelhas santa inês** Fabiana Nunes Zambrini; José Domingos Guimaraes; Jader Forquim Prates; Luciana Vieira Esteves; Joanna Maria Gonçalves De Souza Fabjan; Felipe Zandonadi Brandao; Ana Carolina Rosa Castro; Jeferson Ferreira Da Fonseca	360
SBTE 185	**Swab nasal como pré seleção de doadoras de oócito positivas para o herpes vírus bovino** André Oliveira Penido; Paula Maria Pires Do Nascimento; Marcos Brandão Dias Ferreira; Beatriz Cordenonsi Lopes; Rômulo Cerqueira Leite	361
SBTE 186	**Taxas de concepção de embriões bovinos produzidos *in vitro*, biopsiados e transferidos à fresco ou criopreservados.** Bruna Lopes Cardoso; Bruno Valente Sanches; Andrea Cristina Basso; Daniel Robert Arnold; Rodrigo Vitorio Alonso; Caroline Emidio De Souza; Rafaela Rodrigues De Carvalho; Nathalia Guimaraes Da Cunha; Raphael Guimaraes Cordeiro; Felipe Gustavo Martins Camacho	362
SBTE 187	**Teofilina associada ou não à heparina como agente indutor da capacitação na produção *in vitro* de embriões bovinos** Bruno Campos De Carvalho; Laíla Pereira Da Silva; Fabiana Cristina Varago; Josiane Rossi Ribeiro; Carlos Antônio De Carvalho Fernandes; Marilú Martins Gioso; Marcela Gimenez; Jairo Pereira Neves	363
SBTE 188	**Uso da metil beta ciclodextrina como agente da capacitação espermática na produção *in vitro* em bubalinos (resultados preliminares)** Alessandra Ximenes Santos; Vanessa Cunha Brito; Arnaldo Algaranhar Gonçalves; Priscilla Do Carmo De Azevedo Ramos; Sebastião Tavares Rolim Filho; Haroldo Francisco Lobato Ribeiro; Moysés Dos Santos Miranda; Simone Do Socorro Damasceno Santos; Alexandre Rossetto Garcia; Otávio Mitio Ohashi	364
SBTE 189	**Viabilidade da inovulação transcervical de embriões a fresco em caprinos** Luciana Vieira Esteves; Felipe Zandonadi Brandao; Fabiana Nunes Zambrini; Joanna Maria Gonçalves De Souza Fabjan; Marcio Roberto Silva; André Luís Rios Rodrigues; Jeferson Ferreira Da Fonseca	365
Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução (Resumos SBTE 212 a SBTE 313)		
SBTE 212	**A ativação partenogenética, mas não a eletrofusão, altera a cinética de desenvolvimento e a eclosão de embriões murinos** Pablo Diego Moço; Bruna Martins Garcia; Elisa M Pioltine; Gabriela Berni Brianezi; Leticia R Chica; Livia V Saura; Marcelo Fabio Gouveia Nogueira	366
SBTE 213	**A contagem de folículos antrais ovarianos ≥ 3 mm de diâmetro está associada com a fertilidade em vacas nelore lactantes?** Marcelo Fabio Gouveia Nogueira; Vinicius Gonçalves Pinheiro; Ronaldo Luiz Ereno; Eduardo Montanari Razza; Ciro Moraes Barros	367
SBTE 214	**A contagem de folículos antrais ovarianos ≥ 3 mm de diâmetro está associada à fertilidade em vacas aberdeen angus lactantes?** Vinicius Gonçalves Pinheiro; Ronaldo Luiz Ereno; Eduardo Montanari Razza; Ciro Moraes Barros; Marcelo Fabio Gouveia Nogueira	368
SBTE 215	**Acurácia de duas formas de diagnóstico de gestação precoce em bovinos por ultrassonografia** Aécio Silveira Raymundy; Tochimara Aparecida Miyauchi; Romeu Luiz De Podestá Junior; Lucas Freire Pereira; Junior Henrique De Oliveira; Ana Cristina Silva De Figueiredo; Jairo Pereira Neves; Carlos Antônio De Carvalho Fernandes; Felipe Costa Gonçalves	369

SBTE 216	**Alterações reprodutivas em machos androgenizados durante a gestação** Manuela Wolker Manta; Ricardo Della Méa; Carolina Dos Santos Amaral; Mariana Priotto De Macedo; Lady Katerine Serrano; Fabio Vasconcellos Comim; Paulo Bayard Dias Gonçalves; Alfredo Quites Antoniazzi; Karine Campagnolo; Joabel Tonellotto Dos Santos	370
SBTE 217	**Avaliação do tempo de gestação em éguas da raça crioula – dados preliminares** Bruna Suñé Moraes; Bruna Da Rosa Curcio; Veronica La Cruz Bueno; Leonardo Motta Fornari; Ilusca Sampaio Finger; Luciana Oliveira De Araujo; Renato Rocha De Quadros; Carlos Wayne Nogueira	371
SBTE 218	**Avaliação metabólica de vacas holandesas repetidoras de serviço durante o verão e o inverno** Paula Pereira Da Matta; Daniela Becker Birgel; Eduardo Harry Birgel Junior; Vivian Fratti Penna Ríspoli; José Nélio De Sousa Sales; Pietro Sampaio Baruselli; Flavio Vieira Meirelles; Roberta Machado Ferreira	372
SBTE 219	**Bloqueio farmacológico da trimetilação da H3K27 altera a expressão do complexo repressor polycomb 2 em blastocistos bovinos PIV** Luciana Simoes Rafagnin Marinho; Camila Oliveira Rosa; Paula Alvares Lunardelli; Bruno Valente Sanches; Rodrigo Camponogara Bohrer; Werner Giehl Glanzner; Karina Gutierrez; Paulo Roberto Antunes Da Rosa; Marcelo Marcondes Seneda; Vilceu Bordignon	373
SBTE 220	**Bloqueio meiótico de oócitos bovinos com cordicepim: cinética de maturação e produção embrionária** Camila Ceccato Ferreira; Andressa P. Souza; Diana De Matia Liposki; Joana Claudia Mezzalira; Lain Uriel Ohlweiler; Alceu Mezzalira	374
SBTE 221	**Caracterização do perfil lipídico de embriões suínos da raça piau.** José Oliveira Carvalho; José Felipe Warmling Sprícigo; Luciano Paulino Da Silva; Ligiane Oliveira Leme; Bianca Damiani Marques Silva; Ana Luiza Silva Guimarães; Alexandre Floriani Ramos; Margot Alves Nunes Dode	375
SBTE 222	**Características morfológicas das lesões de placentite em éguas** Fernanda Maria Pazinato; Bruna Da Rosa Curcio; Lorena Soares Feijó; Luciana Oliveira De Araujo; Laura Correa De Oliveira; Vitória Muller; Carlos Wayne Nogueira	376
SBTE 223	**Descarte involuntário de vacas leiteiras por alterações reprodutivas** Julia Brum Spreckelsen Casarin; Thainá Minela; Diego Fontoura Simões; Mariani Farias Fiorenza; Ricardo Olimpio Schenatto; Janislene Mach Trentin; Ana Paula Martini; Gilson Antonio Pessoa; Manoel Francisco Sá Filho; Mara Iolanda Batistella Rubin	377
SBTE 224	**Desempenho reprodutivo em novilhas *Bos indicus* e *Bos taurus* x *Bos indicus*. Efeito da eCG e nível de P4 em protocolos de IATF** Adnan Darin Pereira Rodrigues; Rogerio Fonseca Guimaraes Peres; Michael Lee Day; Jose Luiz Moraes Vasconcelos	378
SBTE 225	**Desenvolvimento de embriões bovinos *in vitro* usando células-tronco mesenquimais de rato e fibroblastos embrionárias de camundongos** Jasmin Jasmin; Sávio Carneiro Martins; Fernanda Da Silva Gonçalves; Ivan Júnior Ascari; Luiz Sérgio De Almeida Camargo; Rosalia Mendez-Otero	379
SBTE 226	**Desenvolvimento *in vitro* de embriões e expressão gênica em células do cumulus e da granulosa de vacas *Bos indicus* com números diferentes de folículos antrais** Camila Oliveira Rosa; Luciana Simoes Rafagnin Marinho; Paula Alvares Lunardelli; Fernanda Zandonadi Machado; Suellen Miguez Gonzalez; Paulo Roberto Antunes Da Rosa; Matheus Pedrotti De Cesaro; João Vitor Ravagmani Bueno; Vilceu Bordignon; Marcelo Marcondes Seneda	380
SBTE 227	**Diferentes associações de análogo de GnRH e prostaglandina no tratamento de cistos ovarianos em vacas leiteiras** Ana Cristina Silva De Figueiredo; Carlos Antônio De Carvalho Fernandes; Miller Pereira Palhão; João Henrique Moreira Viana; Marilú Martins Gioso; Josiane Rossi Ribeiro; Jairo Pereira Neves	381
SBTE 228	**Distribuição dos neurônios de GnRH na área pré-óptica e hipotálamo de fêmeas bovinas** Laurence Boligon De Araujo; Carlos Eduardo Porciuncula Leonardi; Rodrigo Bravo Carrasco; Gregg Patrick Adams; Jaswant Singh	382

SBTE 229	**Efeito da administração de diferentes doses de estradiol seguido de progesterona sobre a expressão gênica dos receptores endometriais de estrógeno e progesterona em éguas receptoras acíclicas** Samuel Catuci Fritsch; Elisa Sant´Anna Monteiro Da Silva; José Carlos Figueiredo Pantoja; José Paes Oliveira Filho; Cezinande Meira	383
SBTE 230	**Efeito da melatonina na fragmentação de DNA e maturação *in vitro* de oócitos bovinos submetidos ao choque térmico** Ivan Júnior Ascari; Nadja Gomes Alves; Luiz Sérgio De Almeida Camargo; Jasmin Jasmin; Carolina Capobiango Romano Quintão; Juliane Ariane Da Silva Oliveira; Thamiris Dornelas Araújo	384
SBTE 231	**Efeito do cortisol e seu respectivo receptor na produção *in vitro* de embriões bovinos** Nathália Nogueira Da Costa; Karynne De Nazaré Lins Brito; Thiago Velasco Guimarães Silva; Priscila Di Paula Bessa Santana; Priscilla Do Carmo De Azevedo Ramos; Alessandra Ximenes Santos; Simone Do Socorro Damasceno Santos; Willian Allan King; Moysés Dos Santos Miranda; Otávio Mitio Ohashi	385
SBTE 232	**Efeito do soro fetal bovino na expressão de FASN em embrioes bovinos cultivados *in vitro*** Elane Miyuka Sato; Karynne De Nazaré Lins Brito; Nathália Nogueira Da Costa; Thiago Velasco Guimarães Silva; Priscila Di Paula Bessa Santana; Alessandra Ximenes Santos; Priscilla Do Carmo De Azevedo Ramos; Otávio Mitio Ohashi; Simone Do Socorro Damasceno Santos; Marcela Da Silva Cordeiro	386
SBTE 233	**Efeito genético paterno sobre a caracterização do ovário e das estruturas ovarianas de novilhas canchim (*Bos indicus* vs *Bos taurus*): resultados preliminares** Amanda Prudêncio Lemes; Lindsay Unno Gimenes; Cintia Righetti Marcondes; Sergio N. Esteves; Daniella Flavia Vilas Boas; Maria Carolina Villani Miguel; Narian Romanello; Caio A Volante; Alexandre Rossetto Garcia	387
SBTE 234	**Eficácia de meia dose de lutalyse® para a redução da concentração de progesterona em bovinos.** Fernando Do Amaral Braga; Elio Moro; Mauro Meneguetti; Andressa Lavezzo Ranieri; Everton Rodolfo Carvalho; Carlos Antônio De Carvalho Fernandes	388
SBTE 235	**Impacto do tratamento neonatal com agonista do GnRH em desfechos reprodutivos e metabólicos de ovelhas androgenizadas durante a gestação** Carolina Dos Santos Amaral; Igor Gabrel Zappe; Bruno Mezzomo Pasqual; Manuela Wolker Manta; Ricardo Della Méa; Lady Katerine Serrano; Joabel Tonellotto Dos Santos; Alfredo Quites Antoniazzi; Paulo Bayard Dias Gonçalves; Fabio Vasconcellos Comim	389
SBTE 236	**Influência da morte celular no dimorfismo sexual durante o desenvolvimento pré-implantação** Clara Slade Oliveira; Naiara Zoccal Saraiva; Marina Ragagnin Lima; Raquel Varella Serapião; Leticia Zoccolaro Oliveira; Carla Braga Martins; Roberta Vantini; Joaquim Mansano Garcia; Luiz Sérgio De Almeida Camargo	390
SBTE 237	**Influência do diâmetro folicular e do momento da clivagem na produção embrionária e no perfil de metilação da histona H3K4 em blastocistos bovinos** Paula Alvares Lunardelli; Fabiana De Dio Sarapião; João Vitor Ravagmani Bueno; Camila Bortoliero Costa; Larissa Zamparone Bergamo; Andressa Guidugli Lindquist; Isabela Búfalo; Marcelo Marcondes Seneda	391
SBTE 238	**Influência do fluido folicular na competência oocitária: identificação de fatores envolvidos na qualidade oocitária e desenvolvimento embrionário** Glaucia Pereira Alves; Kelly Annes; Roberta Ferreira Leite; Marcella Pecora Milazzotto	392
SBTE 239	**O efeito do fator de crescimento semelhante à insulina-i (IGF-I) na expressão de genes mitocondriais em oócitos bovinos submetidos ao choque térmico** Debora Rodrigues Gonçalves; Janahi Sousa Ticianelli; Jéssica Ispada; Pedro Henrique Bugallo Risolia; Thaís Alves Rodrigues; Fabiola Freitas De Paula Lopes	393
SBTE 240	**O papel termoprotetor do fluido folicular durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos submetidos ao choque térmico** Thaís Alves Rodrigues; Cássia Maria Barroso Orlandi; Debora Rodrigues Gonçalves; Daniela Franco Da Silva; Fabiola Freitas De Paula Lopes	394
SBTE 241	**Perfil de expressão de RNAm do receptor de (pro)renina e prorenina durante a luteinização e luteólise bovina** Andressa Minussi Pereira Dau; Paulo Roberto Antunes da Rosa; Joabel Tonellotto dos Santos; Juliana Germano Ferst; Mariana Priotto De Macedo; Alessandra Bridi; Monique Tomazele Rovani; Ricardo Della Méa; Fabio Vasconcellos Comim; Paulo Bayard Dias	395

	Gonçalves	
SBTE 242	**Perfil de progesterona plasmática e características luteais de cabras da raça saanen gestantes e não gestantes** Mário Felipe Alvarez Balaro; Jeferson Ferreira Da Fonseca; Alex Silva Santos; Luis Fernando Guaraná Macedo Moura; Natalia Assis Coelho De Faria; Joanna Maria Gonçalves De Souza Fabjan; Carlos Otávio De Paula Vasconcelos; Felipe Zandonadi Brandao	396
SBTE 243	**Principais causas de abortos em fêmeas de corte no sul do brasil e no uruguai** Mariani Farias Fiorenza; Manuelle Lautert Jardim; Karine De Vargas Aires; Taison Souza Balestrin; Diego Fontoura Simões; Janislene Mach Trentin; Julia Brum Spreckelsen Casarin; Ana Paula Martini; Gilson Antonio Pessoa; Mara Iolanda Batistella Rubin	397
SBTE 244	**Prorenina bloqueia o efeito da forscolina e reinicia a meiose em oócito bovino** Alessandra Bridi; Andressa Minussi Pereira Dau; Paulo Roberto Antunes Da Rosa; Mariana Priotto De Macedo; Juliana Germano Ferst; Matheus Pedrotti De Cesaro; Gustavo Freitas Ilha; Manuela Wolker Manta; Paulo Bayard Dias Gonçalves; Alfredo Quites Antoniazzi	398
SBTE 245	**Receptor peptídeo natriurético 3 (NPR-3) é regulado negativamente por FSH+LH em células do cumulus de bovino** Matheus Pedrotti De Cesaro; Mariana Priotto De Macedo; Joabel Tonellotto Dos Santos; Paulo Roberto Antunes Da Rosa; Andressa Minussi Pereira Dau; Janduí Escarião Da Nóbrega Jr.; Ricardo Della Méa; Bruno Mezzomo Pasqual; Vilceu Bordignon; Paulo Bayard Dias Gonçalves	399
SBTE 246	**Remodelamento dinâmico da matriz extracelular endometrial regula a receptividade ao embrião em bovinos** Saara Carolina Scolari; Guilherme Pugliesi; Ricardo De Francisco Strefezzi; Mário Binelli	400
SBTE 247	**Transferência dois hemi embriões aumenta a taxa de gestação mas não a taxa de nascimentos** Carlos Antônio De Carvalho Fernandes; Ana Cristina Silva De Figueiredo; Ciro Alexandre Alves Torres; Tochimara Aparecida Miyauchi; Miller Pereira Palhão; João Henrique Moreira Viana; Marcela Gimenez	401
SBTE 248	**Tratamento intrauterino em vacas leiteiras repetidoras de cio: dados preliminares** Janislene Mach Trentin; Karine De Vargas Aires; Verônica Flores Da Cunha Scheeren; Taison Souza Balestrin; Thainá Minela; Julia Brum Spreckelsen Casarin; Mariani Farias Fiorenza; Ana Paula Martini; Gilson Antonio Pessoa; Mara Iolanda Batistella Rubin	402
SBTE 249	**Tratamentos de endometrite pós puerperal em vacas leiteiras** André Oliveira Andrade; Marilú Martins Gioso; Carlos Antônio De Carvalho Fernandes; Ana Cristina Silva De Figueiredo; Fabiana Cristina Varago	403
SBTE 250	**Uso de diferentes dispositivos intravaginais e doses de progesterona para indução de estro sincronizado em ovelhas santa inês doadoras de embriões** Jader Forquim Prates; Fernanda Rocha Batista Oliveira; Ana Lucia Rosa E Silva Maia; Maria Izabel Carneiro Ferreira; Joanna Maria Gonçalves De Souza Fabjan; Felipe Zandonadi Brandao; Jeferson Ferreira Da Fonseca	404
SBTE 251	**Utilização da progesterona como marcador de alterações placentárias e viabilidade fetal em equinos** Ilusca Sampaio Finger; Carlos Wayne Nogueira; Claudia Barbosa Fernandes; Fernanda Maria Pazinato; Lorena Soares Feijó; Bruna Suñé Moraes; Luciana Oliveira De Araujo; Bruna Da Rosa Curcio	405
Clonagem, transgênese e células-tronco (Resumos SBTE 272 a SBTE 281)		
SBTE 272	**A seleção de espermatogônias tronco murinas (mSSC) por morfologia permite a obtenção de uma população de células com caracterítiscas de pluripotência semelhantes as células tronco embrionárias murinas (mESC)** Andrea Giannotti Galuppo; Pedro Cesar Chagastelles; Leonardo Alves Santos; Patricia Pranke	406
SBTE 273	**Caracterização de células-tronco de pluripotência induzida através do uso da imunofluorescência e citometria de fluxo em equinos.** Midyan Daroz Guastali; Michelle Silva Araújo; Bianca Andriolo Monteiro; Daniela Martins Paschoal; Rosiara Rosaria Dias Maziero; Taticia Lieh Ikeda; Fabiana Fernandes Bressan; Flavio Vieira Meirelles; Fernanda Cruz Landim Alvarenga	407

SBTE 274	**Células tronco adultas e reprodução animal: potencial do uso de células tronco mesenquimais adiposas como alternativa para o sistema tradicional de co-cultivo na PIVE em bovinos** Hamilton Silva Do Nascimento; Mayra Pauline Ribeiro Costa; Cinthia Távora De Albuquerque Lopes; Felipe Brito; Karynne De Nazaré Lins Brito; Carla Carvalho; Simone Do Socorro Damasceno Santos; Otávio Mitio Ohashi; Moysés Dos Santos Miranda	408
SBTE 275	**Desenvolvimento de embriões suínos produzidos por ativação partenogenética elétrica ou química** Lina Castelo Branco Motta; Lívia Correia Magalhães; Carla Fabiana Gomes De Jesus; Dárcio Ítalo Alves Teixeira; Luciana Magalhães Melo; Vicente José De Figueirêdo Freitas; Maajid Hassan Bhat	409
SBTE 276	**Efeito da tricostatina A na produção de embriões bovinos clonados por transferência nuclear com células tronco mesenquimais** Carolina Gonzales Da Silva; Heidi Christina Bessler; Álvaro Moraes Da Fonseca Neto; Carlos Frederico Martins; Sônia Nair Báo	410
SBTE 277	**Efeito do ciclo celular e inibição da desacetilação no desenvolvimento de embriões suínos produzidos por transferência nuclear** Vitor Braga Rissi; Werner Giehl Glanzner; Lady Katerine Serrano; Manuela Wolker Manta; Mariana Priotto De Macedo; Alfredo Quites Antoniazzi; Paulo Bayard Dias Gonçalves; Vilceu Bordignon	411
SBTE 278	**Potencial do meio condicionado completo (MC), sobrenadante (SN), microvesículas (MV) e microvesículas lisadas (L-MV) derivadas de células estromais mesenquimais (MSC) do amnion equino na supressão da proliferação de linfócitos alogênicos: resultados preliminares** Bruna De Vita; Anna Lange-Consiglio; Pietro Romele; Claudia Perrini; Patrizia Bonassi Signoroni; Fernanda Cruz Landim Alvarenga; Fausto Cremonesi; Ornella Parolini	412
SBTE 279	**Produção de embriões clones de cervídeo *(Mazama gouazoubira*) utilizando oócitos de caprino: resultados preliminares** Jesus, C.F.G.; Magalhães, L.C; Motta, L.C.B. ; Teixeira, D.I.A. ; Melo, L.M. ; Freitas, V.J.F.; Bhat, M.H.	413
SBTE 280	**Protocolo de sincronização de fibroblastos na fase G2/M do ciclo celular** João Ricardo Malheiros Souza; Vitor Braga Rissi; Werner Giehl Glanzner; Karine Campagnolo; Raíza Mengue Freitas; Felipe Ceni; Alfredo Quites Antoniazzi; Paulo Bayard Dias Gonçalves; Vilceu Bordignon	414
SBTE 281	**Transferência nuclear de células somáticas em equinos com células de doadores no G2 e oócitos em telófase II** Marc Peter Maserati Jr, Perla Fleury	415
Biotecnologias de suporte: criopreservacão, criobiologia, biologia molecular e "ômicas" (Resumos SBTE 284 a SBTE 313)		
SBTE 284	**Abordagem bioinformática para estabelecimento de marcadores da competência oocitária em células do cumulus** Lúcia Von Mengden Meirelles; Marco Antônio De Bastiani; Fábio Klamt	416
SBTE 285	**Associação de hCG e acetato de deslorelina na indução da ovulação em éguas: alteração no perfil proteico do fluido folicular** Gabriel Oliveira Santos; Henrique De Araujo Bastos; Bianca Petrucci Rocha; Marcus Ferreira Sá; Júlio Ferraz Jacob; Anita Mylius Pimentel; Caroline Antoniazzi Wolf; Maria Inês Mascarenhas Jobim; Rodrigo Costa Mattos; Adriana Pires Neves	417
SBTE 286	**Avaliação da taxa de embriões produzidos *in vitro*, e reexpansão pós descongelamento, com dois diferentes meios de cultivo** Luiz Gustavo Araujo Oliveira; Luis Mauro Valadao Queiroz; Arthur Levantezi Santos; Mauricio Antonio S. Peixer	418
SBTE 287	**Avaliação de kits de amplificação de DNA para análise genômica de biópsias de células oriundas de embriões bovinos produzidos *in vitro*.** Andrea Cristina Basso; Bruno Valente Sanches; Marc Masserati; Mayra Fernanda Alves; Daniel Robert Arnold; Flavia Lombardi Lopes	419
SBTE 288	**Avaliação *in vitro* da indução da hiperativação com procaína e cálcio ionóforo do espermatozóide equino criopreservado** Monique De Albuquerque Lagares; Hariany Seabra Martins; Fabiola De Oliveira Paes Leme; Rubens Stahlberg	420

SBTE 289	**Caracterização lipídica por MALDI-MS de embriões bovinos produzidos *in vitro* com diferentes cinéticas de desenvolvimento** Kelly Annes; Mateus José Sudano; Alessandra Tata; Vanessa Gonçalves Santos; Katia Roberta A. Belaz; Roberta Ferreira Leite; Marcos Nogueira Eberlin; Marcella Pecora Milazzotto	421
SBTE 290	**Características da h3k4me3 em embriões bovinos produzidos *in vivo* com sêmen sexado e submetidos à criopreservação** Fabiana De Andrade Melo Sterza; Mirela Brochado Souza; Jonathan Vinivicus Dos Santos; Jair Sabio De Oliveira Junior; Ralf Poehland; Ana Caroline Bini De Lima	422
SBTE 291	**Características da trimetilação da lisina 4 da histona 3 em oócitos bovinos submetidos a maturação *in vitro* e criopreservação - resultados preliminares** Mariane Gabriela Cesar Ribeiro Ferreira; Mirela Brochado Souza; José Felipe Warmling Sprícigo; Jonathan Vinivicus Dos Santos; Ralf Poehland; Margot Alves Nunes Dode; Fabiana De Andrade Melo Sterza	423
SBTE 292	**Comparação das taxas de concepção após transferência de embriões *in vitro* frescos, vitrificados ou criopreservados para transferência direta** Perla Dagher Cassoli Fleury; Bruno Valente Sanches; Bruna Lopes Cardoso; Andrea Cristina Basso; Daniel Robert Arnold; Juliana Hayashi Tannura; Marcos Henrique Colombo Pereira; Douglas Gaitkoski; Marcelo Marcondes Seneda	424
SBTE 293	**Comparação entre o uso dos diluidores bioxcel® e tolera-d® sobre a taxa de aproveitamento dos ejaculados de touros de diferentes raças** Anelise Ribeiro Peres; Erika Silva Carvalho Morani; Marcelo Roncoletta	425
SBTE 294	**Criopreservação de fibroblastos bovinos em palhetas após submissão á pressão negativa.** Luana Zanferari; Diana De Matia Liposki; Larissa G. Silva; Claudio F. Brogni; Joana Claudia Mezzalira; Lain Uriel Ohlweiler; Alceu Mezzalira	426
SBTE 295	**Dinâmica lipídica no desenvolvimento embrionário inicial de bovinos** Mateus José Sudano; Tatiana Silva Rascado; Alessandra Tata; Katia Roberta A. Belaz; Vanessa Gonçalves Santos; Roniele Santana Valente; Fernando Silveira Mesquita; Christina Ramires Ferreira; Marcos Nogueira Eberlin; Fernanda Cruz Landim Alvarenga	427
SBTE 296	**Efeito da adição de plasma seminal de reprodutores ovinos inteiros e vasectomizados ao sêmen após a coleta.** Thiago Antonio De Souza Nascimento Silva; Vladinis Oliveira Miranda; João Ricardo Scaliante; Mauricio Machaim Franco; Bianca Damiani Marques Silva; Alexandre Floriani Ramos; Jairo Pereira Neves	428
SBTE 297	**Efeito da adição de ácido linoléico conjugado ao meio de cultivo *in vitro* na viabilidade após a transferência dos embriões bovinos vitrificados** Ana Carolina Leite; Virgílio Barbosa Andrade; Eliane Beatriz Magalhães; Álan Maia Borges	429
SBTE 298	**Efeito da biópsia manual em embriões bovinos no sexto dia após a fecundação *in vitro*** Carolina Capobiango Romano Quintão; Eliza Diniz De Souza; Clara Slade Oliveira; Célio Freitas; Juliane Ariane Da Silva Oliveira; Luiz Sérgio De Almeida Camargo	430
SBTE 299	**Efeito da fonte proteica durante o cultivo na resposta de embriões bovinos produzidos *in vitro* ao congelamento lento** Severino Bernardino Sena Netto; José Felipe Warmling Sprícigo; Luiz Manoel Souza Simoes; Ligiane Oliveira Leme; Margot Alves Nunes Dode; Ivo Pivato	431
SBTE 300	**Efeito da suplementação com ácido linoléico (ômega 6) durante a produção *in vitro* de embriões bovinos sobre a modulação do teor intracitoplasmático de lipídios e resistência à criopreservação** Gisele Zoccal Mingoti; Melissa Meneghel; Priscila Chediek Dall Acqua; Marcela Ambrogi; Beatriz Caetano Da Silva Leão; Nathália Alves De Souza Rocha-Frigoni	432
SBTE 301	**Efeito de dois tratamentos de estimulação ovariana utilizando FSH sobre a dopplervelocimetria e diâmetro da artéria ovariana de caprinos** Samara Silva De Souza; Yara Pereira Diógenes; Maajid Hassan Bhat; Luciana Magalhães Melo; Vicente José De Figueirêdo Freitas; Dárcio Ítalo Alves Teixeira	433
SBTE 302	**Efeito do fator de crescimento de fibroblasto-10 durante a pré-MIV e MIV na qualidade de embriões bovinos PIV** Mateus Nunes Diógenes; Ana Luiza Silva Guimarães; Ligiane Oliveira Leme; Margot Alves Nunes Dode	434

SBTE 303	**Efeito do forskolin durante o cultivo *in vitro* sobre a modulação do teor intracitoplasmático de lipídios e resistência de embriões bovinos à criopreservação** Melissa Meneghel; Priscila Chediek Dall Acqua; Marcela Ambrogi; Beatriz Caetano Da Silva Leão; Nathália Alves De Souza Rocha-Frigoni; Gisele Zoccal Mingoti; Marcos Antônio De Achilles	435
SBTE 304	**Efeito do uso de moduladores de AMPc durante a maturação oocitária *in vitro* sobre a maturação nuclear e integridade do citoesqueleto de oócitos bovinos vitrificados** Clara Ana Santos Monteiro; Gabriela Ramos Leal; Helena Fabiana Reis De Almeida Saraiva; Agostinho Jorge Dos Reis Camargo; André Luís Rios Rodrigues; Raquel Varella Serapião; Luiz Altamiro Garcia Nogueira; Luiz Sérgio De Almeida Camargo; Joaquim Mansano Garcia; Clara Slade Oliveira	436
SBTE 305	**Interferência da via GMPc sobre a expressão de transcritos relacionados com metabolismo lipídico de oócitos bovinos maturados *in vitro*** Katia Lancellotti Schwarz; Ramon Cesar Botigelli; Fernanda Cavallari Castro; Hugo Fernandes; Cláudia Lima Verde Leal	437
SBTE 306	**Isolamento de células somáticas derivadas de tecido auricular de catetos (*Pecari tajacu linnaeus,* 1758) submetido a distintas técnicas de vitrificação** Alana Azevedo Borges; Luiza Bento De Queiroz Neta; Maria Valéria De Oliveira Santos; Magda Lorena Turbano Dos Santos; Gabriela Liberalino Lima; Moacir Franco Oliveira; Alexandre Rodrigues Silva; Alexsandra Fernandes Pereira	438
SBTE 307	**Padrões globais de metilação e hidroximetilação de DNA em tecidos bovinos** Anelise Dos Santos Mendonça; Thiago Felipe Braga; Eduardo Melo; Margot Alves Nunes Dode; Mauricio Machaim Franco	439
SBTE 308	**Preservação em curto prazo de COC bovino durante a estação chuvosa de araguaína -TO: efeito da temperatura e do tempo.** Ana Caroline Ongaratto Custódio; Marcio Teixeira Guimaraes; Bergson Pereira Lima; Hugo Machado Ribeiro; Gisele Priscila Nascimento Da Silva; Francisca Elda Ferreira Dias; Tania Vasconcelos Cavalcante; Ana Kelen Felipe Lima	440
SBTE 309	**Produção de embriões bovinos por transferência de placa metafásica** Felippe Manoel Costa Caixeta; José Felipe Warmling Sprícigo; Regivaldo Vieira De Sousa; Ivo Pivato; Margot Alves Nunes Dode	441
SBTE 310	**Resposta de embriões suínos das raças piau e moura à vitrificação por cryotop** Ligiane Oliveira Leme; José Felipe Warmling Sprícigo; Mateus Nunes Diógenes; Priscilla Cristine Passoni Silva; Mauricio Machaim Franco; Alexandre Floriani Ramos; Margot Alves Nunes Dode	442
SBTE 311	**Uso de etilenoglicol monometil éter como crioprotetor na vitrificação de embriões bovinos produzidos *in vitro*** Elisangela Mirapalheta Madeira; Bruna Mion; Janaina Fadrique Da Silva; Ligia Margareth Cantarelli Pegoraro; Arnaldo Diniz Vieira; Thomaz Lucia Jr	443
SBTE 312	**Uso de microfluídica na análise do perfil de genes relacionados à qualidade de embriões provenientes de vacas nelore superestimuladas com P36 ou P36/eCG** Patrícia Kubo Fontes; Eduardo Montanari Razza; Anthony César Souza Castilho; Ronaldo Luiz Ereno; Rafael Augusto Satrapa; Marcelo Fabio Gouveia Nogueira; Ciro Moraes Barros	444
SBTE 313	**Vitrificação de complexos cumulus-oócito imaturos bovinos: efeitos sobre o desenvolvimento embrionário e lamina nuclear** Dowglish Ferreira Chaves; Emilie Corbin; Carmen Almiñana; Yann Locatelli; Joanna Maria Gonçalves De Souza Fabjan; Maajid Hassan Bhat; Vicente José De Figueirêdo Freitas; Pascal Mermillod	445

Citometria de fluxo multiparamétrica: uma ferramenta relevante para a avaliação da função espermática

F.J. Peña[1]

Laboratory of Equine Reproduction and Spermatology, Veterinary Teaching Hospital, University of Extremadura, Cáceres, Spain.

.

Resumo

Atualmente na andrologia animal e humana, a citometria de fluxo é reconhecida como uma ferramenta robusta para a avaliação da qualidade e função do espermatozoide. No entanto, nesta área especificamente, esta técnica ainda não atinge a sofisticação de outras áreas da biologia e da medicina. Nos últimos anos, citômetros de fluxo mais sofisticados estão sendo introduzidos em laboratórios de andrologia, e o número de testes que podem ser potencialmente usados na avaliação da fisiologia espermática aumentou significativamente. Nesta revisão, recentes avanços na avaliação espermática serão discutidos, representando novas técnicas de citometria de fluxo, muitas delas capazes de medir simultaneamente, em um único teste, diferentes graus de danos em diversas regiões do espermatozoide e/ou alterações na sua funcionalidade.

Palavras chave: citometria de fluxo multiparamétrica, citometria de fluxo espermática

Introdução

O objetivo final da análise do sêmen é determinar a fertilidade de um touro. Dependendo do valor individual de cada animal, a análise do sêmen pode determinar se um macho é simplesmente eliminado como um doador de sêmen, ou se receberá tratamento para melhorar a sua fertilidade. Enquanto a prova definitiva de fertilidade de um macho for o nascimento de seus descendentes, serão necessários testes laboratoriais robustos. Testes para avaliar a fertilidade podem ser caros e demorados. Enquanto em espécies como suínos e bovinos estes testes podem ser relativamente fáceis de realizar, em outras espécies as análises podem ser muito mais complicadas. Compreender a função do espermatozoide é um pré-requisito absoluto para avaliação da fertilidade. Os espermatozoides são células totalmente diferenciadas, com funções que devem ser expressas em intervalos de tempo específicos, além de serem capazes de suportar mudanças dramáticas em seu ambiente durante sua jornada da cauda do epidídimo para a tuba uterina. Adicionalmente, devem ter a capacidade de responder prontamente a sinais específicos originados no trato reprodutivo feminino. Em uma importante publicação de Amann e Hammerstedt (1993), a complexidade da avaliação do espermatozoide foi claramente destacada, demonstrando a necessidade de avaliar as múltiplas funções e atributos que os mesmos devem cumprir para alcançar e fecundar um oócito. Mais recentemente, a descoberta da natureza heterogênea do ejaculado introduziu a necessidade de desenvolver métodos para identificar a população de espermatozoides férteis dentro de uma amostra. A avaliação espermática clássica, na maioria das vezes, contempla a avaliação de atributos individuais, ou seja, morfologia, número de espermatozoides, e a motilidade subjetiva. Desenvolvimentos mais recentes, como o CASA, avaliam parâmetros como as velocidades do espermatozoide, que dependerão da função correta de diferentes atributos, como fonte adequada de energia e vias metabólicas totalmente funcionais. No entanto, a avaliação de vários atributos em um único ou poucos testes ainda não é prática comum.

A citometria de fluxo na avaliação do espermatozoide

Um aspecto importante da avaliação do espermatozoide é a representatividade da amostra analisada com relação à totalidade do ejaculado. A este respeito, foi determinado que é preferível analisar milhares de espermatozoides, o que infelizmente não ocorre em análises convencionais, que geralmente avaliam algumas centenas de espermatozoides, e até mesmo análises mais elaboradas, envolvendo microscopia de fluorescência e análise de espermatozoide realizadas por computador. A citometria de fluxo foi introduzida na análise espermática no final dos anos 70 e início dos anos 80. Ao introduzir os termos “flow cytometry and sperm” (citometria de fluxo e sêmen) no PubMed (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed), a pesquisa retorna 1839 publicações, com os dois primeiros textos publicados em 1977 (van Dilla *et al.*, 1977) e 1978 (Meistrich *et al.*, 1978). A citometria de fluxo permite uma melhor representatividade da amostra analisada, pelo menos, numericamente, uma vez que com esta técnica é fácil avaliar milhares de espermatozoides em poucos segundos. Desde a utilização inicial da citometria de fluxo para a análise de DNA, métodos fluorescentes foram introduzidos na década de 90 para monitorar a integridade da membrana, e mais recentemente o potencial de membrana mitocondrial, ou o estresse oxidativo, a fluidez e permeabilidade da membrana plasmática, a peroxidação de lípidos, a fosforilação da tirosina de proteínas do espermatozoide, entre outros ensaios (Peña *et al.*, 2005b;. Peña, 2007; Ortega Ferrusola *et al.*, 2009a,b). Revisões recentes (Martinez Pastor *et al.*, 2010; Petrunkina e Harrison, 2011, 2013) têm abordado as técnicas de citometria de fluxo atualmente em uso na andrologia veterinária. Na presente revisão, vamos focar nas novas possibilidades que a citometria de fluxo oferece para a avaliação simultânea de diferentes regiões dos espermatozoides e suas funções.

Citometria de fluxo multiparamétrica

Abordagens analíticas multicores são amplamente utilizadas em diferentes campos da medicina e da biologia. A adaptação desses procedimentos para a

[1]Autor correspondente: fjuanpvega@unex.es

avaliação espermática permite que vários atributos possam ser avaliados nos espermatozoides individualmente e de forma rápida. Isto também introduz uma solução para um dos principais inconvenientes históricos da avaliação espermática: o fato dos testes não serem capazes de analisar vários atributos simultaneamente em uma mesma célula. Dois a três sistemas de lasers se tornaram mais acessíveis, e agora estão sendo implementados nos laboratórios de andrologia. Sendo assim, a seleção cuidadosa das sondas, a escolha de uma configuração correta e a compensação óptica multicor precisa, permitiria que esse sistema avaliasse simultaneamente todos os principais parâmetros espermáticos necessários para a fecundação (Petrunkina e Harrison, 2011). Um equipamento com três lasers de excitação foi recentemente incorporado ao laboratório do autor (MACSQuant Analyzer 10, Miltenyi, Biotech, Bergisch Gladbach, Alemanha). O equipamento em questão é um citômetro de fluxo compacto equipado com lasers violeta (comprimento de onda de excitação 405 nm), azul (comprimento de onda de excitação 488 nm) e vermelho (comprimento de onda de excitação 635 nm), 8 fotomultiplicadores, além de detectores de FSC e SCC. A excitação e a emissão de comprimentos de onda deste sistema permitem a utilização de combinações de sondas que podem avaliar simultaneamente vários parâmetros, em um grande número de espermatozoides (geralmente > 40.000). Dois painéis (e suas combinações) são rotineiramente utilizados em nosso laboratório para medir simultaneamente a integridade da membrana plasmática, alterações funcionais na permeabilidade da membrana, o potencial da membrana mitocondrial ou o estresse oxidativo, e ao mesmo tempo, facilmente suprimir os debris. Outros painéis são projetados para determinar simultaneamente a integridade da membrana plasmática, atividade das caspases e potencial da membrana mitocondrial ou estresse oxidativo. O primeiro painel envolve o uso de Hoechst 33342, iodeto de propídio, homodímero de etídio, YoPro-1, Mitotracker Deep Red ou reagente CellRox Deep Red. O Hoechst 33342 pode ser excitado com o laser violeta, já o YoPro-1 e homodímero de etídeo podem ser excitados com o laser azul, e o Mitotracker Deep Red pode ser excitado com o laser vermelho. A compensação correta para a sobreposição espectral é crítica em protocolos multicores e controles não corados e de cores únicas são obrigatórios. A primeira vantagem desta combinação de sondas é que as partículas que não são espermatozoide podem ser facilmente retiradas da análise. Somente partículas Hoechst 33342 positivas são considerados como espermatozoides, evitando erros inerentes às decisões baseadas em FSS e características SCC. Vários gráficos de pontos podem ser criados e um diagrama de pontos. A combinação de Hoechst 33342 com iodeto de propídio ou homodímero de etídio, podem ser usados para determinar a percentagem de espermatozoides vivos e mortos na amostra, sendo uma alternativa ao uso tradicional de SYBR-14/PI. Combinações de YoPro-1/PI e Hoechst 33342/YoPro-1 podem ser utilizadas para detectar alterações na permeabilidade da membrana. Essas variações podem estar relacionadas tanto a danos precoces do espermatozoide, quanto a alterações relacionadas à capacitação. Finalmente, o potencial de membrana mitocondrial é avaliado com Mitotracker Deep Red, e o estresse oxidativo avaliado com CellRox Deep Red. Módulos hierárquicos podem ser aplicados para determinar, por exemplo, fontes de espécies de oxigênio reativas (ROS) em populações específicas de espermatozoide. Um exemplo de um desses painéis é apresentado na Fig. 1.

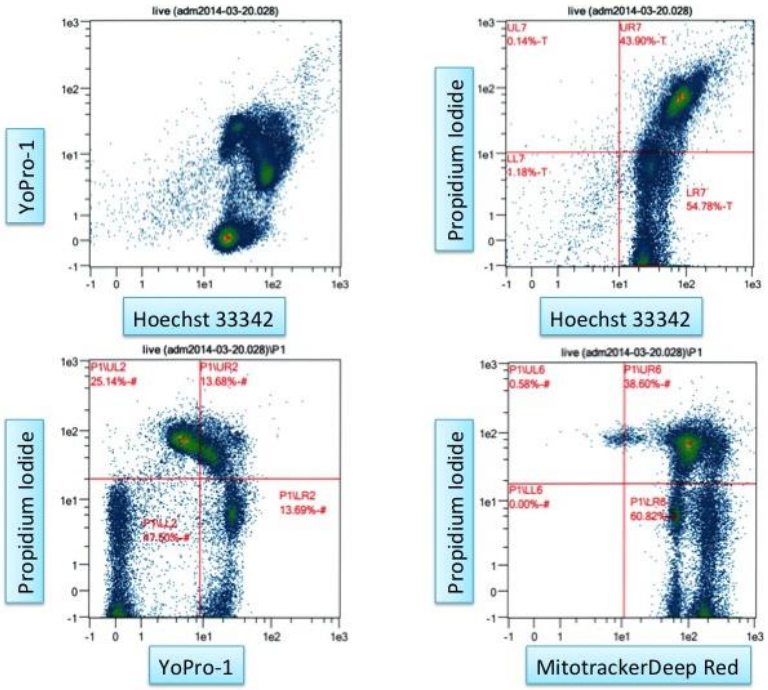

Figura 1. Exemplo de um painel multicor para avaliação simultânea de diferentes parâmetros do espermatozoide. Os espermatozoides são coradas com Hoechst 33342, YoPro-1, iodeto de propídio e Mitotracker Deep Red. Na informação do canto superior direito a percentagem de espermatozoides vivos é dada pela combinação de Hoechst 33342, que identifica as partículas que contém DNA (espermatozoides) e iodeto de propídio (PI) que cora apenas espermatozoides

mortos. As alterações na permeabilidade da membrana são detectadas com YoPro-1 combinado com PI ou Hoechst que permite detectar espermatozoides em uma fase precoce de desestabilização da membrana, e finalmente, a percentagem de espermatozoides que apresentam mitocôndrias ativas são detectadas usando Mitotracker Deep Red.

Marcadores adicionais podem ser incorporados a estes painéis, como por exemplo, anticorpos anti-fosfotirosina marcados especificamente com laranja de cromo ou laranja pacífico e a detecção no canal V2 (405/525-50) e/ou um sensor de cálcio amarelo (488/585-40) podem ser incorporados para detectar a capacitação espermática no canal B2.

Este painel representa apenas um exemplo das múltiplas combinações que a citometria de fluxo multiparamétrica apresenta. Combinações potenciais de fluoróforos e painéis têm sido publicados recentemente (Petrunkina e Harrison, 2013).

Corantes fixáveis (Fixable dyes)

Recentemente novos corantes fixáveis tornaram-se disponíveis no mercado (www.lifetechnologies.com). Estes corantes estão disponíveis em várias cores, permitindo facilmente experimentos multicores. Estes ensaios baseiam-se na reação de um corante fluorescente reativo com aminas celulares. O corante reativo pode permear as membranas comprometidas de células necróticas e reagir com as aminas livres no interior e sobre a superfície da célula, resultando em uma coloração de fluorescência intensa. Em contraste, apenas as aminas da superfície celular das células intactas estão disponíveis para reagir com o corante resultando uma coloração relativamente fraca.

A discriminação é completamente preservada seguindo a fixação da amostra por formaldeído em condições que inativam os agentes patogênicos. Além disso, estes ensaios utilizam apenas um canal do citômetro de fluxo, deixando os outros canais disponíveis para painéis multicores.

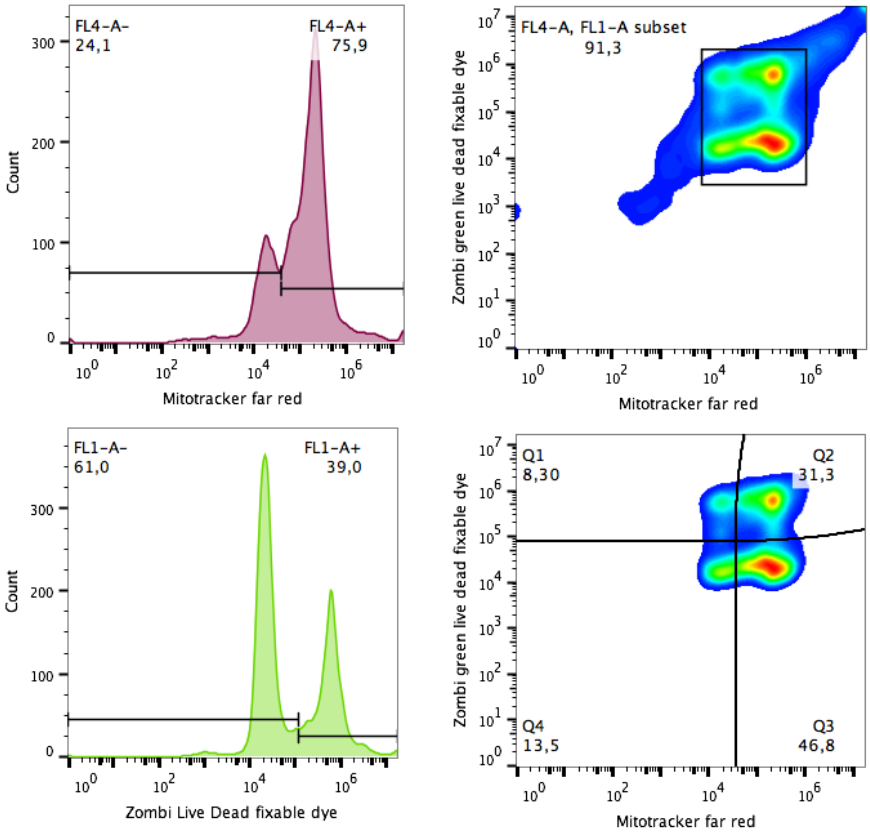

Figura 2. Exemplo de um protocolo de corante fixável. O espermatozoide é corado com corantes fixáveis Live Dead e MitoTracker Deep Red. Este ensaio permite determinar a subpopulação de espermatozoides vivos, com um elevado potencial de membrana mitocondrial, representado em Q2.

Separação de células; não só para a sexagem?

A teoria da existência de subpopulações de espermatozoides no ejaculado dos mamíferos está ganhando crescente força dentro da comunidade científica (Abaigar *et al.*, 1999, 2001; Quintero-Moreno *et al.*, 2003; Martinez *et al.*, 2006). O ejaculado de mamíferos é um grupo heterogêneo de diferentes subpopulações de espermatozoides, com diferentes respostas a estímulos fisiológicos ou biotecnológicos (Abaigar *et al.*, 1999; Martinez-Pastor, *et al.*, 2005), padrões de motilidade (Quintero-Moreno *et al.*, 2003, 2004; Ortega-Ferrusola, *et al.*, 2009c) e até mesmo diferentes características morfométricas (Thurston *et al.*, 2001; Nunez-Martinez *et al.*, 2005, 2007; Pena, *et al.*, 2005a). Em muitas espécies

o sêmen é ejaculado em frações, onde os espermatozoides entram em contato com as secreções das glândulas acessórias dos machos, com quantidades variáveis de fluidos e, provavelmente proteínas, em cada fração (Rodriguez-Martinez *et al.*, 2008). Esta heterogeneidade da composição do plasma seminal afeta a função do espermatozoide, como foi demonstrado *in vitro* (Caballero *et al.*,2004; Rodriguez-Martinez *et al.*,2008; Saraiva *et al.*, 2009). No entanto uma vez que o sêmen é depositado no trato genital feminino, os espermatozoides perdem o contato com o plasma seminal, e são expostos a ambientes diferentes no trato reprodutivo. Utilizando a espécie suína como modelo, e realizando experimentos com inseminações heterospérmicas (Satake *et al.*, 2006), o papel da presença de subpopulações de espermatozoides na seleção espermática têm sido elucidada. Quando espermatozoides de dois ou mais varrões são misturados e as fêmeas inseminadas, as ninhadas resultantes produzem um maior número de leitões de um macho. A responsividade ao bicarbonato varia entre as subpopulações de espermatozoides entre machos e proteínas específicas na tuba uterina modulam essa resposta. Este mecanismo seleciona subpopulações de espermatozoides para alcançar o oócito a ser fecundado. Todas essas evidências científicas, fornecem uma explicação do porquê a correlação geral com a fertilidade é geralmente baixa quando testes laboratoriais da função do espermatozoide, que ignoram a estrutura da subpopulação, são realizadas (Rodriguez-Martinez, 2003; Holt and Van Look, 2004). Uma dos potenciais papéis desta estrutura de subpopulação, pode ser ajudar a subpopulação capaz de fecundar a evitar a resposta imune da fêmea, enquanto o foco do sistema imunológico é o espermatozoide que não fecundará. Pesquisas recentes sugerem que os espermatozoides que apresentam translocação da fosfatidilserina (PS) são preferencialmente fagocitados, desta forma espermatozoides intactos têm maiores possibilidades de atingir o oócito para fecundação. Com base no pressuposto da existência de um grupo específico de espermatozoides apitos à fecundar, estudos recentes têm tentado identificar essa subpopulação específica, e desenvolver técnicas para a sua seleção com base em citometria de fluxo (Sousa, *et al.*, 2011; Ribeiro, *et al.*, 2013). Sousa *et al.* (2011) utilizaram como critérios de classificação os espermatozoides que apresentavam mitocôndrias ativas, e descobriram que este critério definiu uma população mais funcional, com menores danos à cromatina e espermatozoides mais capazes de descondensar sua cromatina e participar do desenvolvimento embrionário precoce. Além disso, a separação de células por citometria de fluxo foi melhor do que o tradicional *swim up* para seleção de espermatozoides. Em outro experimento, Ribeiro *et al.* (2013) usou a coloração YoPro-1 como critério de classificação, e a subpopulação selecionada foram os espermatozoides YoPro-1 negativos. Utilizando essa abordagem, espermatozoides mortos e apoptóticos foram removidos, e em comparação com as técnicas de *swim-up* tradicionais, a população classificada como viável apresentou um número significativamente reduzido de espermatozoides com DNA fragmentado. Embora estas técnicas possam ser difíceis de implementar na produção animal, podem ser consideradas em casos de subfertilidade de animais de alto valor individual.

Conclusão

A citometria de fluxo tem sido utilizada para análise de espermatozoides desde o início dos anos 90, primeiro como uma ferramenta de pesquisa e mais tarde introduzida em grandes centros de inseminação artificial. Inicialmente a maioria dos citômetros de fluxo utilizava uma única fonte de excitação (normalmente um laser azul). Mais recentemente, equipamentos mais sofisticados tornaram-se disponíveis em laboratórios de andrologia veterinários, permitindo múltiplas fontes de excitação e detecção de um grande número de parâmetros. O desenvolvimento de ensaios que permitam avaliar simultaneamente várias regiões do espermatozoide e suas funções em um grande número de células, devem melhorar a avaliação espermática e estabelecer melhores correlações com a fertilidade a campo.

Agradecimentos

O autor recebeu apoio financeiro para os estudos relatados nesta revisão do Ministerio de Economía y Competitividad-FEDER em Madrid, Espanha, projeto número AGL 2013-43211-R, e Junta da Estremadura-FEDER, concede (GR 10010 e PCE1002).

Referências

Abaigar T, Holt WV, Harrison RA, del Barrio G. 1999. Sperm subpopulations in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. *Biol Reprod*, 60:32-41.

Abaigar T, Cano M, Pickard AR, Holt WV. 2001. Use of computer-assisted sperm motility assessment and multivariate pattern analysis to characterize ejaculate quality in Mohor gazelles (*Gazella dama mhorr*): effects of body weight, electroejaculation technique and short-term semen storage. *Reproduction*, 122:265-273.

Amann RP, Hammerstedt RH. 1993. In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. *J Androl*, 14:397-406.

Caballero I, Vazquez JM, Centurion F, Rodriguez-Martinez H, Parrilla I, Roca J, Cuello C, Martinez EA. 2004. Comparative effects of autologous and homologous seminal plasma on the viability of largely extended boar spermatozoa. *Reprod Domest Anim*, 39:370-375.

Holt WV, Van Look KJ. 2004. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. *Reproduction*, 127:527-535.

Martinez IN, Moran JM, Pena FJ. 2006. Two-step cluster procedure after principal component analysis identifies sperm subpopulations in canine ejaculates and its relation to cryoresistance. *J Androl*, 27:596-603.

Martinez-Pastor F, Garcia-Macias V, Alvarez M, Herraez P, Anel L, de Paz P. 2005. Sperm subpopulations in Iberian red deer epididymal sperm and their changes through the cryopreservation process. *Biol Reprod*, 72:316-327.

Martinez Pastor F, Mata Campuzano M, Alvarez Rodriguez M, Alvarez M, Anel L, de Paz P. 2010. Probes and techniques for sperm evaluation by flow cytometry. *Reprod Domest Anim*, 45(suppl. 2):67-78

Meistrich ML, Lake S, Steinmetz LL, Gledhill BL. 1978. Flow cytometry of DNA in mouse sperm and testis nuclei. *Mutat Res*, 49:383-396

Nunez-Martinez I, Moran JM, Pena FJ. 2005. Do computer-assisted, morphometric-derived sperm characteristics reflect DNA status in canine spermatozoa? *Reprod Domest Anim*, 40:537-543.

Nunez-Martinez I, Moran JM, Pena FJ. 2007. Sperm indexes obtained using computer-assisted morphometry provide a forecast of the freezability of canine sperm. *Int J Androl*, 30:182-189.

Ortega Ferrusola C, González Fernández L, García Macías B, Salazar Sandoval C, Morell JM, Rodríguez Martinez H, Tapia JA, Peña FJ. 2009a. Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C11, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa is stallion dependent and relates to "apoptosis like" changes. *Reproduction*, 138:55-63.

Ortega Ferrusola C, González Fernández L, García Macías B, Salazar Sandoval C, Morillo Rodríguez A, Rodríguez Martinez H, Tapia JA, Peña FJ. 2009b. Effect of cryopreservation on nitric oxide production in stallion spermatozoa. *Biol Reprod*, 81:1106-1111.

Ortega-Ferrusola C, Macias Garcia B, Suarez Rama V, Gallardo-Bolanos JM, Gonzalez-Fernandez L, Tapia JA, Rodríguez-Martinez H, Peña FJ. 2009c. Identification of sperm subpopulations in stallion ejaculates: changes after cryopreservation and comparison with traditional statistics. *Reprod Domest Anim*, 44:419-423.

Peña FJ, Saravia F, Garcia-Herreros M, Nunez-martinez I, Tapia JA, Johannisson A, Wallgren M, Rodríguez-Martínez H. 2005a. Identification of sperm morphometric subpopulations in two different portions of the boar ejaculate and its relation to postthaw quality. *J Androl*, 26:716-723.

Peña FJ, Saravia F, Johannison A, Wallgren M, Rodriguez Martinez H. 2005b. A new and simple method to evaluate early membrane changes in frozen-thawed boar spermatozoa. *Int J Androl*, 28:107-114.

Peña FJ. 2007. Detecting subtle changes in sperm membranes in veterinary andrology. *Asian J Androl*, 9:731-737.

Petrunkina AM, Harrison RAP. 2011. Cytometric solutions in veterinary andrology: developments advantages, and limitations. *Cytometry Part A*, 79A:338-348

Petrunkina AM, Harrison RAP. 2013. Fluorescence technologies for evaluating male gamete (dys) function. *Reprod Domest Anim*, 48 (suppl. 1):11-14

Quintero-Moreno A, Miro J, Teresa Rigau A, Rodriguez-Gil JE. 2003. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology*, 59:1973-1990.

Quintero-Moreno A, Rigau T, Rodriguez-Gil JE. 2004. Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. *Theriogenology*, 61:673-690.

Ribeiro SC, Sartorius G, Pletscher F, de Geyter M, Zhang H, de Geyter C. 2013. Isolation of spermatozoa with low levels of fragmented DNA with the use of flow cytometry and sorting. *Fertil Steril*, 100:686-694

Rodriguez-Martinez H. 2003. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? *Reprod Domest Anim*, 38:312-318.

Rodriguez-Martinez H, Saravia F, Wallgren M, Roca J, Pena FJ. 2008. Influence of seminal plasma on the kinematics of boar spermatozoa during freezing. *Theriogenology*,70:1242-1250.

Saravia F, Wallgren M, Johannisson A, Calvete JJ, Sanz L, Pena FJ, Roca J, Rodríguez-Martínez H. 2009. Exposure to the seminal plasma of different portions of the boar ejaculate modulates the survival of spermatozoa cryopreserved in MiniFlatPacks. *Theriogenology*, 71:662-675.

Satake N, Elliott RM, Watson PF, Holt WV. 2006. Sperm selection and competition in pigs may be mediated by the differential motility activation and suppression of sperm subpopulations within the oviduct. *J Exp Biol*, 209:1560-1572.

Sousa AP, Amaral A, Baptista M, Tavares R, Caballero Campo P, Caballero Peregrín P, Freitas A, Paiva, Almeida Santos T, Ramalho Santos J. 2011. Not all sperm are equal; functional mitochondria characterize a subpopulation of human sperm with better fertilization potential. *Plos One*, 6:e18112

Thurston LM, Watson PF, Mileham AJ, Holt WV. 2001. Morphologically distinct sperm subpopulations defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. *J Androl*, 22:382-394.

van Dilla MA, Gledhill BL, Lake S, Dean PN, Gray JW, Kachel V, Barlogie B, Göhde W. 1977. Measurement of mammalian sperm deoxyribonucleic acid by flow cytoemetry. Problems and approaches. *J Histochem Cytochem*, 25:763-773

.

Status da produção de embriões no mundo

P. Blondin[1]

Boviteq, St-Hyacinthe, Quebec, Canada..

Resumo

No século passado, a introdução de biotécnicas reprodutivas inovadoras na pecuária permitiu que esse setor crescesse significativamente. No início do século 20, a introdução da criopreservação de sêmen e inseminação artificial impulsionou a pecuária mundial com a possibilidade de importar e exportar genética de diferentes espécies com biossegurança. E, então com o desenvolvimento da transferência de embriões, foi possível importar e exportar através da disseminação de embriões congelados de maneira biossegura, não só a metade do componente genético. Mais tarde, a introdução da ultrassonografia (que permitiu a coleta transvaginal de ovócitos) e a fecundação *in vitro* (FIV) revolucionaram a velocidade com gerações de embriões pudessem ser produzidos, encurtando assim o intervalo entre geneticamente importantes para os criadores. Finalmente, a introdução da genômica revolucionou novamente a precisão e a velocidade com que os criadores identificam uma genética desejada. A indústria bovina é um exemplo de nicho que se beneficiou com o desenvolvimento destas tecnologias. Nos últimos 15 anos, a produção de embriões FIV aumentou significativamente ano após ano, com um recorde histórico em que 42% do total de embriões produzidos em 2013 eram originados da FIV. Existem várias razões pelas quais a FIV está sendo usada cada vez mais na indústria de transferência de embriões: os meios de cultivo *in vitro* melhoraram significativamente; a introdução de sêmen sexado para a FIV permite que criadores obtenham mais de 90% de embriões do sexo desejado; e o intervalo de gerações foi significativamente reduzido com a identificação mais rápida dos próximos animais de genética de elite com a utilização de tecnologias genômicas. A incorporação de novas tecnologias, como a FIV, em suas atividades beneficiará a comunidade agrícola internacional. É importante que as sociedades internacionais como a SBTE e a IETS continuem a apoiar os cientistas e os principais agentes envolvidos nessa área para desenvolver estas tecnologias.

Palavras-chave genômica, fercundação *in vitro*, FIV, sêmen sexado.

Mini-Revisão

Nos s últimos 80 anos foram vistas grandes inovações na área das Tecnologias de Reprodução Assistida (TRAs). A introdução de TRAs inovadoras ao longo da história tornou os produtores e suas empresas de produção animal mais eficientes e mais rentáveis. Entre os anos 1930 e 1960, a agropecuária viu a introdução de grandes inovações, tais como a inseminação artificial, a criopreservação de sêmen, a sincronização de estro e transferência de embriões (TE). Apenas a partir de 1980 e 1990 que assistimos a próxima geração de biotecnologias que revolucionaram o mundo da TE – a ultrassonografia, o congelamento e sexagem de embriões, fecundação *in vitro* (FIV), clonagem e sexagem de sêmen. Finalmente, no século 21, assistimos mais uma inovação que revolucionou o negócio agrícola – a genômica.

Como Presidente da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS), eu tenho a oportunidade de trocar informações com muitos colegas da área da TE. O Comitê de Recuperação de dados da IETS, presidido pelo Dr. George Perry, é composto por um grupo de indivíduos de todo o mundo que coleta e apresenta dados mundiais das atividades relacionadas com as tecnologias de TE em animais de produção. O relatório mais recente pode ser encontrado no informativo da IETS de Março de 2015 (Perry, 2015). É importante notar que os dados apresentados neste relatório são tão válidos quanto o número de países que têm participado. Em 2013, apenas 40 países ofereceram dados de embriões. Entretanto, o relatório ainda fornece uma boa representação da produção mundial de embriões.

Os sistemas de produção de bovinos continuam a ser o nicho que usa TRAs extensivamente para propagar genética. A Figura 1 ilustra a evolução da produção de embriões bovinos produzidos *in vivo* e *in vitro* entre 1997 e 2013. Nesta figura, é evidente que a produção *in vivo* de embriões aumentou significativamente entre 1997 e 2005. Depois, em 2006, a produção de embriões *in vivo* estabilizou e parece diminuir ligeiramente nos anos seguintes até 2013. Por outro lado, embora pouco empregada no final de 1990, a produção de embriões FIV aumentou significativamente ano após ano, com a maior alta de todos os tempos, de mais de meio milhão de embriões FIV produzidos em 2013, o que representa 42% do total de embriões produzidos no ano (Fig. 1). É importante notar que, em 2013, a América do Sul sozinha produziu 73% dos embriões, enquanto a América do Norte produziu 22% destes embriões. Curiosamente, dos embriões de FIV transferidos na América do Norte, cerca de 20% são congelados, enquanto que apenas 5% dos embriões de FIV transferidos na América do Sul são congelados.

Existem várias razões pelas quais a FIV foi sendo cada vez mais utilizada nos últimos cinco anos na indústria de TE. Os meios de cultivo *in vitro* melhoraram significativamente nos últimos 15 anos. A migração de um sistema *1-step* que usa suplementação com soro e/ou co-cultivo de células para um sitema de meios sequenciais definidos ou semi-definidos resultando na produção de embriões de qualidade superior, semelhante aos embriões produzido *in vivo*. Os sistemas de FIV utilizados anteriormente produziam embriões menos tolerantes ao congelamento lento convencional (Abe *et al*., 2002) e, bezerros que apresentavam a síndromedo bezerro grande (Farin *et al*., 2006). O uso de Meios de FIV definidos,

Autor para correspondência: blondinpa@boviteq.com

resultaram em embriões que sobrevivem a protocolos de congelamento lento tornando possível a aplicação da técnica de Transferência Direta (TD) assim como ocorre em embriões produzidos *in vivo*. Uma vez que a TD de embriões congelados é uma técnica utilizada em todo o mundo, abrem-se oportunidades para exportar embriões FIV com a mesma facilidade que se exporta embriões *in vivo*. Embora a importação/exportação de embriões de FIV congelados ainda seja limitada, diferentes agentes do setor privado, das universidades, ou do governo, estão trabalhando com as agências reguladoras apropriadas para abrir estes mercados e atender a demanda mundial por genética bovina.

- A introdução do uso de sêmen sexado na FIV (Garner e Seidel, 2008) gerou novo apelo para esta tecnologia de reprodução assistida. A FIV continua sendo uma tecnologia cara com custos fixos, que podem resultar em um custo mais elevado por embrião quando comparado aos convencionais produzidos *in vivo*. Produzindo mais de 90% de embriões do sexo feminino para os produtores de leite, a FIV com semen sexado proporciona um valor agregado, o que faz com que tenha mais apelo mesmo apresentando um custo mais alto por embrião. O mercado de carne bovina pode usar sêmen sexado macho e produzir mais de 90% de embriões do sexo masculino. Além disso, foi desenvolvimendo o método de sexagem reversa , que consiste em descongelar algumas palhetas de sêmen convencional não-sexado, sexar o sêmen após o descongelamento e usar o sêmen sexado fresco imediatamente na FIV (Morottia *et al*., 2014). Desta forma, os clientes podem sexar quase todo o sêmen congelado disponível no mercado.
- A genômica mudou a indústria da genética bovina (Shojaei Saadi *et al*., 2014). O intervalo de gerações foi significativamente reduzido com a identificação dos próximos animais com genética de elite do sexo masculino e feminino, com a utilização das tecnologias genômicas. Sendo assim, o intervalo de tempo que um produtor tem para lucrar com a nova genética que nasceu em sua fazenda é mais curto. Assim, qualquer técnica de reprodução assistida que pode produzir muitos embriões em um curto período de tempo se torna muito interessante e rentável. Uma das principais vantagens da FIV é que em de um período de 40 a 60 dias,o produtor poderia realizar uma coleta de embriões pelo método convencional contra quatro ciclos de FIV utilizando doadoras superovuladas. Assim, o ganho em maior número de embriões por período de tempo, torna-se significativamente vantajoso quando a FIV é utilizada.

Em conclusão, uma vez que os cientistas em todo o mundo reconhecem os desafios que enfrentamos para alimentar a crescente população mundial, a comunidade agrícola internacional se beneficiará por integrar novas tecnologias em seus sistemas de produção para assegurar a sustentabilidade dos animais de produção e da demanda global de carne. A FIV parece ser uma dessas inovações importantes que irá garantir o comércio de genética de várias espécies em todo o globo. É importante que as sociedades tais como a SBTE e a IETS continuem a apoiar os pesquisadores e os agentes envolvidos nessa área para desenvolver e promover as diferentes TRAs desenvolvidas por nossos pares.

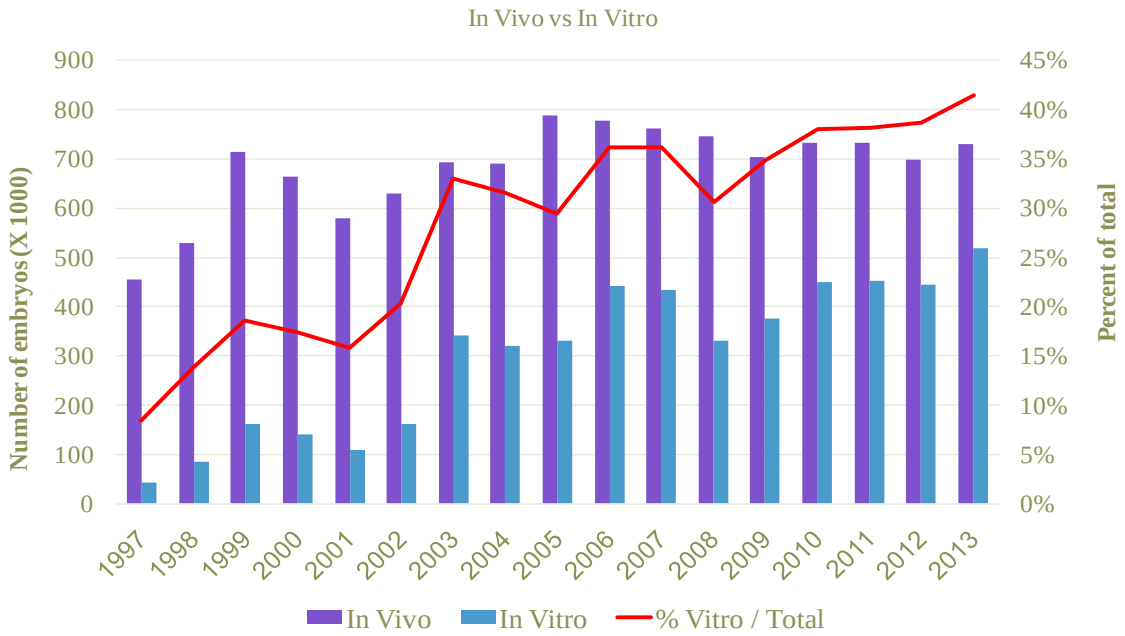

Figura 1. Produção mundial de embriões bovinos produzidos *in vivo* e *in vitro* entre 1997 e 2013.

Referências

Abe H, Yamashita S, Satoh T, Hoshi H. 2002. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Mol Reprod Dev*, 61:57-66.

Farin PW, Piedrahita JA, Farin CE. 2006. Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology*, 65:178-191.

Garner DL, Seidel GE Jr. 2008. History of commercializing sexed semen for cattle. *Theriogenology*, 69:886-895.

Morottia F, Sanchesb BV, Pontes JHF, Bassob AC,

Siqueirab ER, Lisboaa LA, Seneda MM. 2014. Pregnancy rate and birth rate of calves from a large-scale IVF program using reverse-sorted semen in Bos indicus, *Bos indicus-taurus*, and *Bos taurus* cattle. *Theriogenology*, 81:696-701.

Perry G. 2015. 2013 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. *Embryo Transfer Newslett*, 33:14-26.

Shojaei Saadi HA, Vigneault C, Sargolzaei M, Gagné D, Fournier E, de Montera B, Chesnais J, Blondin P, Robert C. 2014. Impact of whole-genome amplification on the reliability of pre-transfer cattle embryo breeding value estimates. *BMC Genomics*, 15:889.

Novos aspectos da fisiologia espermática e interações entre espermatozoides e oócitos

F.J. Peña[1]

Laboratory of Equine Reproduction and Spermatology, Veterinary Teaching Hospital,
University of Extremadura, Cáceres, Spain.

Resumo

Recentes aspectos da biologia do espermatozoide que facilmente impactam a medicina reprodutiva e a biotecnologia são brevemente revisadas neste trabalho. Serão revidadas o novo conceito da homeostase das espécies reativas de oxigênio (ROS) e suas implicações sobre as funções espermáticas, a heterogeneicidade do ejaculado e a informação epigenética. Além disso, o conceito de senescência espermática será discutida como alguns aspectos da interação oócito-espermatozóide.

Palavras chave: CASA, ROS, sêmen, subpopulações.

Introdução

Nos últimos anos, o conhecimento da biologia espermática tem aumentado exponencialmente, e novas descobertas na biologia do espermatozoide estão impactando a medicina reprodutiva e tecnologia em animais e humanos. Neste trabalho, serão discutidos aspectos da biologia espermática que têm sido objeto de pesquisa nos últimos anos no laboratório do autor.

O espermatozóide, uma célula regulada por redox

Espécies reativas de oxigênio são subprodutos de vários processos metabólicos, sendo atualmente reconhecidos como importantes reguladores de muitas funções celulares (Stowe e Camara, 2009). A mitocôndria é considerada como a principal fonte das espécies reativas de oxigênio na maioria das células. Superóxidos ($O_2\bullet^-$) podem ser gerados em diferentes pontos dentro da cadeia de transporte de elétrons, espontaneamente por redução univalente do oxigênio, ou catalisados enzimaticamente para H_2O_2. A maioria dos superóxidos são convertidos em H_2O_2 pela superóxido dismutase dentro e fora da matriz mitocondrial, sendo que em quantidades baixas e controladas, exercem importantes funções reguladoreas da célula. O excesso de H_2O_2 pode combinar com Fe^{2+} para formar espécies reativas ferris. Na presença de óxido nítrico (NO •), $O_2\bullet^-$ forma o peroxinitrito (ONOO •) e o ONOOH induz a nitrosilação de proteínas, DNA e lipídios modificando sua estrutura e função (Stowe e Camara, 2009). Numerosos estudos indicam que as ROS são reguladoras importantes da função do espermática (de Lamirande e Gagnon, 1993, 2002, 2003; Zini *et al.*, 1995; de Lamirande *et al.*, 1997, de Lamirande e Lamothe, 2009). Um aspecto importante, por vezes negligenciado, é o tipo, origem e o principal papel de diferentes ROS, que podem ser formados durante o metabolismo do espermatozoide. Superóxidos têm vida curta ($t_{1/2}$ 1ms) e são impermeáveis à célula, enquanto o H_2O_2 é mais estável e permeável nas células. O óxido nítrico (NO •) é sintetizado através da conversão da L-arginina em L-citrulina pela óxido nítrico sintase (NOS). Estas enzimas estão presentes nos espermatozoides de equinos, possivelmente como isoformas específicas do espermatozoide (Ortega Ferrusola *et al.*, 2009a). Além disso, evidência recente sugere que as mitocôndrias do espermatozoide do garanhão produzem quantidades significativas de NO (Ortega Ferrusola *et al.*, 2009a). O óxido nítrico tem uma meia-vida relativamente longa (1 s) e é mais reativo do que o $O_2\bullet^-$. Estes compostos, quando produzidos de forma controlada, são considerados como moléculas sinalizadoras envolvidas em várias funções do espermatozoide. Outras moléculas, tais como o radical hidroxila (•OH), o anion hidroxil peroxinitrito (ONOO) e peróxidos de lípidos são consideradas mais tóxicas para os espermatozoides, e com menos funções reguladoras. Funções que se acreditam ser redox reguladas nos espermatozoides, incluem a ativação e padrão de motilidade hiperativada, quimiotaxia, capacitação e a reação acrossômica. O controle da produção de ROS, ocorre durante a capacitação dos espermatozoides (Agarwal *et al.*, 2014), e desencadeia vias de sinalização iniciadas por um aumento na adenosina 3'-5' monofosfato cíclico - cAMP. O aumento do cAMP ativa a proteína quinase A (PKA) e a subsequente fosforilação de proteínas quinases reguladas extracelularmente, o que induz a fosforilação das tirosinas das proteínas da bainha fibrosa dos espermatozoides, ocasionando a sua hiperativação. A reação acrossômica e fusão oócito com o espermatozoide também dependem das vias celulares ativadas pelo ROS.

Espermatozóide, não só DNA

O genoma do sespermatozoide deve estar intacto para participar do desenvolvimento do embrião. No entanto, ele é susceptível a lesões oxidativas do DNA, sendo importante determinar se ele permanece intacto quando o espermatozoide é manipulado e criopreservado. Além disso, o espermatozoide também contém uma série de pequenos RNAs reguladores não codificantes (ncRNA) que contêm de 19 a 22 nucleótidos. Estes microRNA (miRNAs) encontram-se tanto no plasma seminal quanto nos espermatozoides. Os miRNAs são a chave da expressão gênica. Eles agem epigeneticamente e desempenham um importante papel como modificadores pós-transcricionais na aquisição e manutenção da fertilidade. Eles são abundantes em espermatozoides de touros e apresentam-se diferencialmente expressos em reprodutores com diferentes níveis de fertilidade. Eles são introduzidos no oócito durante a fecundação e modulam as primeiras divisões da clivagem (Kleene *et al.*, 2010).

Autor correspondente: fjuanpvega@ unex.es

O ejaculado de mamíferos é composto por diferentes subpopulações de espermatozoides

Existe um consenso crescente na comunidade científica sobre a existência de subpopulações de espermatozoides no ejaculado dos mamíferos (Abaigar *et al.*, 1999). Ao invés de uma população homogênea, em que todos os espermatozoides apresentam o mesmo comportamento, o ejaculado de mamíferos é um grupo heterogêneo de diferentes subpopulações de espermatozoides, apresentando diferentes respostas a estímulos fisiológicos ou biotecnológicos, padrões de motilidade e até mesmo diferentes características morfométricas. Ao longo dos anos o ejaculado tem sido considerado e analisado como uma amostra individual, e os espermatozoides considerados como um únic tipo de população. Entretanto, nos últimos anos, a natureza complexa do ejaculado de mamíferos está sendo revelada (Abaigar *et al.*, 2001; Nunez-Martinez *et al.*, 2007). Em muitas espécies, o sêmen é ejaculado em frações, onde os espermatozóides entram em contato com as secreções das glândulas acessórias dos machos, com quantidades variáveis de fluido, e provavelmente proteínas, em cada fração (Rodriguez-Martinez *et al.*, 2009). A heterogeneidade da composição do plasma seminal pode afetar grandemente a função do espermatozoide, como foi demonstrado *in vitro*. No entanto uma vez que o ejaculado é depositado no trato genital feminino, os espermatozoides perdem o contato com o plasma seminal, e são expostos a ambientes diferentes no trato reprodutivo. Utilizando a espécie suína como modelo, em experimentos com inseminações heterospérmica (Satake *et al.*, 2006), o papel da presença de subpopulações de espermatozoide na seleção espermática, têm sido elucidada. Quando espermatozoides de dois ou mais varrões são misturados e as fêmeas inseminadas, os produtos nascidos são provenientes de na maioria de um macho. A responsividade ao bicarbonato varia entre as subpopulações de espermatozoides entre machos e proteínas específicas do oviduto modulam essa resposta. Este mecanismo seleciona subpopulações de espermatozoides para alcançar o oócito para a fecundação. Todas essas evidências científicas fornecem uma explicação do porquê a correlação geral com a fertilidade é geralmente baixa, quando testes laboratoriais da função do espematozoide que ignoram a estrutura da subpopulação, são realizadas.

Cinética de subpopulações

A motilidade espermática é mensurada para proporcionar informações sobre a suposta fertilidade de um indivíduo e/ou para avaliar a viabilidade de uma amostra de sêmen após diluiçãoou criopreservação. Nestas situações, a motilidade deve ser considerada de três formas: 1) a porcentagem de células que apresentam movimento, 2) as características do movimento e, 3) a velocidade do movimento. Embora a avaliação da motilidade espermática seja normalmente uma das primeiras etapas do espermiograma (Rodriguez-Martinez, 2003), a quantidade de informações preditivas dadas, mesmo através de sistemas computadorizados, tem sido escassas e pouco conclusivas. Apesar disso, evidências recentes sugerem que a falha no valor preditivo da motilidade esta relacionada ao uso da informação dada e não no valor intrínseco da própria motilidade (Holt *et al.*, 2007). Uma das razões para a falta de poder dos parâmetros convencionais é a heterogeneidade inerente ao sêmen de mamíferos, um dos fluidos biológicos mais variáveis. A motilidade espermática é o indicador mais utilizado de qualidade do sêmen, no entanto, este parâmetro é dependente de um grande número de fatores e, geralmente, a sua estimativa é em grande parte subjetiva. Além disso, a motilidade dos espermatozoides é avaliada *in vitro*, o que pode não refletir em nada o comportamento dos espermatozoides durante o processo de fecundação. O fato é que nos mamíferos a interpretação da motilidade de espermatozoides é um fenômeno extremamente complexo, uma vez que estes são expostos a ambientes muito diferentes, com capacidade para modificar vias de sinalização celular, tanto no trato genital dos machos quanto no das fêmeas. Além disso, a maior parte do processo de transporte de espermatozoides é mediada pelo trato genital das fêmeas, e não pela motilidade dos espermatozoides. Durante o transporte do sêmen, os espermatozóides são selecionados. No coito, bilhões de espermatozoides são depositados no trato genital feminino, mas apenas alguns milhares (aqueles de melhor qualidade) chegam à junção úterotubarica.

Morfometria das Subpopulações

A maioria dos estudos sobre subpopulações de espermatozoides foram realizados utilizando parâmetros da cinética de movimento dos espermatozoides, entretanto, algumas pesquisas têm sido feitas usando morfometria computadorizada. Nos laboratórios dos autores, a estrutura morfométrica da subpopulação espermática foi estudada usando caninos, equinos e suínos como modelos. Além disso, a estrutura da subpopulação de espermatozoides de ruminantes selvagens também foi descrita. Estudos em varrões, por meio de análise de componentes principais (PCA), agrupamentos e análise discriminante foram desenvolvidos para identificar subpopulações morfométricas de espermatozoides em porções bem definidas do ejaculado fresco de suínos. Em um estudo, usando suínos como modelo (Saravia *et al.*, 2007), diferentes subpopulações de espermatozoides morfologicamente normais foram descobertas com base no tamanho da cabeça e outros parâmetros morfológicos como a regularidade da forma da cabeça.

Espermatozoides estão presentes no ejaculado em diferentes estados fisiológicos

Os espermatozoides são eliminados na ejaculação juntamente com as secreções das glândulas acessórias do macho. Em espécies como suínos, equinos e caninos, a ejaculação é eliminada em diferentes jatos, compostos por diferentes subconjuntos de secreções das glândulas acessórias. Entretanto, ainda não esta bem determidado se isso modifica ou não a fisiologia espermática, mas o fato é que nem todos os espermatozoides de um determinado ejaculado estão no mesmo estado fisiológico. Estudos em suínos demonstram que os espermatozoides presentes nos primeiros 10 ml da

fração rica do sêmen têm diferentes padrões de motilidade, estados de capacitação, e até mesmo tamanhos diferentes. Estes espermatozoides também são os primeiros a colonizar o reservatório espermático na tuba uterina. Estudos em equinos demonstram que uma significativa subpopulação de espermatozoides presentes no ejaculado é ativado e passa por um processo de apoptose logo após a ejaculação (Ortega Ferrusola *et al.*, 2008). Estes espermatozoides provavelmente não serão capazes de fecundar um oócito, o que fornece uma explicação fisiológica para esse fenômeno. O destino da maioria dos espermatozoides do ejaculado é ser removido do trato genital da fêmea, devido ao refluxo do sêmen após a cópula, ou pela sua fagocitose no interior do útero da fêmea. Apenas alguns milhares de espermatozoides colonizam o reservatório espermático na junção útero-tubária. Isto significa que a perda de espermatozoides por refluxo e fagocitose é uma parte do processo de seleção espermática. Acredita-se que a natureza heterogênea do ejaculado está envolvida nesta seleção. Na verdade, embora tenha sido demonstrado em todas as espécies, que espermatozoides que apresentam externalização da fosfatidilserina (PS) são fagocitados, isto ocorre preferencialmente em humanos. Os espermatozoides que apresentam externalização da PS podem ser considerados como prematuramente ativados, provavelmente atuando como uma barreira contra os macrófagos do trato reprodutivo das fêmeas, protegendo assim, outros espermatozoides. Na espécie suína, a proporção de espermatozoides com externalização da PS varia entre frações do ejaculado (Pena *et al.*, 2003). Em garanhões, o sêmen fresco apresenta uma alta porcentagem de espermatozoides mostrando atividade caspase positiva, incluindo pró-caspases e as caspases 3, 7 e 9 (Ortega Ferrusola *et al.*, 2008). Estes resultados evidenciam que os espermatozoides presentes no ejaculado estão em diferentes estados fisiológicos na ejaculação, e esta heterogeneidade pode ser relacionada com a seleção do espermatozoide dentro do trato reprodutivo da fêmea.

Nascidos para morrer; restou apenas um. As mitocôndrias controlam o tempo de vida dos espermatozoides ejaculados?

Embora a morte de espermatozoides após a ejaculação seja devida à depleção de ATP, outras formas de morte espermática são descritas. Tanto os "eventos apoptóticos" (Aitken *et al.*, 2012a, b; Bolanos Gallardo *et al.*, 2014), quanto mecanismos de "autofagia" podem estar envolvidos na morte do spermatozoide após a ejaculação (Bolanos Gallardo *et al.*, 2012; Bolanos *et al.*, 2014). Curiosamente, diferentes subpopulações de espermatozoides estão em estágios mais avançados de senescência e podem morrer em diferentes intervalos após a ejaculação (Auger *et al.*, 1993; Barroso *et al.*, 2006; Gallon *et al.*, 2006). Muitos espermatozoides com alterações apoptóticas aparecem no ejaculado, alterações tais como: translocação de fosfatidilserina (Pena *et al.*, 2003; Brum *et al.*, 2008; Martin et al, 2004), aumento da permeabilidade da membrana (Ortega Ferrusola *et al.*, 2009a), baixo potencial da membrana mitocondrial (da Silva *et al.*, 2011; Aitken *et al.*, 2012a; Garcia *et al.*, 2012), caspases ativadas (Caselles *et al.*, 2014; Bolanos Gallardo *et al.*, 2014) e a fragmentação do DNA (Smith *et al.*, 2013; Gillan *et al.*, 2005) têm sido caracterizadas no ejaculado. Embora o significado dessas mudanças ainda esteja em debate, alguns pontos de consenso estão sendo alcançados. Talvez, o aspecto mais importante seja que todos os espermatozoides são programados para morrer, e que apenas um espermatozoide atinge a imortalidade através de fecundação (Aitken e Koppers, 2011; Aitken *et al.*, 2012a). É importante ressaltar que muitas biotecnologias espermáticas aceleraram o processo de morte dos espermatozoides (Ortega-Ferrusola *et al.*, 2008; Balao da Silva *et al.*, 2013; Peña *et al.*, 2011; Petyim *et al.*, 2014). A morte dos espermatozoides parece ser dependente da ativação de uma cascata apoptótica intrínseca, originada na mitocôndria após uma produção desequilibrada de ROS mitocondrial (Aitken e Curry, 2011; Koppers *et al.*, 2008). Isto pode ocorrer após a exaustão das defesas antioxidantes intracelulares, em particular a glutationa intracelular. Embora esse mecanismo tenha sido descrito principalmente em humanos, evidências sugerem que um processo semelhante ocorre em garanhões, principalmente durante os processos de preservação do espermatozoide (Ortega-Ferrusola *et al.*, 2008, 2009b). A manutenção da viabilidade do espermatozoide depende do estado de fosforilação de proteínas específicas pró-sobrevivênci. Uma destas é a Akt, que é ativada através da fosforilação da treonina-308 ou serina-473 (Alessi *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 2005). Após a fosforilação, as funções da Akt são controladas através da fosforilação e inibição da Bad (serina-136) ou da caspase-9 (Cardone *et al.*, 1998). A Bad pró-apoptótica é um membro da família do Bcl, que promove a morte celular por dimerização com Bcl-2 ou Bcl-X_L (Yang *et al.*, 1995). A fosforilação da Bad em quatro resíduos de serinas diferentes (serina-112, -136, -155, ou -170) tem sido caracterizada como Bad inativada (Datta *et al.*, 1997; Lizcano *et al.*, 2000; Dramsi *et al.*, 2002; Danial *et al.*, 2003). Desde que a Akt do espermatozoide seja fosforilada em Ser473 e/ou Thr308, a motilidade espermática e a integridade são mantidas. Com a desfosforilação da Akt, as caspases são ativadas e a motilidade é rapidamente perdida (Gallardo Bolanos *et al.*, 2014). Um mecanismo semelhante ocorrerá em espermatozoide humano (Koppers *et al.*, 2011). Parece que a desfosforilação da Akt depende de diferentes fatores, tais como a depleção de ATP, desequilíbrio de ROS e da supressão de fatores de pró-sobrevivência (Pujianto *et al.*, 2010). Além disto a morte mediada por receptores de morte celular dos espermatozoides também podem ocorrer. Algumas evidências indicam que a morte do espermatozoide pode ser acionada através da ativação de receptores *toll like* por bactérias (Das *et al.*, 2011; Fujita *et al.*, 2011), lançado pela ROS dos espematozoides mortos, e TNFα (Roca *et al.*, 2013) ou outros fatores pró-morte liberados por outros espermatozoides, ativandos vias apoptóticas extrínsecas (Macias Garcia *et al.*, 2012; Mendoza *et al.*, 2013).

Fecundação: o milagre da vida

Para que a fertilização ocorra em mamíferos, os espermatozoides ejaculados devem atingir o oócito, que após a ovulação se move do ovário para a tuba uterina. Muito pouco do total de espermatozoides ejaculados - menos de 1 milhão em seres humanos - chegam à tuba.

Além disso, os espermatozoides passam pela capacitação antes de serem capazes de penetrar as camadas do cumulus, e se ligarem à receptores de espermatozoidena zona pelúcida do oócito, sofrem a reação acrossômica, que permite com que o espermatozoide penetre na zona pelúcida e se funda com oócito. A porcentagem de espermatozoides capacitados é baixa, (cerca de 10% em seres humanos) de modo que o número de espermatozoides que pode alcançar e fertilizar o oócito é pequeno. Devido a este número baixo de espermatozoides capacitados, mecanismos de orientação espermáticas são cruciais para que a fecundação seja bem sucedida. Dois mecanismos ativos de orientação do espermatozoide têm sido descritos em mamíferos: quimiotaxia e termotaxia (Eisenbach e Giojalas, 2006). Apenas uma pequena fração de espermatozoides capacitados é quimiotaticamente ativa. Os espermatozoides usam tanto sua movimentação ativa, pela motilidade, quanto ao movimentaão passiva, pela contração muscular do trato reprodutivo feminino, para chegar ao local de armazenamento na tuba uterina. Uma vez lá, uma pequena porcentagem de espermatozoides se torna capacitado. Espermatozoides capacitados alcançam o oócito, guiado por uma combinação de quimiotaxia, termotaxia e, talvez contrações tubáricas. Substâncias quimiostáticas estão presentes no líquido tubário e também são secretados pelas células do cumulus que envolvem o oócito. Espermatozoides inicialmente capacitados no local de armazenamento usam um gradiente de temperatura dependente da ovulação entre este local e o local de fecundação (Eisenbach e Giojalas, 2006). Conforme os espermatozoides se aproximam do local de fercundação, eles provavelmente sentem um gradiente quimoatrativo que os guia para o oócito. Quimioatrativos para espermatozoides de mamíferos, podem ser os peptídeos natriuréticos atrial, *bourgeonal*, *lyral*, pequenos peptidios do fluido folicular (1,3-13 kDa), progesterona e rantes (Eisenbach e Giojalas, 2006). Em coelhos e porcos, o local de fecundação na tuba uterina é 1-2 ºC mais quente que o local de armazenamento de espermatozoides em coelhos e porcos.Esta mudança é devida mais a uma diminuição de temperatura no local de armazenamento, do que o aumento no local de fecundação (Eisenbach e Giojalas, 2006).

A fecundação desencadeia um complexo programa celular, que transforma duas células germinativas meióticas, altamente especializadas - o oócito e o espermatozoide - em um embrião totipotente. Células espermáticas se ligam inicialmente a zona pelúcida do oócito, composto por apenas algumas glicoproteínas, proteína de ligação a zona pelúcida (ZP1) e ZP4 em seres humanos (Clift e Schuh, 2013). Estudos anteriores identificaram a ZP3 como um potencial receptor primário de espermatozoide, no entanto, atualmente é conhecido que a ZP3 por si só não é suficiente para a ligação dos espermatozoides à zona pelúcida. É possível que as proteínas ZP juntas adotem uma estrutura tridimensional que apresenta um local de ligação para o espermatozoide. Este local de ligação é perdido após a fecundação, prevenindo a polispermia. A protease responsável pela clivagem da ZP2 foi identificada, e denominada ovastacina. Proteínas ZP são modificadas com oligossacárideas na Asp (N-ligante) e/ou Thr (residuos O-ligantes). A maioria delas terminam com o domínio tetrassacarídeo sialil Lewis X, que desempenha um papel importante na ligação do espermatozoide com o oócito (Clift e Schuh, 2013). Após a ligação com o oócito, o espermatozoide sofre a reação acrossômica, com liberação de enzimas proteolíticas e hidrolíticas que abrem caminho para a fusão do espermatozoide com a membrana plasmática do oócito. A fusão do espermatozoide com o oócito desencadeia a segunda divisão meiótica e a transição para a mitose. O espermatozoide induz a elevação do Ca^{2+} livre dentro do oócito em mamíferos, e uma série de oscilações de Ca^{2+} desencadeia uma sequência ordenada de eventos, incluindo a liberação de grânulos corticais, a conclusão da segunda divisão meiótica, a tradução de mRNA materno, e, finalmente, a transição da meiose para a mitose. O aumento de Ca^{2+} é desencadeado por Cζ fosfolipase (PLCζ) que é introduzida no oócito pelo espermatozoide. A PLCζ estimula a produção de inositol trisfosfato 1-4-5, que se liga a receptores no ER causando a liberação de Ca^{2+} e provocando a retomada da meiose. Os oócitos permanecem pausados na segunda divisão da metáfase da segunda divisão meiótica, enquanto aguardam a fecundação. Esta pausa é mediada pela atividade do fator citostático (CSF). Um mediador essencial da actividade de CSF é EMI2 (*early mitotic inhibitor 2*). O EMI2 mantém a pausa da metáfase II por inibição do complexo de progressão da anáfase, que tem como alvo a ciclina B e o inibidor separase securina (Clift e Schuh, 2013). O aumento de Ca^{2+} intracelular após a fecundação ativa a proteína quinase Ca^{2+}/calmodulina dependente II (CaMKII), que fosforila EMI2. EMI2 é também fosforilado pela Polo-quinase 1 (PLK1) e, posteriormente alvo de degradação pela SCF ligase (SKP2-cullin 1-F-box protein). Essa ubiquitina conduz à ativação do APC/C, a destruição da ciclina B e securina, a eliminação de metade das cromatides irmãs no segundo corpúsculo polar e a formação do pronúcleo fêminino (Clift e Schuh, 2013). Quase imediatamente após a fecundação, o aumento intracelular nos níveis de Ca^{2+} provoca a retomada da meiose e a formação de um pronúcleo feminino, enquanto o genoma do espermatozoide sofre descompactação. As protaminas espermáticas são rapidamente removidas do pronúcleo masculino, e o DNA é re-enovelado em torno dos nucleossomas que contêm a histona H3, variante H3.3, que é substituída pela histona canônica H3 durante a replicação do DNA. Embora agora equivalentemente estruturado em nucleossomos, os dois prónúcleos retêm alguns padrões de metilação de histona específica dos pais, particularmente em regiões de heterocromatina pericentromérica, que são equilibradas gradualmente durante as primeiras divisões embrionárias. Para o zigoto adquirir totipotência, os genomas parentais também devem ser submetidos à extensa reprogramação epigenética, o que envolve desmetilação global do DNA. O genoma paterno é altamente metilado em comparação com o do oócito. Poucas horas depois da fecundação, no entanto, o prónúcleo espermático sofre rápida e ativa desmetilação antes de replicação do DNA.

Agradecimentos

O autor recebeu apoio financeiro para os estudos relatados nesta revisão do Ministerio de Economía y

Competitividad-FEDER de Madrid, Espanha (projeto número AGL 2013-43211-R), e do Governo de Extremadura-FEDER (projeto número GR 10010 and PCE1002).

Referências

Abaigar T, Holt WV, Harrison RA, del Barrio G. 1999. Sperm subpopulations in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. *Biol Reprod*, 60:32-41.

Abaigar T, Cano M, Pickard AR, Holt WV. 2001. Use of computer-assisted sperm motility assessment and multivariate pattern analysis to characterize ejaculate quality in Mohor gazelles (*Gazella dama mhorr*): effects of body weight, electroejaculation technique and short-term semen storage. *Reproduction*, 122:265-273.

Agarwal A, Virk G, Ong C, du Plessis SS. 2014. Effect of oxidative stress on male reproduction. *World J Mens Health*, 32:1-17.

Aitken RJ, Curry BJ. 2011. Redox regulation of human sperm function: from the physiological control of sperm capacitation to the etiology of infertility and DNA damage in the germ line. *Antioxid Redox Signal*, 14:367-381.

Aitken RJ, Koppers AJ. 2011. Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian J Androl*, 13:36-42.

Aitken RJ, De Iuliis GN, Gibb Z, Baker MA. 2012a. The Simmet lecture: new horizons on an old landscape--oxidative stress, DNA damage and apoptosis in the male germ line. *Reprod Domest Anim*, 47(suppl 4):7-14.

Aitken RJ, Whiting S, De Iuliis GN, McClymont S, Mitchell LA, Baker MA. 2012b. Electrophilic aldehydes generated by sperm metabolism activate mitochondrial reactive oxygen species generation and apoptosis by targeting succinate dehydrogenase. *J Biol Chem*, 287:33048-33060.

Alessi DR, Deak M, Casamayor A, Caudwell FB, Morrice N, Norman DG, Gaffney P, Reese CB, MacDougall CN, Harbison D, Ashworth A, Bownes M. 1997. 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the Drosophila DSTPK61 kinase. *Curr Biol*, 7:776-789.

Auger J, Leonce S, Jouannet P, Ronot X. 1993. Flow cytometric sorting of living, highly motile human spermatozoa based on evaluation of their mitochondrial activity. *J Histochem Cytochem*, 41:1247-1251.

Balao da Silva CM, Ortega Ferrusola C, Morillo Rodriguez A, Gallardo Bolanos JM, Plaza Davila M, Morrell JM, Rodriguez Martinez H, Tapia JA, Aparicio IM, Peña FJ. 2013. Sex sorting increases the permeability of the membrane of stallion spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, 138:241-251.

Barroso G, Taylor S, Morshedi M, Manzur F, Gavino F, Oehninger S. 2006. Mitochondrial membrane potential integrity and plasma membrane translocation of phosphatidylserine as early apoptotic markers: a comparison of two different sperm subpopulations. *Fertil Steril*, 85:149-154.

Bolanos JM, Moran AM, da Silva CM, Davila MP, Munoz PM, Aparicio IM, Tapia JA, Ferrusola CO, Peña FJ. 2014. During cooled storage the extender influences processed autophagy marker light chain 3 (LC3B) of stallion spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, 145:40-46.

Brum AM, Sabeur K, Ball BA. 2008. Apoptotic-like changes in equine spermatozoa separated by density-gradient centrifugation or after cryopreservation. *Theriogenology*, 69:1041-1055.

Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC. 1998. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*, 282:1318-1321.

Caselles AB, Miro-Moran A, Morillo Rodriguez A, Gallardo Bolanos JM, Ortega Ferrusola C, Salido GM, Peña FJ, Tapia JA, Aparicio IM. 2014. Identification of apoptotic bodies in equine semen. *Reprod Domest Anim*, 49:254-262.

Clift D, Schuh M. 2013. Restarting life: fertilization and the transition from meiosis to mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14:549-562.

da Silva C. M, Macias-Garcia B, Miro-Moran A, Gonzalez-Fernandez L, Morillo-Rodriguez A, Ortega Ferrusola C, Gallardo Bolanos JM, Stilwell G, Tapia JA, Peña FJ. 2011. Melatonin reduces lipid peroxidation and apoptotic-like changes in stallion spermatozoa. *J Pineal Res*, 51:172-179.

Danial NN, Gramm CF, Scorrano L, Zhang CY, Krauss S, Ranger AM, Datta SR, Greenberg ME, Licklider LJ, Lowell BB, Gygi SP, Korsmeyer SJ. 2003. BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature*, 424:952-956.

Das SC, Isobe N, Yoshimura Y. 2011. Expression of Toll-like receptors and avian beta-defensins and their changes in response to bacterial components in chicken sperm. *Poultry Sci*, 90:417-425.

Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, 91:231-241.

de Lamirande E, Gagnon C. 1993. Human sperm hyperactivation in whole semen and its association with low superoxide scavenging capacity in seminal plasma. *Fertil Steril*, 59:1291-1295.

de Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C. 1997. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod*, 2:48-54.

de Lamirande E, Gagnon C. 2002. The extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway is involved in human sperm function and modulated by the superoxide anion. *Mol Hum Reprod*, 8:124-135.

de Lamirande E, Gagnon C. 2003. Redox control of changes in protein sulfhydryl levels during human sperm capacitation. *Free Radic Biol Med*, 35:1271-1285.

de Lamirande E, Lamothe G. 2009. Reactive oxygen-induced reactive oxygen formation during human sperm capacitation. *Free Radic Biol Med*, 46:502-510.

Dramsi S, Scheid MP, Maiti A, Hojabrpour P, Chen X, Schubert K, Goodlett DR, Aebersold R, Duronio V. 2002. Identification of a novel phosphorylation site, Ser-170, as a regulator of bad pro-apoptotic activity. *J Biol Chem*, 277:6399-6405.

Eisenbach M, Giojalas LC. 2006. Sperm guidance in mammals - an unpaved road to the egg. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7:276-285.

Fujita Y, Mihara T, Okazaki T, Shitanaka M,

Kushino R, Ikeda C, Negishi H, Liu Z, Richards JS, Shimada M. 2011. Toll-like receptors (TLR) 2 and 4 on human sperm recognize bacterial endotoxins and mediate apoptosis. *Hum Reprod*, 26:2799-2806.

Gallardo Bolanos JM, Miro Moran A, Balao da Silva CM, Morillo Rodriguez A, Plaza Davila M, Aparicio IM, Tapia JA, Ortega Ferrusola C, Peña FJ. 2012. Autophagy and apoptosis have a role in the survival or death of stallion spermatozoa during conservation in refrigeration. *PLoS One*, 7:e30688

Gallardo Bolanos JM, Balao da Silva CM, Martin Munoz P, Morillo Rodriguez A, Plaza Davila M, Rodriguez-Martinez H, Aparicio IM, Tapia JA, Ortega Ferrusola C, Peña FJ. 2014. Phosphorylated AKT preserves stallion sperm viability and motility by inhibiting caspases 3 and 7. *Reproduction*, 148:221-235.

Gallon F, Marchetti C, Jouy N, Marchetti P. 2006. The functionality of mitochondria differentiates human spermatozoa with high and low fertilizing capability. *Fertil Steril*, 86:1526-1530.

Garcia BM, Moran AM, Fernandez LG, Ferrusola CO, Rodriguez AM, Bolanos JM, da Silva CM, Martinez HR, Tapia JA, Peña FJ. 2012. The mitochondria of stallion spermatozoa are more sensitive than the plasmalemma to osmotic-induced stress: role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway. *J Androl*, 33:105-113.

Gillan L, Evans G, Maxwell WM. 2005. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, 63:445-457.

Holt WV, O'Brien J, Abaigar T. 2007. Applications and interpretation of computer-assisted sperm analyses and sperm sorting methods in assisted breeding and comparative research. *Reprod Fertil Dev*, 19:709-718.

Kleene KC, Bagarova J, Hawthorne SK, Catado LM. 2010. Quantitative analysis of mRNA translation in mammalian spermatogenic cells with sucrose and Nycodenz gradients. *Reprod Biol Endocrinol*, 8:155.

Koppers AJ, De Iuliis GN, Finnie JM, McLaughlin EA, Aitken RJ. 2008. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab*, 93:3199-3207.

Koppers AJ, Mitchell LA, Wang P, Lin M, Aitken RJ. 2011. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathway involvement in a truncated apoptotic cascade associated with motility loss and oxidative DNA damage in human spermatozoa. *Biochem J*, 436:687-698.

Liu DY, Clarke GN, Baker HW. 1991. Relationship between sperm motility assessed with the Hamilton-Thorn motility analyzer and fertilization rates in vitro. *J Androl*, 12:231-239.

Liu S, Li Y, Gao X, Yan JH, Chen ZJ. 2010. Changes in the distribution of mitochondria before and after in vitro maturation of human oocytes and the effect of in vitro maturation on mitochondria distribution. *Fertil Steril*, 93:1550-1555.

Lizcano JM, Morrice N, Cohen P. 2000. Regulation of BAD by cAMP-dependent protein kinase is mediated via phosphorylation of a novel site, Ser155. *Biochem J*, 349:547-557.

Macias Garcia B, Ortega Ferrusola C, Aparicio I. M, Miro-Moran A, Morillo Rodriguez A, Gallardo Bolanos JM, Gonzalez Fernandez L, Balao da Silva CM, Rodriguez Martinez H, Tapia JA, Peña FJ. 2012. Toxicity of glycerol for the stallion spermatozoa: effects on membrane integrity and cytoskeleton, lipid peroxidation and mitochondrial membrane potential. *Theriogenology*, 77:1280-1289.

Martin G, Sabido O, Durand P, Levy R. 2004. Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. *Biol Reprod*, 71:28-37.

Mendoza N, Casao A, Perez-Pe R, Cebrian-Perez J. A, Muino-Blanco T. 2013. New insights into the mechanisms of ram sperm protection by seminal plasma proteins. *Biol Reprod*, 88:149. doi: 10.1095/biolreprod.112.105650.

Nunez-Martinez I, Moran JM, Peña FJ. 2007. Identification of sperm morphometric subpopulations in the canine ejaculate: do they reflect different subpopulations in sperm chromatin integrity? *Zygote*, 15:257-266.

Ortega Ferrusola C, Sotillo-Galan Y, Varela-Fernandez E, Gallardo Bolanos JM, Muriel A, Gonzalez-Fernandez L, Tapia JA, Peña FJ. 2008. Detection of "apoptosis-like" changes during the cryopreservation process in equine sperm. *J Androl*, 29:213-221.

Ortega Ferrusola C, Gonzalez Fernandez L, Macias Garcia B, Salazar-Sandoval C, Morillo Rodriguez A, Rodriguez Martinez H, Tapia JA, Peña FJ. 2009a. Effect of cryopreservation on nitric oxide production by stallion spermatozoa. *Biol Reprod*, 81:1106-1111.

Ortega Ferrusola C, Gonzalez Fernandez L, Morrell JM, Salazar Sandoval C, Macias Garcia B, Rodriguez-Martinez H, Tapia JA, Peña FJ. 2009b. Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C11, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stallion-dependent and is related to apoptotic-like changes. *Reproduction*, 138:55-63.

Peña FJ, Johannisson A, Wallgren M, Rodriguez-Martinez H. 2003. Assessment of fresh and frozen-thawed boar semen using an Annexin-V assay: a new method of evaluating sperm membrane integrity. *Theriogenology*, 60:677-689.

Peña FJ, Garcia BM, Samper JC, Aparicio IM, Tapia JA, Ferrusola CO. 2011. Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa: the way to improve current cryopreservation protocols? *Theriogenology*, 76:1177-1186.

Petyim S, Neungton C, Thanaboonyawat I, Laokirkkiat P, Choavaratana R. 2014. Sperm preparation before freezing improves sperm motility and reduces apoptosis in post-freezing-thawing sperm compared with post-thawing sperm preparation. *J Assisted Reprod Genet*.

Pujianto DA, Curry BJ, Aitken RJ. 2010. Prolactin exerts a prosurvival effect on human spermatozoa via mechanisms that involve the stimulation of Akt phosphorylation and suppression of caspase activation and capacitation. *Endocrinology*, 151:1269-1279.

Roca J, Martinez-Alborcia MJ, Gil MA, Parrilla I, Martinez EA. 2013. Dead spermatozoa in raw semen samples impair in vitro fertilization outcomes of frozen-thawed spermatozoa. *Fertil Steril*, 100:875-881.

Rodriguez-Martinez H. 2003. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? *Reprod Domest Anim*, 38:312-318.

Rodriguez-Martinez H, Kvist U, Saravia F, Wallgren M, Johannisson A, Sanz L, Peña FJ, Martinez EA, Roca J, Vazquez JM, Calvete JJ. 2009. The physiological roles of the boar ejaculate. *Soc Reprod Fertil Suppl*, 66:1-21.

Saravia F, Nunez-Martinez I, Moran J. M, Soler C, Muriel A, Rodriguez-Martinez H, Peña FJ. 2007. Differences in boar sperm head shape and dimensions recorded by computer-assisted sperm morphometry are not related to chromatin integrity. *Theriogenology*, 68:196-203.

Satake N, Elliott RM, Watson PF, Holt WV. 2006. Sperm selection and competition in pigs may be mediated by the differential motility activation and suppression of sperm subpopulations within the oviduct. *J Exp Biol*, 209:1560-1572.

Smith TB, Dun MD, Smith ND, Curry BJ, Connaughton HS, Aitken RJ. 2013. The presence of a truncated base excision repair pathway in human spermatozoa that is mediated by OGG1. *J Cell Sci*, 126:1488-1497.

Stowe DF, Camara AK. 2009. Mitochondrial reactive oxygen species production in excitable cells: modulators of mitochondrial and cell function. *Antioxid Redox Signal*, 11:1373-1414.

Suarez SS, Pacey AA. 2006. Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum Reprod Update*, 12:23-37.

Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ. 1995. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell*, 80:285-291.

Yu F, Sugawara T, Maier CM, Hsieh LB, Chan PH. 2005. Akt/Bad signaling and motor neuron survival after spinal cord injury. *Neurobiol Dis*, 20:491-499.

Zini A, De Lamirande E, Gagnon C. 1995. Low levels of nitric oxide promote human sperm capacitation in vitro. *J Androl*, 164:24-431.

Espionando uma conversa privada entre a tuba uterina e gametas/embriões

C. Almiñana

[1]UMR7247, Physiologie de la Reproduction et des Comportements, INRA, Nouzilly, France.

Resumo

Após uma longa viagem no trato materno, espermatozóides irão encontrar o oócito. Como resultado, um embrião inicial irá prontamente se desenvolver enquanto se desloca pela tuba. Estas jornadas curtas, mas vitais, de gametas e embriões, são acompanhadas por mudanças importantes no trato materno. Em particular, na tuba uterina, local que fornece um ambiente ideal para a maturação de gametas e transporte, fecundação e desenvolvimento embrionário inicial. Na verdade, para conseguir uma gestação bem sucedida a tuba deve manter um diálogo produtivo com os gametas, seguido de uma comunicação adequada com o (s) embrião (ões). Na presente revisão, as mudanças no transcriptoma e proteoma, induzidas por gametas e embriões na tuba uterina, como resultado deste diálogo inicial serão relatadas. Será feita uma menção especial da conversa diferencial entre o tuba uterina e os espermatozóides que carregam o cromossomo X ou Y, o que pode ser a base da seleção de gênero. Posteriormente, será discutida a capacidade do embrião para modular o seu próprio ambiente tubárico, evitando assim a sua rejeição por parte da mãe. Em última análise, um terceiro componente será apresentado neste diálogo, exossomos/microvesículas, que têm sido propostos como primeiros mediadores dessa interação entre mãe e gameta/embrião. Ao bisbilhotar a conversa privada entre o tuba uterina e gametas/embrião podemos fornecer algumas pistas sobre os mecanismos moleculares que mediam essas interações. Além disso, conhecer os genes e proteínas que comandam o sucesso dos eventos reprodutivos iniciais abrirá grandes oportunidades para a melhoria das tecnologias de reprodução assistida e eficiência na reprodução animal.

Palavras-chave: embriões, exossomos, gameta, interações da tuba uterina.

Introdução

Nos mamíferos, as interações maternas com gametas e embriões são a base para o sucesso de qualquer evento reprodutivo. A tuba uterina, ou trompa, é o canal materno que liga o ovário ao útero, e que desempenha um papel vital nestas interações. Ela mantém o diálogo materno com gametas e embriões iniciais e fornece um ambiente ideal para a maturação de gametas e transporte, fertilização e desenvolvimento inicial do embrião (Hunter, 2005).

A tuba uterina pode ser vista como uma via bidirecional, em que os espermatozóides viajam ao encontro do oócito enquanto que o embrião inicial viaja na direção do útero. Na maior parte dos mamíferos, a tuba é dividida anatomicamente em três partes: 1) junção uterotubárica, que liga a tuba uterina ao útero; 2) istmo, região associada com o armazenamento de espermatozóides antes da ovulação e onde os espermatozóides se ligam às células epiteliais da tuba uterina (OEC) em seu caminho para encontrar o oócito e; 3) ampola, onde ocorre a fecundação. Espermatozóides da maioria dos mamíferos podem sobreviver na tuba uterina por algumas horas, até um máximo de 5-7 dias (Holt e Fazeli, 2010). Os morcegos são excepcionais entre os mamíferos, porque têm a capacidade de armazenar espermatozóides durante vários meses no útero ou tubas uterinas durante a hibernação (Bernard e Cumming, 1997). No entanto, o embrião persiste apenas alguns dias (2-5) na tuba uterina, o que também varia dependendo das espécies; em camundongo por 2-3 dias (Rafferty, 1970); em suínos por 1-3 dias (Pomeroy, 1955; Oxenreider e Day, 1965); em bovinos por 2-4 dias (Hamilton e Laing, 1946; Crisman *et al.*, 1980); em ovinos por 2-3 dias (Holst, 1974) e em equinos por 5-6 dias (Freeman *et al.*, 1991). Para se adaptar a estes diferentes cenários, a tuba uterina é espacialmente e temporariamente regulada por hormônios e também por suas interações com gametas e embriões (Fig. 1).

No entanto, a modulação da tuba uterina por gametas e embriões é pouco compreendida. O entendimento destas interações é uma questão de dois lados. Por um lado, existe um efeito modulador das OEC nos espermatozóides (Ellington *et al.*, 1991) e as secreções tubáricas no desenvolvimento do embrião (Gandolfi, 1989). Por outro lado, os espermatozóides e o embrião também podem modular a expressão de genes e proteínas da tuba uterina (Ellington *et al.*, 1993; Thomas *et al.*, 1995; Fazeli *et al.*, 2004;. Georgiou *et al.*, 2005, 2007; Almiñana *et al.*, 2012; Schmaltz-Panneau *et al.*, 2014; Yeste *et al.*, 2014). Estudos recentes estão sugerindo um terceiro componente nestas interações, os exossomos/microvesículas, que poderiam atuar como mediadores do sistema de comunicação de duas vias que ocorre no trato materno (Ng *et al.*, 2013; Burns *et al.*, 2014).

Para simplificar, esta revisão tem como foco as interações tuba uterina-gameta/embrião em mamíferos. O papel dos gametas e embriões como moduladores do trato materno será abordado nas próximas páginas. Nos últimos anos, um número crescente de publicações avaliou o lado das interações maternas, o que reflete a importância das mesmas. Ao bisbilhotar a conversa privada entre tuba uterina, gametas e embriões podem-se revelar os mecanismos que medeiam essas interações. Entender esse complexo diálogo irá lançar alguma luz sobre problemas de infertilidade, reduzir a perda inicial de gestação e pode até mesmo identificar os fatores que influenciam o desenvolvimento da prole na idade adulta.

Autor para correspondência: calminana@tours.inra.fr

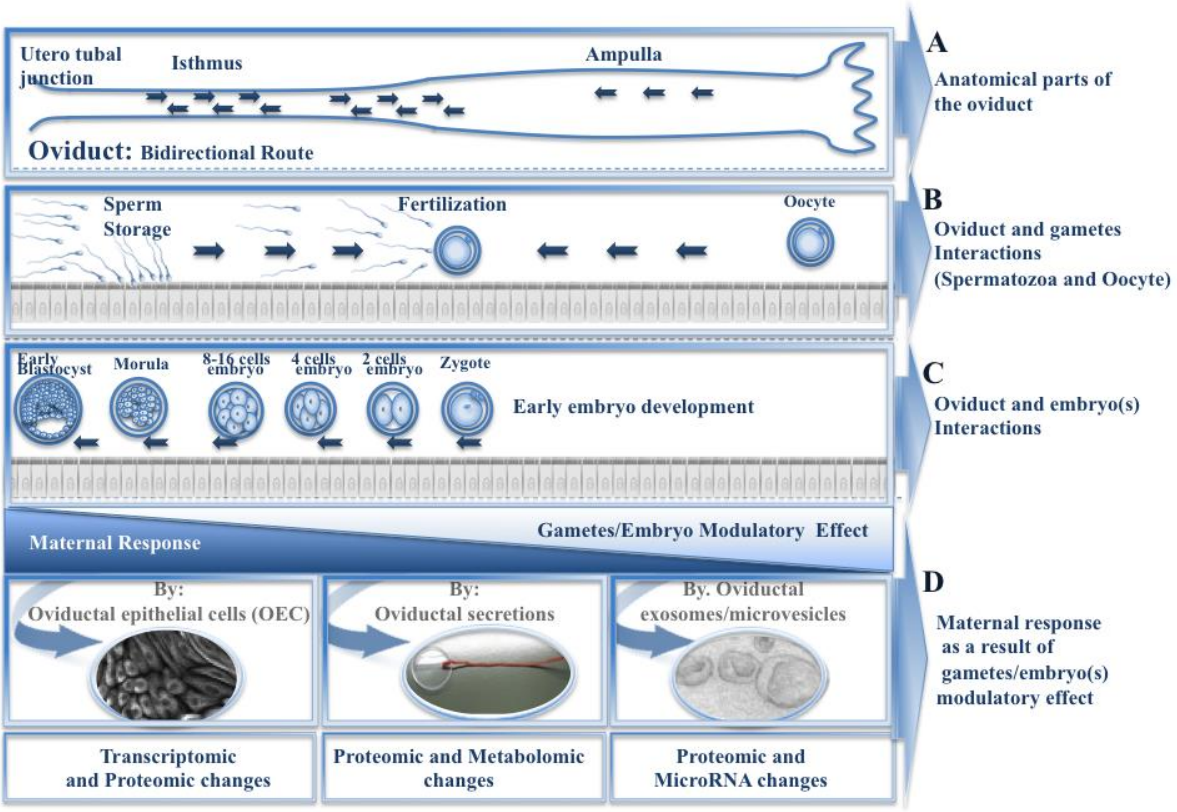

Figura 1. Diagrama das partes anatômicas envolvendo as interações tuba uterina e gametas/embriões.

Interações tuba uterina e gametas: conversas ou negociações?

As interações entre a tuba uterina e os gametas envolvem um contato estreito e específico entre os mesmos (Hunter e Nichol, 1983; Fazeli *et al.*, 1999, 2003). Como resultado deste contato, ocorre um diálogo confidencial entre as OEC e os gametas. Consistente evidência nos permite afirmar que este diálogo não é unilateral, e deve ser visto como um sistema de comunicação de duas vias que assegura o sucesso dos eventos reprodutivos iniciais. De um lado, a tuba uterina e suas secreções influenciam a fisiologia dos gametas (Avilés *et al.*, 2010). Por outro lado, gametas também modulam o ambiente tubárico (Fazeli *et al.*, 2004; Georgiou *et al.*, 2007).

Não há dúvida sobre o papel vital da tuba uterina na preparação dos gametas masculino e feminino para a sua união bem-sucedida (Coy *et al.*, 2012; Avilés *et al.*, 2015), mas a pesquisa é menos extensa e detalhada, no que diz respeito à capacidade dos gametas em modular seu próprio ambiente tubárico. A evidência inicial sobre o mecanismo que os espermatozóides controlam o ambiente tubárico revelou que a ligação de células de sêmen para as OEC bovina durante o co-cultivo leva a alteração dos tipos e quantidades de proteínas secretadas para o meio condicionado (Ellington *et al.*, 1993). Vários estudos utilizando modelos murino ou suíno demonstraram ainda uma resposta materna aos espermatozóides (Fazeli *et al.*, 2004; Georgiou *et al.*, 2005, 2007). Fazeli *et al.* (2004) revelaram que a chegada dos espermatozóides na tuba uterina após a cópula resultou em alterações do transcriptoma tubárico. Estas alterações não foram encontradas em camundongos inférteis (camundongos mutantes T145H), que produzem plasma seminal, mas não espermatozóides (Fazeli *et al.*, 2004). Georgiou e colaboradores mostraram que a presença de ambos os gametas, espermatozóides e oócitos, alterou o perfil de secreção da tuba (Georgiou *et al.*, 2005, 2007). A resposta da tuba aos espermatozóides foi diferente do que a induzida por oócitos. Espermatozóides promoveram uma resposta proteômica específica, modulando a expressão de 20 proteínas, enquanto apenas uma proteína foi regulada por oócitos. Recentemente, Artemenko e colaboradores, usando uma abordagem refinada baseada em espectroscopia de massa, relataram uma resposta a espermatozóides imediata do proteoma de superfície em células da tuba, que foi modulada ao longo do tempo (Artemenko *et al.*, 2015). Trinta e uma proteínas da superfície celular foram pronunciadamente alteradas (≥2 vezes) imediatamente, 1 e 2 h após a inseminação, em comparação com o controle. A análise funcional mostrou que estas proteínas foram associadas a reorganização estrutural da superfície celular do epitélio tubárico. Curiosamente, a glicoproteína específica da tuba uterina (OVGP), uma proteína crucial nos processos de fertilização (Buhi, 2002), foi fortemente aumentada na superfície de células 1 h após a

inseminação. A OVGP também foi aumentada em resposta a espermatozóides nas tubas uterinas da porca (Georgiou *et al.,* 2007), porém 24 horas após inseminação artificial. Estes resultados suportam a idéia de que complexas alterações de transcriptoma e proteoma que ocorrem na tuba uterina são finamente controladas através do diálogo entre o tuba uterina e gametas.

Além disso, o diálogo sêmen-tuba pode estar baseado da intrigante seleção do espermatozóide contendo o cromossomdo X ou Y pela tuba uterina antes da fertilização. A determinação do sexo da prole em mamíferos é geralmente considerada uma questão de oportunidade, sendo dependente de um espermatozóide contendo o cromossomo X ou o cromossomo Y encontrar o oócito primeiro. Evidênciass do campo e de laboratório sugerem que as fêmeas dos mamíferos podem influenciar a definição de sexo de sua prole (Clutton-Brock e Lason, 1986; James, 2009). No entanto, nenhum mecanismo biológico que explica esta seleção foi ainda descoberto. Estudo recente em suínos (Almiñana *et al.,* 2014) forneceu uma importante visão mecanicista para este fenômeno. Ao introduzir populações de espermatozóides X ou Y em tubas uterinas distintas, usando inseminação laparoscópica bilateral, Almiñana e colaboradores descobriram que os espermatozóides, de fato, produzem respostas transcriptômicas específicas para cada sexo. A análise de microarranjo revelou que 501 das 24123 sondas foram consistentemente alteradas (P <0,05) na tuba uterina na presença de espermatozóides Y em comparação com a presença espermatozóides X. Dessas 501transcrições alteradas, 271 (54,1%) foram reduzidas e 230 (45,9%) foram aumentadas quando os espermatozóides portadores do cromossomo Y estavam presentes na tuba uterina. Duas idéias fascinantes derivaram do nosso estudo: 1) espermatozóides carregando cromossomo Y ou X podem modular a resposta tubárica ativando vias de sinalização específicas a cada gênero e 2) o aparelho reprodutor feminino pode sentir a presença de espermatozóides X ou Y na tuba uterina antes que ocorra a fertilização. O fato de que as mães podem reconhecer a diferença entre espermatozóides X e Y é considerado como um primeiro pré-requisito para permitir apenas um tipo preferido de espermatozóides para atingir o oócito. Portanto, essas interações espermatozóide-tuba uterina poderiam ser vistas mais como "negociações" bem sucedidas se, como resultado, um tipo de espermatozóide pode ser selecionado. Embora o mecanismo exato que pode enviezar a seleção de gênero ainda não esteja elucidado, o estudo por Almiñana *et al.* (2014) fornece genes candidatos que podem ser responsáveis por esta seleção.

Depois de procurar características dos espermatozóides X e Y que poderiam ser reconhecidas pela tuba uterina e poderiam estar envolvidas na seleção do sexo, diferentes características topográficas na cabeça de espermatozóides X e Y foram observadas por microscopia de força atômica (Carvalho *et a.,* 2013). De um modo semelhante, as proteínas diferencialmente expressas encontradas entre espermatozóides X e Y de touro (Chen *et al.,* 2012), podem ser detectadas pelo tuba uterina e ajudar na seleção do sexo. Além disso, estudos recentes sobre a população de microRNAs de espermatozóides sugerem que eles poderiam ser importantes componentes das interações com a tuba. Os microRNAs são potentes reguladores de expressão gênica e proteica (Bartel, 2004; He e Hannon, 2004) e, portanto, os microRNAs espermáticos poderiam modular a expressão de genes da tuba. As novas formas de comunicação embrião-embrião propostas pela liberação de microRNAs através de exossomas durante o cultivo *in vitro* (Saadeldin *et al.,* 2014) também poderiam ser utilizadas para que os microRNAs espermáticos interagissem com a tuba uterina. Até a presente data, apenas diferenças de microRNA espermático entre espermatozóides férteis e inférteis (Lian *et al.,* 2009 Abu Halima-*et al.,* 2013) e um papel potencial de microRNAs espermáticos como sinalização de tradução ativada por quimioatrativos, e sua associação às vesículas foi demonstrado (Das *et al.,* 2013). Mas juntas, estas evidências apoiam a idéia de microRNAs como candidatos "fortes" para a seleção de gênero.

Diálogo da tuba uterina e do (s) embrião (ões): o que o embrião diz a mãe?

A tuba uterina também desempenha um papel direto no suporte ao desenvolvimento embrionário inicial (Gandolfi *et al.,* 1989). Ela oferece o melhor ambiente para o embrião, suprindo suas necessidades, dentro de um período curto, mas muito importante, anteriormente à entrada no útero (Besenfelder *et al.,* 2012).

Como mencionado acima, a chegada de espermatozóides na tuba uterina e sua ligação a células da tuba inicia um diálogo de sinalização espermatozóide-tuba uterina. No entanto, após a fertilização, o embrião resultante passa os próximos dias na tuba uterina, embora seja de "livre flutuação" no trato materno, e não tem contato direto com a mãe, enquanto viaja da tuba uterina para chegar ao útero (Hunter, 1980). Devido a isso, o embrião tem sido considerado relativamente autônomo durante este tempo inicial da sua vida. O fato de que os embriões podem ser rotineiramente produzidos e desenvolvidos até o estádio de blastocisto *in vitro*, devido ao grande avanço das biotecnologias reprodutivas, reforçou essa idéia. Todos juntos, esses fatos têm incentivado uma visão de que a tuba uterina é apenas um tubo passivo para o transporte do embrião em seu caminho para o útero (Marston *et al.,* 1977), em vez de um órgão essencial que oferece proteção e nutrição para o desenvolvimento normal do embrião. No entanto, evidências demonstram a qualidade superior dos embriões *in vivo* em comparação com os embriões *in vitro* (Rizos *et al.,* 2008, 2010; Van Soom *et al.,* 2014) e os efeitos epigenéticos do cultivo

in vitro sobre o potencial de desenvolvimento de embriões (Hou *et al.,* 2007; Reis e Silva *et al.,* 2012; Beaujean, 2014; Bertoldo *et al.,* 2014) e isto levou os pesquisadores a repensarem o papel inquestionável da tuba uterina em abrigar os embriões durante o seu desenvolvimento inicial.

O desenvolvimento do embrião inicial caracteriza-se por uma série altamente orquestrada de eventos, tais como as primeiras divisões mitóticas e a ativação do genoma. Para abranger esses eventos iniciais de desenvolvimento e permitir a entrega de um concepto competente para o endométrio, o revestimento tubárico é submetido a mudanças dinâmicas (Besenfelder *et al.,* 2012). A este respeito, pesquisadores examinaram a possibilidade de que o embrião pode atuar como um mediador do seu próprio ambiente (Almiñana *et al.,* 2012). No entanto, os complexos sinais trocados entre a tuba uterina e os embriões, que levam a alterações do meio em resposta ao (s) embrião (ões) não são ainda totalmente compreendidos.

Dados os obstáculos éticos e científicos associados com estudos *in vivo* de embriões, culturas primárias de OEC foram exaustivamente usadas para estudar essas interações da tuba com o embrião inicial. Usando esse modelo, estudos confirmaram a existência de um diálogo real entre o embrião e a tuba uterina (Cordova *et al.,* 2014; Schmaltz-Panneau *et al.,* 2014). A co-incubação de OEC bovinas (BOEC) com embriões bovinos induziu alterações na expressão gênica embrionária (Cordova *et al.,* 2014). Além disso, BOEC originadas do istmo e da ampola aumentaram da taxa de clivagem e taxa de blastocistos em relação ao controle, e as BOEC originadas do istmo foram mais capazes de suportar o desenvolvimento embrionário inicial do que as BOEC da ampola. Em resposta, o embrião foi também capaz de modificar a expressão gênica e a secreção de proteína das BOEC (Schmaltz-Panneau *et al.,* 2014). A este respeito, trinta e três genes tiveram sua expressão aumentada em BOEC na presença de embriões em comparação com o controle correspondente. Apenas um gene teve sua expressão reduzida. A maioria dos genes regulados positivamente corresponderam a genes regulados ou envolvidos na via de sinalização de interferon tipo I. Um grande número destes genes induzidos por interferon tau (IFNT) também foram encontrados em trabalhos sobre perfis transcricionais do útero bovino (Bauersachs, 2006; Klein *et al.,* 2006; Mansouri-Attia *et al.,* 2009; Forde *et al.,* 2011, 2012). Estas alterações uterinas foram associadas principalmente com sinais de reconhecimento da gestação em resposta à secreção de IFNT pelo concepto. No entanto, a secreção de IFNT pelo embrião bovino começa por volta de 15-16 dias após a fertilização, quando o embrião está no útero (Bazer *et al.,* 1997). Por isso, foi levantada a hipótese de que IFNT embrionário poderia desempenhar um papel fundamental no reconhecimento materno da gestação na tuba uterina e no útero através da ativação de um conjunto de genes específicos antes e durante o período de implantação (Schmaltz-Panneau *et al.,* 2014).

Mesmo que modelos de estudos *in vitro* envolvendo BOEC e embrião tenham provado a existência de certas interações embrião-tuba, a questão levantada é a que distância estão essas interações *in vitro* daquelas que ocorrem *in vivo* durante a gestação inicial. Até o momento, poucos estudos forneceram evidências das interações materno-embrionária na tuba uterina *in vivo* durante os primeiros estágios do desenvolvimento embrionário (Lee *et al.,* 2002; Almiñana *et al.,* 2012; Maillo *et al.,* 2015). Lee *et al.* (2002) compararam o padrão de expressão gênica de tubas uterinas de camundongas contendo embriões iniciais ou oócitos. A presença de embriões alterou o perfil transcricional da tuba uterina em comparação à presença oócitos. Usando um modelo de suíno, Almiñana e colaboradores mostraram que as alterações observadas na expressão de genes na tuba foram dependentes do estádio de desenvolvimento do embrião (Almiñana *et al.,* 2012), demonstrando uma resposta mais específica da tuba uterina à presença do embrião. Além disso, estes autores observaram que, quando os embriões migraram da tuba uterina para o corno uterino, o mRNA de um dado transcrito, relacionado com a imunidade (*TICAM2*), foi reduzido em ambos, tubas uterinas e as amostras do corno uterino. A redução, no útero, da expressão dos genes imuno-relacionadas, em momento em que o embrião está ainda na tuba uterina, pode funcionar como na preparação do útero para aceitar o embrião.

Em um estudo mais abrangente sobre as alterações da tuba, Maillo *et al.* (2015) demonstraram que embriões iniciais bovinos provocam uma resposta na tuba, durante o seu trânsito através desta, que pode contribuir para o seu posterior desenvolvimento. Embora estes autores utilizaram um modelo não fisiológico para provar este diálogo, através da transferência de 50 embriões para o tuba uterina de uma vaca, a presença de múltiplos embriões neste local provocou alterações diferenciais de transcrição em OEC, em comparação com as respostas de expressão de genes à presença de oócitos. Além disso, Maillo *et al.* (2015) observaram que a presença de vários embriões na tuba uterina da vaca regulava negativamente o sistema imune materno, confirmando os resultados anteriores obtidos por Almiñana *et al.* (2012). Tomados em conjunto, estes estudos demonstraram que, como resultado do diálogo mãe-embrião inicial, o embrião medeia o seu próprio ambiente no trato materno. Além disso, o embrião parece contribuir para a sua tolerância pela mãe, através da modulação do sistema imune materno.

Por outro lado, as alterações no transcriptoma observadas na tuba uterina, em resposta à presença do embrião (Lee *et al.,* 2002; Almiñana *et al.,* 2012; Maillo *et al.,* 2015), podem ser, eventualmente, associadas com mudanças nas secreções tubáricas nos

primeiros estágios da gestação. Portanto, parece imperativa a necessidade de se investigar as secreções desencadeadas pelos embriões, nos ambitos temporal e espacial, enquanto eles estão flutuando livremente na tuba uterina. Até agora, muita ênfase tem sido dada para o fluido uterino que envolve o blastocisto ou concepto inicial (Muñoz *et al.,* 2012;. Gomez *et al.,* 2013;. Forde *et al.,* 2014), embora a mortalidade embrionária precoce pode ocorrer antes embrião atingir o útero.

Exossomos/microvesículas: mediadores de interações gameta/embrião

Os exossomas são pequenas vesículas (30-100 nm) de membrana de origem endocítica que foram identificadas *in vivo* em todos os fluidos corporais, incluindo os fluidos folicular (da Silveira *et al.,* 2012; Sohel *et al.,* 2013), uterino (Ng *et al.,* 2013; Burns *et al.,* 2014; Ruiz-Gonzalez *et al.,* 2015) e da tuba uterina (al-Dossary *et al.,* 2013) e que podem ser secretados pela maioria dos tipos de células *in vitro.* Eles transportam especificamente proteínas, lípidos e materiais genéticos, tais como DNA, RNA, e microRNAs que podem ser transferidos para células receptoras, podendo induzir alterações epigenéticas. Exossomos juntamente com microvesículas (vesículas maiores em torno de 50-1000 nm com conteúdo similar; Dragovic *et al.,* 2011; György *et al.,* 2011; Turiák *et al.,* 2011; Braicu *et al.,* 2015) desempenham papéis biológicos fundamentais na regulação da fisiologia, bem como processos patológicos, o que os tornam vetores terapêuticas interessantes (Suntres *et al.,* 2013).

Estudos recentes indicam que exossomos/microvesículas poderiam agir como veículos intercelulares no diálogo materno-embrionário no útero (Ng *et al.,* 2013; Burns *et al.,* 2014; Ruiz-Gonzalez *et al.,* 2015) e podem também mediar as interações entre mãe e gameta/embrião na tuba uterina. Ovidutossomos (Al-Dossary *et al.,* 2013) e uterossomos (Ng *et al.,* 2013;. Burns *et al.,* 2014; Ruiz-Gonzalez *et al.,* 2015) foram recentemente identificados, mas ainda é um mistério como eles entrariam em gametas e embriões e se eles modulam as interações maternas para promover uma gestação bem sucedida. Do lado do embrião, apenas um estudo recente mostrou que embriões produzidos *in vitro* podem secretam exossomas como um possível meio de comunicação entre eles (Saadeldin *et al.,* 2014).

Como mencionado acima, OEC de cultivo primário *in vitro* foram exaustivamente utilizadas como modelos *in vitro* para estudar interações entre tuba uterina e embriões em diferentes espécies animais e, portanto, podem ser o modelo de escolha para estudar o papel dos exossomas neste sistema único de comunicação. No entanto, sabendo das grandes diferenças entre embriões *in vivo* e *in vitro* em termos de qualidade do embrião, expressão de genes, das diferentes características morfológicas e a expressão de proteínas das OEC de origem *in vivo* e *in vitro* (Rottmayer *et al.,* 2006), o nosso laboratório começou a caracterizar os exossomas da tuba uterina bovina, tanto de origem *in vivo* quanto *in vitro* (Almiñana *et al.,* 2015). Para isto, os exossomas secretadas por OEC *in vivo* no fluido tabárico e por OEC *in vitro* em meio condicionado, após o cultivo primário de OEC, foram coletados por ultracentrifugação em série. Os resultados preliminares por análise de dispersão de luz dinâmica revelou diferentes perfis de distribuição de tamanho compatíveis com exossomas e populações de microvesículas em preparações *in vivo* e principalmente populações de microvesículas a partir de preparações *in vitro.* A análise de perfil de proteínas por SDS-PAGE mostrou diferenças quantitativas e qualitativas entre as amostras de exossomos, suas células de origem e do meio (meios condicionados ou lavagem da tuba). Além disso, os exossomas de origem *in vivo* e *in vitro* exibiram perfis proteomicos distintos. A análise por Western Blot demonstrou que (i) ambos os tipos de amostras de proteína exosomal foram positivos para HSP70, uma proteína exossomal conhecida (ii) exossomas *in vivo* expressaram OVGP e proteína de choque térmico A8 (HSPA8), proteínas com funções tubáricas conhecidos na fertilização e a gestação inicial. No entanto, apenas HSPA8 foi detectada em exossomos *in vitro.* Estes resultados têm contribuído para a primeira caracterização de exossomas de tuba de origem *in vivo* e *in vitro.* A análise aprofundada do conteúdo dessas vesículas trará novos *insights* sobre o diálogo embrião-tuba e irá aumentar o nosso conhecimento sobre o meio ambiente tubárico que sustenta as fases iniciais do desenvolvimento do embrião.

Além disso, outros estudos que visam compreender os mecanismos moleculares pelos quais exossomos/microvesículas são internalizados pelas células podem contribuir para sua aplicação terapêutica. Mecanismos que envolvem a fusão ou endocitose da membrana (Del Conde *et al.,* 2005; Parolini *et al.,* 2009) têm sido propostos, mas ainda não está claro se essas vesículas poderiam usar mais de uma rota ou se a captação vesicular é específica para cada tipo de célula (Feng *et al.,* 2010). Até a presente data, sabe-se que os oócitos podem absorver exossomas a partir do fluido folicular, que mostra um sistema de comunicação célula-a-célula durante o crescimento de oócitos (da Silveira *et al.,* 2012; Sohel *et al.,* 2013). Além disso, tem sido mostrado que o espermatozóide pode captar uma proteína reguladora de Ca^{2+} , a PMCA4, de ovidutossomos (Al-Dossary *et al.,* 2013). A PMCA4 está envolvida na capacitação e reação acrossômica, sugerindo que ovidutossomos podem ter um papel importante na interação de gametas com a tuba uterina e, consequentemente com a fertilidade. Além disso, os embriões podem captar exossomas liberados por outros embriões durante o cultivo *in vitro*, como um caminho de comunicação embrião-embrião (Saadeldin *et al.,* 2014). Em última análise, células do trofectoderma de ovinos, uma linhagem celular Tr1estabelecida a partir

de conceptos no dia 15, internalizaram exossomos coletados a partir de fluidos uterinos (Ruiz-Gonzalez *et al.*, 2015). No entanto, a possibilidade de que o embrião inicial capte exossomos do fluido tubárico ou de que as OEC internalizem exossomos derivadas de embriões, até onde sabemos, ainda não foi mostrada.

Por que devemos espionar essas conversas? Por que o que eles dizem importa?

Por espionar a conversa privada entre a tuba uterina e gametas/embrião, um número de genes e proteínas da tuba que participam dessas interações foi revelado. Embora a natureza biológica desta conversa entre tuba uterina e gametas e embriões é interessante para seu próprio bem, o conhecimento das moléculas e mecanismos que conduzem esses processos oferece grandes oportunidades para a melhoria das tecnologias de reprodução assistida (TRAs).

O uso das TRAs, tais como injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI), ou fertilização *in vitro* (FIV), ignora as interações maternas iniciais na tuba uterina. Apesar de todos os nossos esforços para melhorar os procedimentos ou meios de cultivo utilizados nestas técnicas, evidências mostram distúrbios genômicos de *imprinting* (Cox *et al.*, 2002; Le Bouc *et al.*, 2010; Lazaraviciute *et al.*, 2014). Uma vez que não existem interações com a tuba uterina nestes cenários, a utilização das pistas moleculares obtidas a partir da investigação da conversa entre tuba uterina e gametas/embriões poderia melhorar o sucesso de TRAs.

Aqui alguns exemplos: (i) uma base sólida molecular dos mecanismos maternos envolvidos na seleção do espermatozóide vai ajudar a desenvolver métodos de seleção avançados sobre a qualidade do sêmen e melhorar os resultados de TRAs e a eficiência na reprodução animal; (ii) identificar proteínas da tuba que melhoram a sobrevivência dos espermatozóides oferecerá grandes oportunidades para o desenvolvimento de diluentes de sêmen de longa duração; (iii) a determinação de proteínas da tuba que sustentam o desenvolvimento do embrião em estágio inicial será utilizada na concepção de novos meios de cultivo *in vitro* ou na reformulação dos atuais.

Embora a idéia de usar as proteínas identificadas na tuba pareça bastante simples, na prática, não é. Algumas dificuldades têm que ser superadas: a dificuldade no isolamento de proteínas da tuba, o fato de que uma vez que as proteínas são isoladas, elas podem exercer o mesmo efeito de sistemans *in vivo*; e o fato de que gametas e embriões são notavelmente resistentes à absorção de substâncias exógenas, incluindo drogas, biomoléculas e marcadores intracelulares.

Com relação a isso, os exossomas representam nanotransportadores naturais ideais para transportar moléculas específicas dos sistemas *in vivo* que não são expressas em cultivos *in vitro*. A suplementação com exosomas trará um "cocktail" de proteínas, lipídios e miRNAs de tubas semelhantes aos sistemas *in vivo*, para superar as deficiências dos cultivos *in vitro* e promover uma gestação bem-sucedida. O aumento da nossa compreensão sobre o conteúdo e função de exosomas/microvesículas irá destacar o grande potencial para o uso dessas vesículas como biomarcadores não-invasivos ou ativos como terapêuticos em infertilidade e perda precoce de gestação.

Agradecimentos

O autor agradece a William V. Holt por sua leitura e pareceres construtivos sobre este manuscrito. Este trabalho foi apoiado pela UE no quadro do Marie-Curie FP7 COFUND People Programme, através da atribuição de financiamento do programa AgreenSkills: sob o projeto n °267.196.

Referências

Abu-Halima M, Hammadeh M, Schmitt J, Leidinger P, Keller A, Meese E, Backes C. 2013. Altered microRNA expression profiles of human spermatozoa in patients with different spermatogenic impairments. *Fertil Steril*, 99:1249-1255.e16.

Al-Dossary AA, Strehler EE, Martin-Deleon PA. 2013. Expression and secretion of plasma membrane Ca2+-ATPase 4a (PMCA4a) during murine estrus: association with oviductal exosomes and uptake in sperm. *PLoS One*, 8(11):e80181.

Almiñana C, Heath PR, Wilkinson S, Sanchez-Osorio J, Cuello C, Parrilla I, Gil MA, Vazquez JL, Vazquez JM, Roca J, Martinez EA, Fazeli A. 2012. Early developing pig embryos mediate their own environment in the maternal tract. *PLoS One*, 7(3):e33625.

Almiñana C, Caballero I, Heath PR, Maleki-Dizaji S, Parrilla I, Cuello C, Gil MA, Vazquez JL, Vazquez JM, Roca J, Martinez EA, Holt WV, Fazeli A. 2014. The battle of the sexes starts in the oviduct: modulation of oviductal transcriptome by X and Y-bearing spermatozoa. *BMC Genomics*, 15:293.

Almiñana C, Corbin E, Tsikis G, Soleilhavoup C, Galio L, Sandra O, Mermillod P. 2015. Characterization of bovine oviductal exosomes from *in vivo* and in vitro origin. *Reprod Fertil Dev*, 27:147. (abstract).

Artemenko K, Horáková J, Steinberger B, Besenfelder U, Brem G, Bergquist J, Mayrhofer C. 2015. A proteomic approach to monitor the dynamic response of the female oviductal epithelial cell surface to male gametes. *J Proteomics*, 113:1-14.

Avilés M, Gutiérrez-Adán A, Coy P. 2010. Oviductal secretions: will they be key factors for the future ARTs? *Mol Hum Reprod*, 16:896-906.

Avilés M, Coy P, Rizos D. 2015. The oviduct: a key organ for the success of early reproductive events. *Anim Front*, 5:25-31.

Bartel DP. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis,

mechanism, and function. *Cell*, 116:281-297.

Bauersachs S, Ulbrich SE, Gross K, Schmidt SE, Meyer HH, Wenigerkind H, Vermehren M, Sinowatz F, Blum H, Wolf E. 2006. Embryo-induced transcriptome changes in bovine endometrium reveal species-specific and common molecular markers of uterine receptivity. *Reproduction*, 132:319-331.

Bazer FW, Spencer TE, Ott TL. 1997. Interferon tau: a novel pregnancy recognition signal. *Am J Reprod Immunol*, 37:412-420.

Beaujean N. 2014. Epigenetics, embryo quality and developmental potential. *Reprod Fertil Dev*, 27:53-62.

Bernard RT, Cumming GS. 1997. African bats: evolution of reproductive patterns and delays. *Q Rev Biol*, 72:253-274.

Bertoldo MJ, Locatelli Y, O'Neill C, Mermillod P. 2014. Impacts of and interactions between environmental stress and epigenetic programming during early embryo development. *Reprod Fertil Dev*, doi: 10.1071/RD14049.

Besenfelder U, Havlicek V, Brem G. 2012. Role of the oviduct in early embryo development. *Reprod Domest Anim*, 47(suppl. 4):156-163.

Braicu C, Tomuleasa C, Monroig P, Cucuianu A, Berindan-Neagoe I, Calin GA. 2015. Exosomes as divine messengers: are they the Hermes of modern molecular oncology? *Cell Death Differ*, 22:34-45.

Buhi WC. 2002. Characterization and biological roles of oviduct-specific, oestrogen-dependent glycoprotein. *Reproduction* 123:355-362.

Burns G, Brooks K, Wildung M, Navakanitworakul R, Christenson LK, Spencer TE. 2014. Extracellular vesicles in luminal fluid of the ovine uterus. *PLoS One*, 9(3):e90913.

Carvalho JO, Silva LP, Sartori R, Dode MA. 2013. Nanoscale differences in the shape and size of X and Y chromosome-bearing bovine sperm heads assessed by atomic force microscopy. *PLoS One*, 8(3):e59387.

Chen X, Zhu H, Wu C, Han W, Hao H, Zhao X, Du W, Qin T, Liu Y, Wang D. 2012. Identification of differentially expressed proteins between bull X and Y spermatozoa. *J Proteomics*, 77:59-67.

Clutton-Brock TH, Albon SD, Guinness FE. 1986. Great expectations-dominance, breeding success and offspring sex-ratios in red deer. *Anim Behav*, 34:460-471.

Cordova A, Perreau C, Uzbekova S, Ponsart C, Locatelli Y, Mermillod P. 2014. Development rate and gene expression of IVP bovine embryos cocultured with bovine oviduct epithelial cells at early or late stage of preimplantation development. *Theriogenology*, 81:1163-1173.

Cox GF, Bürger J, Lip V, Mau UA, Sperling K, Wu BL, Horsthemke B. 2002. Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. *Am J Hum Genet*, 71:162-164.

Coy P, García-Vázquez FA, Visconti PE, Avilés M. 2012. Roles of the oviduct in mammalian fertilization. *Reproduction*, 144:649-660.

Crisman RO, McDonald LE,Wallace CE. 1980. Oviduct (uterine tube) transport of ova in the cow. *Am J Vet Res*, 41:645-647.

da Silveira JC, Veeramachaneni DN, Winger QA, Carnevale EM, Bouma GJ. 2012. Cell-secreted vesicles in equine ovarian follicular fluid contain miRNAs and proteins: a possible new form of cell communication within the ovarian follicle. *Biol Reprod*, 86:71.

Das PJ, McCarthy F, Vishnoi M, Paria N, Gresham C, Li G, Kachroo P, Sudderth AK, Teague S, Love CC, Varner DD, Chowdhary BP, Raudsepp T. 2013. Stallion sperm transcriptome comprises functionally coherent coding and regulatory RNAs as revealed by microarray analysis and RNA-seq. *PLoS One*, 8(2):e56535.

Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, López JA. 2005. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood*, 106:1604-11.

Dragovic RA, Gardiner C, Brooks AS, Tannetta DS, Ferguson DJ, Hole P, Carr B, Redman CW, Harris AL, Dobson PJ, Harrison P, Sargent IL. 2011. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using nanoparticle tracking analysis. *Nanomedicine*, 7:780-788.

Ellington JE. 1991. The bovine oviduct and its role in reproduction: a review of the literature. *Cornell Vet*, 81:313-328.

Ellington JE, Ignotz GG, Ball BA, Meyers-Wallen VN, Currie WB. 1993. De novo protein synthesis by bovine uterine tube (oviduct) epithelial cells changes during co-culture with bull spermatozoa. *Biol Reprod*, 48:851-856.

Fazeli A, Duncan AE, Watson PF, Holt WV. 1999. Sperm-oviduct interaction: induction of capacitation and preferential binding of uncapacitated spermatozoa to oviductal epithelial cells in porcine species. *Biol Reprod*, 60:879-886.

Fazeli A, Elliott RM, Duncan AE, Moore A, Watson PF, Holt WV. 2003. In vitro maintenance of boar sperm viability by a soluble fraction obtained from oviductal apical plasma membrane preparations. *Reproduction*, 125:509-517.

Fazeli A, Affara NA, Hubank M, Holt WV. 2004. Sperm-induced modification of the oviductal gene expression profile after natural insemination in mice. *Biol Reprod*, 71:60-65.

Feng D, Zhao WL, Ye YY, Bai XC, Liu RQ, Chang LF, Zhou Q, Sui SF. 2010. Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic*, 11:675-687.

Freeman DA, Weber JA, Geary RT, Woods GL. 1991. Time of embryo transport through the mare's oviduct. *Theriogenology*, 36:823-830.

Forde N, Carter F, Spencer TE, Bazer FW, Sandra O, Mansouri-Attia N, Okumu LA, McGettigan PA, Mehta JP, McBride R, O'Gaora P, Roche JF, Lonergan P. 2011. Conceptus-induced changes in the endometrial transcriptome: how soon does the cow

know she is pregnant? *Biol Reprod*, 85:144-156.

Forde N, Duffy GB, McGettigan PA, Browne JA, Mehta JP, Kelly AK, Mansouri-Attia N, Sandra O, Loftus BJ, Crowe MA, Fair T, Roche JF, Lonergan P, Evans AC. 2012. Evidence for an early endometrial response to pregnancy in cattle: both dependent upon and independent of interferon tau. *Physiol Genomics*, 44:799-810

Forde N, McGettigan PA, Mehta JP, O'Hara L, Mamo S, Bazer FW, Spencer TE, Lonergan P. 2014. Proteomic analysis of uterine fluid during the pre-implantation period of pregnancy in cattle. *Reproduction*, 147:575-587.

Gandolfi F, Brevini TA, Moor RM. 1989. Effect of oviduct environment on embryonic development. *J Reprod Fertil Suppl*, 38:107-115.

Georgiou AS, Sostaric E, Wong CH, Snijders AP, Wright PC, Moore HD, Fazeli A. 2005. Gametes alter the oviductal secretory proteome. *Mol Cell Proteomics*, 4:1785-1796.

Georgiou AS, Snijders AP, Sostaric E, Aflatoonian R, Vazquez JL, Vazquez JM, Roca J, Martinez EA, Wright PC, Fazeli A. 2007. Modulation of the oviductal environment by gametes. *J Proteome Res*, 6:4656-4666.

Gómez E, Caamaño JN, Corrales FJ, Díez C, Correia-Álvarez E, Martín D, Trigal B, Carrocera S, Mora MI, Pello-Palma J, Moreno JF, Muñoz M. 2013. Embryonic sex induces differential expression of proteins in bovine uterine fluid. *J Proteome Res*, 12:1199-1210.

György B, Szabó TG, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, László V, Pállinger E, Pap E, Kittel A, Nagy G, Falus A, Buzás EI. 2011. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci*, 68(16):2667-2688.

Hamilton WJ, Laing JA. 1946. Development of the eggs of the cow to the stage of blastocyst formation. *J Anat*, 80:194-204.

He L, Hannon GJ. 2004. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*, 5:522-531.

Holst PJ. 1974. The time of entry ova into the uterus of the ewe. *J Reprod Fertil*, 36:427-428.

Holt WV, Fazeli A. 2010. The oviduct as a complex mediator of mammalian sperm function and selection. *Mol Reprod Dev*, 77:934-943.

Hou J, Liu L, Lei T, Cui X, An X, Chen Y. 2007. Genomic DNA methylation patterns in bovine preimplantation embryos derived from in vitro fertilization. *Sci China C Life Sci*, 50:56-61.

Hunter RH. 1980. *Physiology and Technology of Reproduction in Female Domestic Animals*. London, UK: Academic Press.

Hunter RH, Nichol R. 1983. Transport of spermatozoa in the sheep oviduct: preovulatory sequestering of cells in the caudal isthmus. *J Exp Zool*, 228:121-128.

Hunter RH. 2005. The Fallopian tubes in domestic mammals: how vital is their physiological activity? *Reprod Nutr Dev*, 45:281-290.

James WH. 2009. The variations of human sex ratio at birth during and after wars, and their potential explanations. *J Theor Biol*, 257:116-123.

Klein C, Bauersachs S, Ulbrich SE, Einspanier R, Meyer HH, Schmidt SE, Reichenbach HD, Vermehren M, Sinowatz F, Blum H, Wolf E. 2006. Monozygotic twin model reveals novel embryo-induced transcriptome changes of bovine endometrium in the preattachment period. *Biol Reprod*, 74:253-264.

Lazaraviciute G, Kauser M, Bhattacharya S, Haggarty P, Bhattacharya S. 2014. A systematic review and meta-analysis of DNA methylation levels and imprinting disorders in children conceived by IVF/ICSI compared with children conceived spontaneously. *Hum Reprod Update*, 20:840-852.

Le Bouc Y, Rossignol S, Azzi S, Steunou V, Netchine I, Gicquel C. 2010. Epigenetics, genomic imprinting and assisted reproductive technology. *Ann Endocrinol (Paris)*, 71:237-238.

Lee KF, Yao YQ, Kwok KL, Xu JS, Yeung WS. 2002. Early developing embryos affect the gene expression patterns in the mouse oviduct. *Biochem Biophys Res Commun*, 292:564-570.

Lian J, Zhang X, Tian H, Liang N, Wang Y, Liang C, Li X, Sun F. 2009. Altered microRNA expression in patients with nonobstructive azoospermia. *Reprod Biol Endocrinol*, 7:13.

Maillo V, Ó Gaora P, Forde N, Besenfelder U, Havlicek V, Burns GW, Spencer TE, Gutierrez-Adan A, Lonergan P, Rizos D. 2015. Oviduct-embryo interactions in cattle: two-way traffic or a one-way street? *Biol Reprod*, 92:144.

Mansouri-Attia N, Sandra O, Aubert J, Degrelle S, Everts RE, Giraud-Delville C, Heyman Y, Galio L, Hue I, Yang X, Tian XC, Lewin HA, Renard JP. 2009. Endometrium as an early sensor of in vitro embryo manipulation technologies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(14):5687-5692.

Marston JH, Penn R, Sivelle PC. 1977. Successful autotransfer of tubal eggs in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *J Reprod Fertil*, 49(1):175-176.

Muñoz M, Corrales FJ, Caamaño JN, Díez C, Trigal B, Mora MI, Martín D, Carrocera S, Gómez E. 2012. Proteome of the early embryo-maternal dialogue in the cattle uterus. *J Proteome Res*, 11:751-766.

Ng YH, Rome S, Jalabert A, Forterre A, Singh H, Hincks CL, Salamonsen LA. 2013. Endometrial exosomes/microvesicles in the uterine microenvironment: a new paradigm for embryo-endometrial cross talk at implantation. *PLoS One*, 8(3):e58502.

Oxenreider SL, Day BN. 1965. Transport and cleavage of ova in swine. Journal of Animal Science, 24:413-417.

Parolini I, Federici C, Raggi C, Lugini L, Palleschi S, De Milito A, Coscia C, Iessi E, Logozzi M, Molinari A, Colone M, Tatti M, Sargiacomo M, Fais S. 2009. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *J Biol Chem*, 284(49):34211-

34222.

Pomeroy RW. 1955. Ovulation and the passage of the ova through the fallopian tubes in the pig. *J Agric Sci*, 45:327-330.

Rafferty KA. 1970. *Methods in Experimental Embryology of the Mouse*. Baltimore, MD: The John Hopkins Press.

Reis e Silva AR, Bruno C, Fleurot R, Daniel N, Archilla C, Peynot N, Lucci CM, Beaujean N, Duranthon V. 2012. Alteration of DNA demethylation dynamics by in vitro culture conditions in rabbit pre-implantation embryos. *Epigenetics*, 7:440-446.

Rizos D, Clemente M, Bermejo-Alvarez P, de La Fuente J, Lonergan P, Gutiérrez-Adán A. 2008. Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and quality. *Reprod Domest Anim*, 43(suppl. 4):44-50.

Rizos D, Ramirez MA, Pintado B, Lonergan P, Gutierrez-Adan A. 2010. Culture of bovine embryos in intermediate host oviducts with emphasis on the isolated mouse oviduct. *Theriogenology*, 73:777-785.

Rottmayer R, Ulbrich SE, Kölle S, Prelle K, Neumueller C, Sinowatz F, Meyer HH, Wolf E, Hiendleder S. 2006. A bovine oviduct epithelial cell suspension culture system suitable for studying embryo-maternal interactions: morphological and functional characterization. *Reproduction*, 132:637-648.

Ruiz-González I, Xu J, Wang X, Burghardt RC, Dunlap KA, Bazer FW. 2015. Exosomes, endogenous retroviruses and toll-like receptors: pregnancy recognition in ewes. *Reproduction*, 149:281-291.

Saadeldin IM, Kim SJ, Choi YB, Lee BC. 2014. Improvement of cloned embryos development by co-culturing with parthenotes: a possible role of exosomes/microvesicles for embryos paracrine communication. *Cell Reprogram*, 16:223-234.

Schmaltz-Panneau B, Cordova A, Dhorne-Pollet S, Hennequet-Antier C, Uzbekova S, Martinot E, Doret S, Martin P, Mermillod P, Locatelli Y. 2014. Early bovine embryos regulate oviduct epithelial cell gene expression during in vitro co-culture. *Anim Reprod Sci*, 149:103-116.

Sohel MM, Hoelker M, Noferesti SS, Salilew-Wondim D, Tholen E, Looft C, Rings F, Uddin MJ, Spencer TE, Schellander K, Tesfaye D. 2013. Exosomal and non-exosomal transport of extra-cellular microRNAs in follicular fluid: implications for bovine oocyte developmental competence. *PLoS One*, 8(11):e78505.

Suntres ZE, Smith MG, Momen-Heravi F, Hu J, Zhang X, Wu Y, Zhu H, Wang J, Zhou J, Kuo WP. 2013. Therapeutic uses of exosomes. *Exosomes Microvesicles*, 1(5):1-8.

Thomas PG, Ignotz GG, Ball BA, Brinsko SP, Currie WB. 1995. Effect of coculture with stallion spermatozoa on de novo protein synthesis and secretion by equine oviduct epithelial cells. *Am J Vet Res*, 56:1657-1662.

Turiák L, Misják P, Szabó TG, Aradi B, Pálóczi K, Ozohanics O, Drahos L, Kittel A, Falus A, Buzás EI, Vékey K. 2011. Proteomic characterization of thymocyte-derived microvesicles and apoptotic bodies in BALB/c mice. *J Proteomics*, 74:2025-2033.

Van Soom A, Rijsselaere T, Filliers M. 2014. Cats and dogs: two neglected species in this era of embryo production in vitro? *Reprod Domest Anim*, 49(suppl. 2):87-91.

Yeste M, Holt WV, Bonet S, Rodríguez-Gil JE, Lloyd RE. 2014. Viable and morphologically normal boar spermatozoa alter the expression of heat-shock protein genes in oviductal epithelial cells during co-culture in vitro. *Mol Reprod Dev*, 81:805-81

Produção *in vivo* e *in vitro* de embrião bovino
Atualizações sobre estratégias de produção de embriões

P.S. Baruselli[1,7], L.M. Vieira[1], E.O.S. Batista[1], R.M. Ferreira[1], J.N.S. Sales[2], L.U. Gimenes[3], J.R.S. Torres-Junior[4], C.M. Martins[5], M.F. Sá Filho[1], G.A. Bo[6]

[1]Departamento de Reprodução Animal, USP, São Paulo, SP, Brasil.
[2]Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil.
[3]Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, FCAV-UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.
[4]Centro agrário e de ciência ambiental, Universidade Federal do Maranhão, CCAA-UFMA, Chapadinha, MA, Brasil.
[5]Fertiliza Consultoria, Poços de Caldas, MG, Brasil.
[6]Instituto de Reprodução Animal Córdoba (IRAC), Córdoba, Argentina.

Resumo

As tecnologias de produção de embriões são utilizadas para aumentar o ganho genético através de linhagens materna e paterna. Avanços no controle da emergência da nova onda de crescimento folicular ovariana, superestimulação e ovulação em momentos pré-determinados têm facilitado o manejo de doadoras e receptoras. No entanto, esses procedimentos podem ser influenciados por diversos fatores relacionados aos animais e seu manejo. Portanto, pesquisas continuam a investigar condições de ambiência e tratamentos reprodutivos ideais para manter a viabilidade das técnicas e sua aplicabilidade a campo.

Palavras-chave: PIV; TE; SOV; Sincronização; OPU;

Introdução

Dentre as tecnologias reprodutivas, a produção de embriões *in vivo* e *in vitro* têm sido ferramentas robustas usadas para aumentar o ganho genético através de linhagens maternas e paternas. No entanto, ainda existe a necessidade de simplificar o tratamento superovulatório bovina (SOV) para a produção de embrião *in vivo*, especificamente através da redução do número de manejos dos animais, sem comprometer a eficiência da técnica. Avanços no controle da emergência da nova onda de crescimento folicular ovariana e ovulação com tratamentos em momentos pré-determinados têm facilitado o manejo de doadoras e receptoras. No entanto, esses procedimentos podem ser influenciados por vários fatores relacionados aos animais e seu manejo (Baruselli et al., 2010, Baruselli et al., 2006, Bó et al., 2006, Mapletoft et al., 2002, Vasconcelos et al., 2006). Portanto, pesquisas continuam a investigar as condições de ambiência e tratamentos reprodutivos ideais para manter a viabilidade das técnicas e sua aplicabilidade a campo.

Atualmente, 40,6% da produção mundial de embriões (1.275.874 embriões) são derivados de embriões *in vitro* (IETS, 2014). O sucesso da produção de embriões *in vitro* (PIV) está diretamente relacionado ao número e qualidade do complex cumulus-oócito (CCO) resultado do procedimento de aspiração folicular (OPU). Por essa razão, vários estudos têm sido realizados para obter os conhecimentos relacionados a qualidade dos oócitos e, consequentemente, aumentar os resultados de programas de OPU-PIV em larga escala.

Nesse contexto, a presente revisão visa discutir alguns pontos-chave relacionacionados a genética, raça, população folicular antral, manipulação do crescimento folicular ovariano, frequência de procedimentos de OPU e fatores extrínsicos (nutrição e estresse calórico) os quais são associados a qualidade oocitária e embrionária durante a produção *in vivo* e *in vitro* de embriões. Por fim, com essa atenção aos fatores relacionados a eficiência da OPU-PIV, estratégias para otimizar a tecnologia e seus resultados serão discutidos.

Estratégias para produção *in vivo* de embriões

Superovulação de doadoras Bos taurus e Bos indicus sem deteção de estro

Protocolos tradicionais de SOV possuem algumas limitações, incluindo a necessidade de muitos manejos e detecção de estro para estabelecer o estágio do ciclo estral para o início dos tratamentos superestimulatórios e para determinar o momento da inseminação artificial (IA). Entretanto, recentes protocolos têm sido designados para controlar a emergência da onda de crescimento folicular e ovulação, permitindo o início dos tratamentos superovulatórios e a IA de doadoras em um momento pré-determinado (Bó *et al.*, 2006). Protocolos para SOV sem detecção de estro são especialmente importantes quando trabalhando com doadoras *Bos indicus* e vacas *Bos taurus* de alta produção leiteira, devido às dificuldades para detecção de estro desses animais (Baruselli et al., 2006, Lopez, 2005).

Portanto, três aspectos importantes devem ser considerados durante o desenvolvimento dos protocolos de SOV: 1) controle da dinâmica folicular ovariana e emergência da nova onda de crescimento folicular para iniciar os tratamentos com gonadotropina; 2) tempo de indução de ovulação e IA nas doadoras superestimuladas; e 3) tipo (FSH ou eCG), dosagem, e frequência de tratamentos com gonadotropina utilizados para SOV.

Sincronização da emergência da onda folicular para iniciar tratamentos com gonadotropina

Emergência da onda folicular para SOV pode ser controlada mecanicamente (ablação do folículo; (Kohram et al., 1998) ou farmalogicamente (GnRH; (Kohram et al., 1998), LH, hCG, ou estradiol mais progesterona (Bo *et al.*, 1995). Em geral, o tratamento mais comum para induzir a emergência da onda folicular envolve o uso de

Autor para correspondência: barusell@usp.br

estradiol e progesterone (P4), especialmente em gado *Bos indicus*, devido ao seu anestro prolongado e baixa resposta ao tratamento com GnRH em estágios aleatórios do ciclo estral (Baruselli *et al.*, 2003). A eficácia da administração de estradiol e P4, seguida pelo início do tratamento com FSH no momento esperado da emergência da onda folicular (4 dias após), tem sido demonstrada em diversos estudos com *Bos taurus* (revisado por Bó et al. (2006)) e *Bos indicus* (Nogueira *et al.*, 2002) cattle. Independente do estágio do ciclo estral, o tratamento com benzoato de estradiol (BE) na administração de P4 (seja um implante auricular de norgestomet ou implante intravaginal de P4) induz a emergência de uma nova onda de crescimento folicular sincronizada aproximadamente de 3 a 4 dias após o tratamento (revisado por Baruselli et al. (2006). Portanto, o tratamento com estradiol e P4 tem sido considerado a associação de eleição para sincronizar a emergência da onda folicular em rebanhos bovinos (Bó *et al.*, 2002).

Momento da indução de ovulação e IA em doadoras superestimuladas

Embora o controle da emergência da onda folicular permita o início pré-determinado de tratamentos com gonadotropina para superestimulação, a necessidade de detecção de estro para realizar a IA em doadoras superestimuladas continua um importante desafio. Portanto, diversos estudos têm sido conduzidos para investigar o controle farmacológico do momento da ovulação em vacas superestimulada, permitindo a inseminação artificial em tempo fixo (IATF). O intervalo para a ovulação pode ser controlado atrasando a remoção do implante de progesterona e administração de GnRH/LH ao final do protocolo de SOV (Bó *et al.*, 2002). Além disso, adiar o pico de LH em relação aos tratamentos de PGF2α, permite que mais folículos adquiram capacidade de ovulação, e consequentemente maior produção de embriões (Rieger *et al.*, 1990, Vos *et al.*, 1994).

Estudos dirigidos para o desenvolvimento de protocolos de SOV que permitam IATF em várias raças bovinas tratadas com dispositivos P4 e BE no início do protocolo (Dia 0) foram relatados (Baruselli et al., 2006, Bó et al., 2006). Os protocolos são denominados conforme o intervalo entre o primeiro tratamento com PGF2α e o momento da remoção da fonte de P4 (por exemplo, P-24 e P-36), que ocorre antes da indução da ovulação para evitar o efeito deletério da alta concentração de P4 na qualidade do oócito e transporte dos espermatozóides durante o período de ovulação (Barros et al., 2010, Nogueira et al., 2002). Não houve diferenças significativas no número e qualidade de embriões transferíveis entre os tratamentos P-24 e P-36 (Baruselli *et al.*, 2006). Portanto, ambos os tratamentos podem ser utilizados para superovular vacas *Bos taurus* e *Bos indicus* com IATF.

No entanto, devido às diferenças no diâmetro do foliculo dominante no momento da divegência e ovulação em vacas Nelore (menor) e Holandesas (maior) (Gimenes et al., 2008, Sartori et al., 2001), entende-se que o momento apropriado para indução da ovulação pode diferir. Portanto, tratamento com GnRH ou LH para induzir ovulação para IATF em vacas doadoras superestimuladas *Bos indicus* e *Bos taurus* deve ser feito 12 e 24h, respectivamente, após o último tratamento com FSH (Baruselli et al., 2006, Bó et al., 2006).

Tipo (FSH ou eCG), dosagem, e número de tratamentos com gonadotropina utilzadoss para superovulação

Uma série de estudos foram conduzidos visando reduzir o número de manejos durante SOV em doadores *Bos indicus* (Baruselli *et al.*, 2008). O uso de 3 doses de FSH resultou em similar produção de embriões ao tradicional protocolo de 8 doses de FSH (Martins *et al.*, 2008). Com base nos estudos revisados acima, foi possível reduzir o número de manejos dos animais durante o protocol de SOV devido ao reduzido número de tratamentos de FSH em doadoras *Bos indicus*. Entretanto, resultados podem ser diferentes em vacas *Bos taurus*, as quais são menos sensíveis às gonadotropinas exógenas (Bó *et al.*, 2006).

Considerando a necessidade de desnvolver um protocolo de superestimulação simplificado, estudos têm focado em alternativas para manter a liberação de FSH durante um período prolongado em raças *Bos taurus.* Uma alternativa que tem sido estudada para a produção de embriões *in vivo* é o uso de uma única injeção de FSH diluído em solução 2% ácido hialurônico (polímero biodegradável;(Tríbulo et al., 2011).Vieira et al. (2015) também relatou concentrações de FSH elevadas durante período prolongado em novilhas Holandesas tratadas com FSH diluído em solução 0,5% de ácido hialurônico. Estudos anteriores relataram um número similar de embriões transferíveis quando uma única (em 2% de ácido hialurônico;(Tríbulo et al., 2011) ou duas (em 0,5 ou 1% de ácido hialurônico;(Tríbulo et al., 2012) injeções IM de FSH foram administradas comparado ao tratamento tradicional com duas injeções IM diárias de FSH.

A fim de reduzir o manejo da doadora, uma série de estudos foram designados para avaliar a resposta superestimulatória após uma única injeção intramuscular de gonadotropina coriônica equina (eCG) no protocolo P-36 com IATF em doadoras Nelore e Holandesas (revisado por Baruselli et al. (2008). O tratamento com eCG (1,500, 2,000 ou 2,500 IU) resultou em um número de embriões transferíveis similar comparado com oito doses decrescentes de FSH. Entretanto, uma dose de 2,500 IU de eCG resultou em uma série de grandes folículos anovulatórios observados no dia da recuperação de embriões em vacas Nelore. O tratamento de eCG efetivamente reduziu o manejo da doadora, mas as menores doses de eCG para SOV de vacas *Bos indicus* são recomendadas para evitar excessivas respostas superestimulatórias. Em vacas leiteiras *Bos taurus* (Holandesas; revisado por Baruselli et al. (2008), tratamentos com eCG (2,000 ou 2,500 IU) resultaram em um número de embriões transferíveis similar comparado a oito descrescentes doses de pFSH. Entretanto, tratamentos sucessivos com eCG (após a terceira seção) resultaram em produção de embriões reduzida. Com base nessa revisão, nós concluímos que é possível SOV doadoras com única dose de eCG, porém redução na produção de embriões seja provável com uso contínuo desse tratamento.

Estratégias para produção *in vitro* de embriões

Manipulação da dinâmica folicular

Diferentes biotecnologias reprodutivas têm sido utilizadas para manipular a dinâmica folicular e melhorar os resultados de OPU-PIV. A dinâmica da onda folicular ovariana anterior a OPU pode ser manipulada mecanicamente (ablação do folículo) ou farmalogicamente (GnRH, LH, hCG ou estradiol mais P4). Após a ablação do folículo, uma nova onda folicular emergirá 1 a 1,5 dias após (Adams *et al.*, 1992). Após o tratamento de E2/P4, uma nova onda folicular emergirá 3 a 4 dias após o tratamento (Bó et al., 2002, Sá Filho et al., 2012). Martins *et al.* (2012) avaliou o efeito da sincronização da emergência da onda folicular em vacas Nelore (*Bos indicus*), Brangus (*Bos indicus x Bos taurus*) e Holandesas (*Bos taurus*) no sucesso de programas de OPU-PIV. Doadoras foram divididas em quarto grupos: controle (OPU em dia aleatório do ciclo estral), D1 (OPU 1 dia após a emergência da onda folicular), D1+bST (OPU 1 dia após a emergência da onda folicular associada a administração de bST no dia -5) e D1+eCG (OPU 1 dia após a emergência da onda folicular em associação com administração de 400 UI de eCG no dia -3). No geral, o tratamento com eCG resultou em maior número de oócitos viáveis em doadoras Brangus e Holandesas. Entretanto, o tratamento de eCG e bST resultou em um maior número de blastocistos por seção de OPU somente em doadoras Holandesas.

O efeito da ablação do folículo (aspiração de todos os folículos > 8 mm) ou BE+P4 para sincronizar a emergência da onda folicular anterior a OPU foi avaliada (Rodriguez *et al.*, 2011). Nesse estudo, o efeito da eCG ou FSH para superestimular o crescimento folicular, no número e qualidade de CCO obtido por OPU em doadoras Brangus e Angus foi avaliado. Nenhum efeito significativo da sincronização da onda folicular foi detectado no número total de folículos por OPU (14,8 ± 1,2 *vs.* 14,5 ± 1,4), número de CCO recuperados (8,3 ± 0,9 *vs.* 7,8 ± 1,0) ou número de CCO cultivados (5,3 ± 0,8 *vs.* 4,8 ± 0,8). Entretanto, maior número de folículos por OPU (18,2 ± 1,1 *vs.* 11,2 ± 1,0) e CCO recuperados (9,7 ± 1,0 *vs.* 6,3 ± 0,8) e cultivados (6,8 ± 0,8 *vs.* 3,3 ± 0,5) foi observado em vacas tratadas com FSH comparadas com eCG.

Em estudo recente, nosso grupo de pesquisa avaliou o efeito da superestimulação em doadoras Holandesas lactantes e não lactantes submetidas a sincronização da emergência da onda folicular (Vieira *et al.*, 2014a). Superestimulação com duas injeções diárias de FSH durante 2, previamente à OPU resultou em maior eficácia de OPU-PIV, desconsiderando a categoria da doadora (Tabela 1). Independentemente do tratamento de superestimulação, doadoras Holandesas não lactantes tiveram resultados de PIV superiores comparados aos de doadoras em lactação (Tabela 1). Um segundo experimento foi realizado para avaliar a eficácia de uma única injeção IM de FSH combinada com 0,5% de ácido hialurônico (MAP5®) em doadoras Holandesas não lactantes submetidas a OPU-PIV (Vieira et al., 2015). Independentemente do tipo de tratamento de superestimulação, maiores números de blastocistos foram produzidos por seção de OPU (P = 0,06) em doadoras recebendo FSH (Controle: 2,4 ± 0,5; 200 pFSH: 3,7 ± 0,7; 200 pFSHHA: 4,7 ± 0,7; 300 pFSHHA: 3,1 ± 0,6). Resultados demonstraram que protocolos de superestimulação para programas de OPU-PIV em doadoras Holandesas pode melhorar a qualidade do embrião, e isso pode ser realizado com menor número de manejos (6 para 3) quando o FSH é administrado juntamente com a solução de 0.5% de ácido hialurônico.

Fatores que influenciam a eficiência de programas de OPU-PIV

Em bovinos, fatores como genética ou raça, estresse térmico, nutrição e estágio do ciclo estral podem influenciar significativamente a resposta a diferentes biotecnologias de reprodução. Por exemplo, em relação a OPU-PIV, têm sido relatado que a PIV é maior em raças *Bos indicus* do que em raças *Bos taurus* (Guerreiro et al., 2014, Pontes et al., 2010). A maior população de foliculos antrais encontrada em fêmeas *Bos indicus* sugere o maior número de oócitos viáveis para produção *in vitro* (Batista *et al.*, 2014). Nesse contexto, relatos demonstram que fêmeas *Bos indicus* apresentam maior número de CCO e maior taxa de blastocistos ((Gimenes et al., 2015); Tabela 2) do que fêmeas *Bos taurus*.

Tabela 1. Produção de oócito e embrião (média + EPM) após OPU-PIV em doadoras da raça Holandesa (lactantes e não lactantes) submetidas ou não ao tratamento superstimulatório com FSH.

	Vacas lactantes		Vacas não lactantes		*Valor de P* [5]		
	Controle	FSH	Controle	FSH	Tratamento	Categ	Trat*Categ
No.	15	15	15	15	.	.	.
Folículos aspirados	17,6 ± 1,6	18,2 ± 2,1	16,7 ± 1,5	16,3 ± 1,6	0,92	0,52	0,62
Oócitos recuperados	13,0 ± 1,7	10,7 ± 1,5	10,9 ± 1,6	9,9 ± 1,5	0,10	0,51	0,54
Taxa de recuperação, %[1]	73,9 (195/264)	59,0 (161/273)	65,6 (164/250)	61,1 (149/244)	<0,001	0,89	0,08
CCOs viáveis	10,0 ± 1,3	8,9 ± 1,3	8,5 ± 1,4	8,3 ± 1,3	0,52	0,58	0,57
Taxa CCOs viáveis, %[2]	76,9 (150/195)	82,6 (133/161)	78,0 (128/164)	83,9 (125/149)	0,05	0,77	0,88
Taxa de clivagem, %[3]	65,3 (98/150)	63,2 (84/133)	72,7 (93/128)	72,8 (91/125)	0,81	0,16	0,69
Taxa de blastocisto, %[4]	10,8 (15/150)	17,3 (23/133)	31,3 (40/168)	52,8 (66/125)	<0,001	0,001	0,16
Embriões por OPU	1,0 ± 0,4	1,5 ± 0,5	2,7 ± 0,6	4,4 ± 0,8	0,01	0,003	0,17

[1]No. CCOs /no. folículos aspirados; [2]No. CCOs viáveis /no. CCOs recuperados; [3]No. Zigotos clivados /no. oócitos viáveis; [4]No. blastocistos /no. oócitos viáveis; [5]Tratamento = efeito de tratamento (Controle *vs*. FSH); Categ = efeito da status de lactação da doadora (lactantes *vs*. não-lactante); Trat*Categ = interação tratamento e status de lactação da doadora. Adaptado de Vieira *et al*. (2014a).

Tabela 2. Efeito do grupo genético na recuperação e qualidade dos oócitos e na competência de desenvolvimento *in vitro* em doadoras novilhas *Bos indicus* (Nelore) e *Bos taurus* (Holstein).

	Grupo genético	
	Nelore (n = 9)	Holstein (n = 9)
Réplicas	6	6
Seções de OPU	54	54
Recuperação e qualidade oocitária		
Folículos vizualizados	41,0 ± 2,1[a]	22,1 ± 1,3[b]
Total de oócitos	37,1 ± 2,6[a]	15,4 ± 1,2[b]
Taxa de recuperação (%)	82,3[a]	66,8[b]
Oócitos submetidos ao cultivo	25,6 ± 1,8[a]	9,1 ± 0,9[b]
Competência de desenvolvimento *in vitro*		
Estruturas clivadas	21,1 ± 1,6[a]	5,2 ± 0,5[b]
Taxa de clivagem (%)	82,6[a]	59,9[b]
Blastocistos 7 d após FIV	7,3 ± 0,9[a]	1,1 ± 0,2[b]
Taxa de blastocisto (%)	28,3[a]	14,1[b]

[a,b]P < 0.05. Adaptado de Gimenes *et al.* (2015).

Um fator relacionado a menor eficiência das fêmeas taurinas em programas de PIV pode ser parcialmente atribuído ao estresse térmico (Al-Katanani and Hansen, 2002,, Ferreira et al., 2011), principalmente em regiões tropicais. Entretanto, relatos prévios também têm mostrado que o estresse térmico pode exercer um efeito deletétio na dinâmica folicular ovariana e na competência oocitária também em gado *Bos indicus* (Torres-Júnior *et al.*, 2008).

Um experimento prévio demonstrou que uma vez que os oócitos ovarianos são comprometidos por estresse térmico, dois ou três ciclos estrais são requeridos (após o fim do estresse térmico) para restaurar os foliculos e a qualidade oocitária (Roth *et al.*, 2001). Entretanto, o estudo descrito acima (Torres-Júnior *et al.*, 2008) mostrou efeito prolongado do estresse térmico na produção de blastocistos, até 105 dias após o fim do estresse térmico (Fig. 1). Portanto, parece que os foliculos e oócitos são comprometidos pelo estresse termico já nos estágios iniciais da foliculogênese, com efeito deletério prolongado na função ovariana. Contudo, raças *Bos indicus* têm mostrado ser mais resistentes às condições tropicais (isto é, elevada temperatura e umidade) do que raças que evoluiram em climas temperados (isto é, *Bos taurus*, como Holandesas). Essencialmente, a adaptação de certas raças para elevada temperaturae umidade é relacionada a sua habilidade de termoregulação corpórea (Bennett et al., 1985, Gaughan et al., 1999, Hammond et al., 1996).

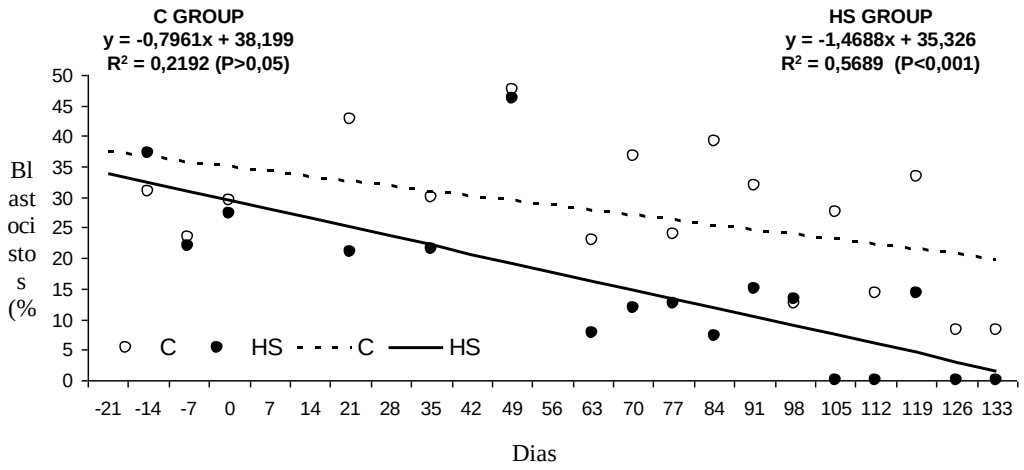

Figura 1. Porcentagem de blastocistos e equação ajustada de regressão de oócitos recuperados de vacas Gyr (*Bos indicus*) expostas a tratamentos de thermoneutralidade (C) ou estresse térmico (HS). Adaptado de Torres-Júnior *et al.* (2008).

O estresse térmico também tem efeito deletério na resposta superovulatória de doadoras Holandesas. Em uma recente análise retrospectiva, Vieira *et al*. (2014b) relatou efeito negativo da estação quente no Brasil no número de embriões produzidos *in vivo* (2,8 ± 0,3 *vs*. 4,4 ± 0,4; P = 0,03) e porcentagem de embriões classificados como grau I e II (21,4 *vs*. 32,8%, P < 0,0001) em doadoras Holandesas. Ainda, Ferreira *et al*. (2011) relatou diminuição em números de CCO em vacas Holandesas quando a OPU foi realizada durante os meses do verão. Também, quando taxas de blastocistos foram avaliadas, uma interação entre grupos e estações indicaram que os efeitos da estação são dependentes da categoria animal. No verão, a taxa de blastocisto foi inferior em vacas repetidoras (usualmente fêmeas durante o final da lactação) em comparação com inverno, tornando-se menor do que em vacas em pico de lactação. Entretanto, desconsiderando a estação, a taxa de blastocisto foi menor em vacas repetidoras de serviço do que em novilhas. Adicionalmente, blastocistos de vacas repetidoras tiveram qualidade comprometida em comparação a novilhas e vacas em pico de lactação durante o verão.

Um aspecto comum de programas comerciais de OPU-PIV é o uso de vacas não lactantes ou em lactação tardia como doadoras de oócitos. Nesses animais, em adição aos efeitos do estresse térmico, a dieta também pode influenciar a PIV. Nessa categoria animal, os efeitos negativos da ingestação excessiva pode comprometer a competência de desenvolvimento *in vitro* dos oócitos, especialmente em fêmeas com alto escore de condição corporal (Adamiak, 2005). Os mecanismos relacionados aos efeitos negativos da competência oocitária podem ser relacionados a alterações endócrinas, como hyperinsulinemia, resistência de insulin periférica, e aumento de glicose e IGF-I, que pode interferer no transporte de glicose em células embrionárias e aumentar apoptose.

O estado nutricional e metabólico pode interferer com padrões de crescimento folicular, secreção de hormônios reprodutivos, e qualidade oocitária em bovinos (Ashworth et al., 2009, Batista et al., 2013, Leroy et al., 2008, Sales et al., 2015). Assim, desbalanços metabólicos podem causar alterações sistêmicas que podem comprometer o sucesso de biotecnologias reprodutivas, como OPU-PIV (Adamiak, 2005, Webb et al., 2004). Nosso grupo de pesquisa conduziu um estudo para avaliar o impacto de diferentes energias fornecidas em perfis metabólicos e qualidade oocitária em vacas Gyr não lactnates (*Bos indicus*) submetidas a sucessivas seções de OPU (Sales *et al*., 2015). Dietas foram formuladas para atingir mantença (M) ou 1,7% de mantença (1,7M) para vacas não lactantes. Foi observado que 60 dias após alimentação com alta energia, vacas tiveram reduzida competência oocitária *in vitro* (Fig. 2). Todas as vacas alimentadas com dietas de alta energia tiveram maiores concentrações de glicose e insulina e maior nível de resistência a insulina como determinado pelo teste de tolerância a glicose. Além disso, vacas recebendo dietas com alta energia tiveram uma menor abundância de genes transcritos em oócitos para GLUT 1, IGF 1R, IGF 2R e HSP70.1.

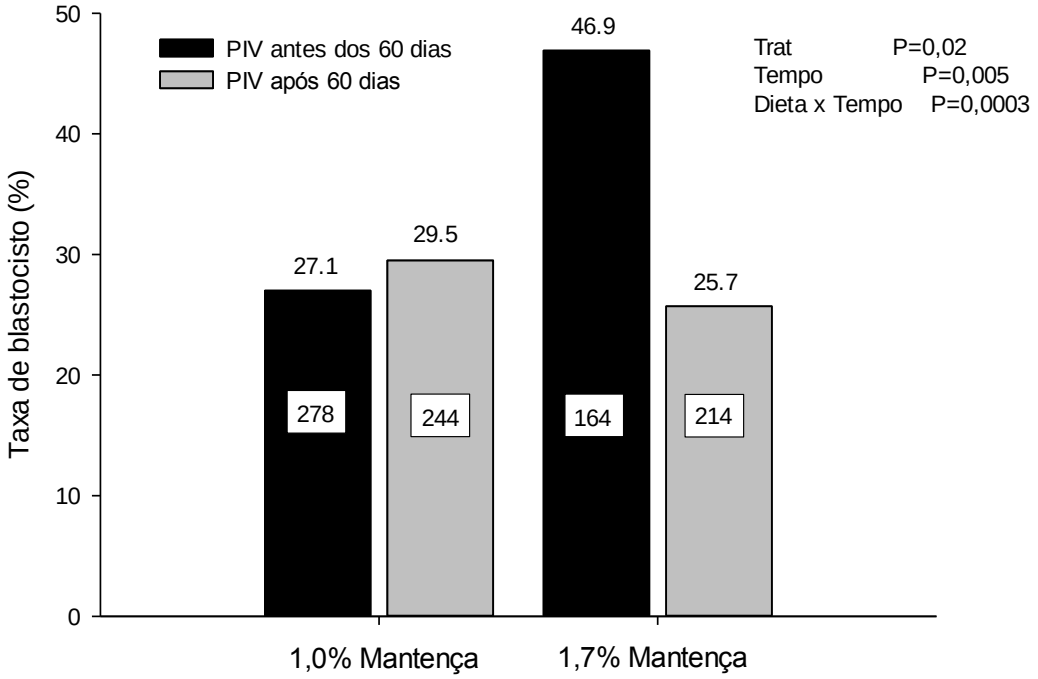

Figura 2. Produção *in vitro* de embriões em vacas não lactantes (n = 14) com dieta para suprir 100 ou 170% da energia de mantença e submetidas a nove seções de OPU a cada 14 dias. Adaptado de Sales *et al*. (2015).

O estágio do ciclo estral no momento da OPU também pode influenciar a taxa de recuperação, qualidade oocitária e produção de embriões *in vitro* (Hendriksen et al., 2000, Machatkova et al., 2004, Merton et al., 2003, Vassena et al., 2003). O número de CCO recuperado foi maior quando a OPU foi realizada durante a fase inicial da onda folicular (Machatkova *et al.*, 2004), provavelmente devido a maior taxa de recuperação após a aspiração de pequenos folículos (4 mm; (Seneda et al., 2001). Entretanto, apesar da menor taxa de recuperação, maior competência oocitária foi observada quando oócitos foram obtidos durante a fase inicial de dominância do folículo dominante (Hendriksen et al., 2004, Merton et al., 2003, Vassena et al., 2003). Similarmente, estágios da onda folicular afetaram os números de oócitos recuperados e competência oocitária seguindo OPU em vacas Nelore (Melo, 2007). Maiores números de CCO foram recuperados e a produção de embriões *in vitro* foi maior quando vacas Nelore foram submetidas a OPU nos dias 3 e 5 comparado com dias 7 e 9 após a emergência da onda folicular.

Com base em protocolos descritos acima, nosso grupo de pesquisa projetou um ensaio para avaliar diferentes momentos relativos a emergência da onda folicular para realizar a OPU-PIV em novilhas cruzadas (*Bos taurus* x *Bos indicus*) (Gimenes *et al.*, 2007). A emergência da onda folicular foi sincronizada com BE e P4 em todas as doadoras e OPU foram realizadas 2, 4 e 6 dias após a emergência da onda folicular. Maior taxa de blastocisto e blastocisto eclodido e maior número de núcleos em blastocistos eclodidos foram observados quando a OPU foi realizada no dia 2 após a onda folicular. Entretanto, nenhum efeito no estágio da onda folicular foi observado seja em doadoras Holandesas (*Bos taurus*) ou Nelore (*Bos indicus*) em um estudo subsequente (Gimenes *et al.*, 2015).

Os inesperados efeitos do dia da onda folicular nas variáveis de OPU-PIV podem ser devido ao método de sincronização da emergência da onda folicular (sincronização farmacológica *vs.* ablação do folículo). Embora nosso propósito tenha sido promover um método mais prático de sincronização da emergência da onda folicular, a indução farmacológica da emergência da onda folicular pode resultar em uma população folicular cumulativa contendo folículos em regressão junto com o novo grupo folicular. Portanto, mais estudos devem ser conduzidos para esclarecer esse tema.

Conclusão

O sucesso da produção de embriões *in vivo* e *in vitro* é intimamente associada a qualidade oocitária e embrionária. Portanto, fatores relacionados a raça, estresse térmico e nutrição devem ser considerados antes da aplicação da SOV ou OPU-PIV à campo. Adequado controle de condições ambientais, manejo e nutricionais deveriam ser um dos requisitos basicos antes da implementação de qualquer biotecnologia reprodutiva. Por outro lado, estratégias estabelecidas para manipular a dinâmica da onda folicular (sincronização da emergência da onda folicular e superestimulação) pode otimizar a eficiência das técnicas de produção de embriões. Uma vez que essas biotecnologias sejam realizadas em larga escala de maneira eficiente, significativas melhorias no ganho genético podem ser realizadas trazendo produtividade e retorno econômico para a atividade.

Referências

Adamiak, S. J. 2005. Impact of Nutrition on Oocyte Quality: Cumulative Effects of Body Composition and Diet Leading to Hyperinsulinemia in Cattle. *Biology of Reproduction* 73(5):918-926.

Adams, G. P., R. L. Matteri, J. P. Kastelic, J. C. H. Ko, and O. J. Ginther. 1992. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility* 94(1):177-188.

Al-Katanani, Y. and P. Hansen. 2002. Induced thermotolerance in bovine two-cell embryos and the role of heat shock protein 70 in embryonic development. *Mol Reprod Dev* 62:174 - 180.

Al-Katanani, Y. M., F. F. Paula-Lopes, and P. J. Hansen. 2002. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 85(2):390-396.

Ashworth, C. J., L. M. Toma, and M. G. Hunter. 2009. Nutritional effects on oocyte and embryo development in mammals: implications for reproductive efficiency and environmental sustainability. Philosophical Transactions of the Royal *Society B: Biological Sciences* 364(1534):3351-3361.

Barros, C. M., R. L. Ereno, R. A. L. Simões, P. Fernandes, J. Buratini, and M. F. G. Nogueira. 2010. Use of knowledge regarding LH receptors to improve superstimulatory treatments in cattle. *Reprod Fertil Develop* 22:132-137.

Baruselli, P. S., R. M. Ferreira, M. F. S. Filho, L. F. T. Nasser, C. A. Rodrigues, and G. A. Bó. 2010. Bovine embryo transfer recipient synchronisation and management in tropical environments. *Reproduction, Fertility and Development* 22(1):67-74.

Baruselli, P. S., M. O. Marques, N. A. T. Carvalho, R. C. A. Berber, R. Valentim, A. F. Carvalho Filho, and W. P. Costa Neto. 2003. Dinâmica folicular e taxa de prenhez em novilhas receptoras de embrião (Bos taurus indicus x Bos taurus taurus) tratadas com o protocolo "Ovsynch" para inovulação em tempo fixo. Brazilian *Journal of Veterinary Research and Animal Science* 40:96-106.

Baruselli, P. S., C. M. Martins, J. N. S. Sales, and R. M. Ferreira. 2008. Recent advances in bovine superovulation. *Acta Sci Vet* 36:433–448.

Baruselli, P. S., M. F. Sá Filho, C. M. Martins, L. F. Nasser, M. F. G. Nogueira, C. M. Barros, and G. A. Bó. 2006. Superovulation and embryo transfer in Bos indicus cattle. *Theriogenology* 65(1):77-88.

Batista, E. O. S., G. G. Macedo, R. V. Sala, M. Ortolan, M. F. Sá Filho, T. A. Del Valle, E. F. Jesus, R. Lopes, F. P. Rennó, and P. S. Baruselli. 2014. Plasma Antimullerian Hormone as a Predictor of Ovarian Antral Follicular Population in Bos indicus (Nelore) and Bos taurus (Holstein) Heifers. *Reproduction in Domestic Animals* 49(3):448-452.

Batista, E. O. S., R. V. Sala, M. D. D. V. Ortolan, E. F. Jesus, T. A. Del Valle, G. G. Macedo, F. P. Renno, and P. S. Baruselli. 2013. Ovarian and endocrinology responses in Taurus and Zebu heifers submitted to

different nutrition challenges. *Animal Reproduction* 10(3):443.

Bennett, I. L., V. A. Finch, and C. R. Holmes. 1985. Time spent in shade and its relationship with physiological factors of thermoregulation in three breeds of cattle. *Applied Animal Behaviour Science* 13(3):227-236.

Bó, G. A., P. S. Baruselli, P. Chesta, and C. M. Martins. 2006. The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. *Theriogenology* 65:89-101.

Bo, G. A., G. P. Adams, R. A. Pierson, and R. J. Mapletoft. 1995. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology* 43:32–40.

Bó, G. A., P. S. Baruselli, D. Moreno, L. Cutaia, M. Caccia, R. Tríbulo, H. Tríbulo, and R. J. Mapletoft. 2002. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology* 57(1):53-72.

Ferreira, R. M., H. Ayres, M. R. Chiaratti, M. L. Ferraz, A. B. Araújo, C. A. Rodrigues, Y. F. Watanabe, A. A. Vireque, D. C. Joaquim, L. C. Smith, F. V. Meirelles, and P. S. Baruselli. 2011. The low fertility of repeat-breeder cows during summer heat stress is related to a low oocyte competence to develop into blastocysts. *Journal of Dairy Science* 94(5):2383-2392.

Gaughan, J. B., T. L. Mader, S. M. Holt, M. J. Josey, and K. J. Rowan. 1999. Heat tolerance of Boran and Tuli crossbred steers. J*ournal of animal science* 77(9):2398-2405.

Gimenes, L. U., M. L. Ferraz, R. G. Almeida, F. B. R. Dias, F. M. M. Pereira, A. B. Araújo, D. C. Joaquim, Y. Watanabe, F. V. Meirelles, M. P. Beltran, D. M. Pinheiro, G. P. Nogueira, J. R. S. Torres-Júnior, H. Ayres, and P. S. Baruselli. 2007. Efeito do dia de aspiração folicular em relação à emergência (2, 4 ou 6 dias) sobre a recuperação *in vivo* e a qualidade de oócitos bovinos - parte 1. *in Proc. 21th Brazilian Embryo Technology Society (SBTE) Annual Meeting.*

Gimenes, L. U., M. L. Ferraz, P. Fantinato-Neto, M. R. Chiaratti, L. G. Mesquita, M. F. Sá Filho, F. V. Meirelles, L. A. Trinca, F. P. Rennó, Y. F. Watanabe, and P. S. Baruselli. 2015. The interval between the emergence of pharmacologically synchronized ovarian follicular waves and ovum pickup does not significantly affect in vitro embryo production in Bos indicus, Bos taurus, and Bubalus bubalis. *Theriogenology* 83(3):385-393.

Gimenes, L. U., M. F. Sá Filho, N. A. T. Carvalho, J. R. S. Torres-Júnior, A. H. Souza, E. H. Madureira, L. A. Trinca, E. S. Sartorelli, C. M. Barros, J. B. P. Carvalho, R. J. Mapletoft, and P. S. Baruselli. 2008. Follicle deviation and ovulatory capacity in Bos indicus heifers. *Theriogenology* 69(7):852-858.

Guerreiro, B. M., E. O. S. Batista, L. M. Vieira, M. F. Sá Filho, C. A. Rodrigues, A. Castro Netto, C. R. A. Silveira, B. M. Bayeux, E. A. R. Dias, F. M. Monteiro, M. Accorsi, R. N. V. R. Lopes, and P. S. Baruselli. 2014. Plasma anti-mullerian hormone: an endocrine marker for in vitro embryo production from Bos taurus and Bos indicus donors. *Domestic Animal Endocrinology* 49(0):96-104.

Hammond, A. C., T. A. Olson, C. C. Chase, E. J. Bowers, R. D. Randel, C. N. Murphy, D. W. Vogt, and A. Tewolde. 1996. Heat tolerance in two tropically adapted Bos taurus breeds, Senepol and Romosinuano, compared with Brahman, Angus, and Hereford cattle in Florida. *Journal of animal science* 74(2):295-303.

Hendriksen, P. J., W. N. Steenweg, J. C. Harkema, J. S. Merton, M. M. Bevers, P. L. Vos, and S. J. Dieleman. 2004. Effect of different stages of the follicular wave on in vitro developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology* 61(5):909-920.

Hendriksen, P. J. M., P. L. A. M. Vos, W. N. M. Steenweg, M. M. Bevers, and S. J. Dieleman. 2000. Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. *Theriogenology* 53:11-20.

IETS. 2014. International embryo transfer society. Statistics and data retrieval committee report. *Embryo Transfer Newsletter* 32(4).

Kohram, H., H. Twagiramungu, D. Bousquet, J. Durocher, and L. A. Guilbault. 1998. Ovarian superstimulation after follicular wave synchronization with GnRH at two different stages of the estrous cycle in cattle. *Theriogenology* 49(1175-1186).

Leroy, J. L., T. Vanholder, A. T. Van Knegsel, I. Garcia-Ispierto, and P. E. Bols. 2008. Nutrient prioritization in dairy cows early postpartum: mismatch between metabolism and fertility? *Reproduction in Domestic Animals* 43:96-103.

Lopez, H. 2005. Reproductive Hormones and Follicular Growth During Development of One or Multiple Dominant Follicles in Cattle. *Biology of Reproduction* 72(4):788-795.

Machatkova, M., K. Krausova, E. Jokesova, and M. Tomanek. 2004. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo production. *Theriogenology* 61(2-3):329-335.

Mapletoft, R. J., K. B. Steward, and G. P. Adams. 2002. Recent advances in the superovulation in cattle. *Reproduction Nutrition Development* 42(6):601-611.

Martins, C. M., P. O. Reis, J. N. S. Sales, R. V. Sala, L. M. Vieira, and P. S. Baruselli. 2012. Efeito da sincronização da onda de crescimento folicular e do tratamento com bST ou eCG na OPU-PIV de doadoras Nelore, Brangus e Holandesas. *XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões:*403.

Martins, C. M., I. C. C. Santos, R. Valentim, J. N. S. Sales, P. O. Reis, G. A. Crepaldi, P. S. Baruselli, and M. J. D´occhio. 2008. Efeito da redução do número de administrações de fsh na resposta superovulatória e na produção de embriões de doadoras nelore. *acta sci vet.*

Melo, D. S. 2007. Produção in vitro de embriões derivados de oócitos obtidos em diferentes fases da onda folicular de vacas Nelore (Bos taurus indicus). in *Animal reproduction.* Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista-UNESP, Jaboticabal.

Merton, J. S., A. P. de Roos, E. Mullaart, L. de Ruigh, L. Kaal, P. L. Vos, and S. J. Dieleman. 2003. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology* 59(2):651-674.

Nogueira, M. F. G., B. J. Barros, A. B. Teixeira, L. A. Trinca, M. J. D'Occhio, and C. M. Barros. 2002. Embryo recovery and pregnancy rates after the delay of

ovulation and fixed time insemination in superstimulated beef cows. *Theriogenology* 57:1625-1634.

Pontes, J. H. F., K. C. F. Silva, A. C. Basso, A. G. Rigo, C. R. Ferreira, G. M. G. Santos, B. V. Sanches, J. P. F. Porcionato, P. H. S. Vieira, F. S. Faifer, F. A. M. Sterza, J. L. Schenk, and M. M. Seneda. 2010. Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from Bos taurus, Bos indicus, and indicus-taurus dairy cows using sexed sperm. *Theriogenology* 74(8):1349-1355.

Rieger, D., J. S. Walton, W. H. Johnson, and D. H. Coy. 1990. The effect of treatment with a LHRH antagonist on the quality of Day-7 embryos collected from superovulated Holstein heifers. *Theriogenology* 33:207.

Rodriguez, P., A. Tribulo, M. Ramos, F. L. Ongaratto, and G. A. Bó. 2011. Comparision of oocyte recovery rates and morphology obtained by opu after diferent hormonal treatments in cattle. in *Proc. XXVI World Buiatrics Congress*, Santiago - Chile.

Roth, Z., R. Meidan, A. Shaham-Albalancy, R. Braw-Tal, and D. Wolfenson. 2001. Delayed effect of heat stress on steroid production in medium-sized and preovulatory bovine follicles. *Reproduction* 121:745-751.

Sá Filho, M. F., L. Penteado, E. L. Reis, T. Souza Reis, K. N. Galvão, and P. S. Baruselli. 2012. Timed artificial insemination improves the reproductive performance of suckled beef cows subjected to breeding season. *Theriogenology submmited.*

Sales, J. N. S., L. T. Iguma, R. I. T. P. Batista, C. C. R. Quintão, M. A. S. Gama, C. Freitas, M. M. Pereira, L. S. A. Camargo, J. H. M. Viana, J. C. Souza, and P. S. Baruselli. 2015. Effects of a high-energy diet on oocyte quality and in vitro embryo production in Bos indicus and Bos taurus cows. *Journal of Dairy Science* 98(5):3086-3099.

Sartori, R., P. M. Fricke, J. C. P. Ferreira, O. J. Ginther, and M. C. Wiltbank. 2001. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biology of Reproduction* 65(5):1403-1409.

Seneda, M. M., C. R. Esper, J. M. Garcia, J. A. d. Oliveira, and R. Vantini. 2001. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. *Animal Reproduction Science* 67(1–2):37-43.

Torres-Júnior, J. R. d. S., M. d. F. A. Pires, W. F. de Sá, A. d. M. Ferreira, J. H. M. Viana, L. S. A. Camargo, A. A. Ramos, I. M. Folhadella, J. Polisseni, C. de Freitas, C. A. A. Clemente, M. F. de Sá Filho, F. F. Paula-Lopes, and P. S. Baruselli. 2008. Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in Bos indicus cattle. *Theriogenology* 69(2):155-166.

Tríbulo, A., D. Rogan, H. Tribulo, R. Tribulo, R. V. Alasino, D. Beltramo, I. Bianco, R. J. Mapletoft, and G. A. Bó. 2011. Superstimulation of ovarian follicular development in beef cattle with a single intramuscular injection of Folltropin-V. *Animal Reproduction Scienc*e 129(1-2):7-13.

Tríbulo, A., D. Rogan, H. Tríbulo, R. Tríbulo, R. J. Mapletoft, and G. A. Bó. 2012. Superovulation of beef cattle with a split-single intramuscular administration of Folltropin-V in two concentrations of hyaluronan. *Theriogenology* 77(8):1679-1685.

Vasconcelos, J. L. M., D. G. B. Demétrio, R. M. Santos, J. R. Chiari, C. A. Rodrigues, and O. G. S. Filho. 2006. Factors potentially affecting fertility of lactating dairy cow recipients. *Theriogenology* 65(1):192-200.

Vassena, R., R. J. Mapletoft, S. Allodi, J. Singh, and G. P. Adams. 2003. Morphology and developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status. *Theriogenology* 60(5):923-932.

Vieira, L. M., C. A. Rodrigues, A. Castro Netto, B. M. Guerreiro, C. R. A. Silveira, R. J. C. Moreira, M. F. Sá Filho, G. A. Bó, R. J. Mapletoft, and P. S. Baruselli. 2014a. Superstimulation prior to the ovum pick-up to improve in vitro embryo production in lactating and non-lactating Holstein cows. *Theriogenology* 82(2):318-324.

Vieira, L. M., C. A. Rodrigues, M. F. Mendanha, M. F. Sá Filho, J. N. S. Sales, A. H. Souza, J. E. P. Santos, and P. S. Baruselli. 2014b. Donor category and seasonal climate associated with embryo production and survival in multiple ovulation and embryo transfer programs in Holstein cattle. *Theriogenology* 82(2):204-212.

Vos, P. L. A. M., M. M. Bevers, A. H. Willemse, and S. J. Dieleman. 1994. Effects of suppression by a progesterone releasing intravaginal device and subsequent induction by GnRH of the preovulatory LH surge on Follicular function in PMSG/PG treated heifers. *Reprod Fertil* 101:43-49.

Webb, R., P. C. Garnsworthy, J. G. Gong, and D. G. Armstrong. 2004. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. *J Anim Sc*i 82(E):63-74.

Produção *in vivo* e *in vitro* de embriões em doadoras bovinas superestimuladas com FSH por 7 dias

R.J. Mapletoft[1,2,3], A. García Guerra[3], F.C.F. Dias[1], J. Singh[1], G.P. Adams[1]

[1]Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan, Canada.
[2]Department of Dairy Science, University of Wisconsin-Madison, Madison, Wisconsin, USA.

Resumo

Ao longo das últimas duas décadas, esforços de pesquisa resultaram em protocolos de superestimulação mais fáceis de serem conduzidos. No entanto, a produção de embriões aumentou apenas marginalmente. Estudos realizados até hoje não responderam adequadamente se protocolos de superestimulação podem se sobrepor ao padrão de ondas foliculares, aumentar o número de folículos que emergem na onda ou resgatar um maior número de pequenos folículos dentro da onda. Estudos que parecem facilitar uma maior utilização dos folículos dentro da onda são descritos nesta revisão. O número de folículos grandes no momento da primeira IA tendeu a ser maior e mais ovulações e CL foram detectados com o protocolo longo (7 dias) em comparação ao tratamento convencional de FSH de 4 dias. Além disso, houve maior sincronização das ovulações e as médias do total de estruturas recuperadas, óvulos fertilizados, embriões transferíveis ou congeláveis foram numericamente maiores no grupo de 7 dias. Quando usado num modelo de fertilização *in vitro*, o tratamento com FSH durante 7 dias resultou num maior número de folículos por aspiração, numa maior proporção de complexos cumulus-oócitos expandidos e num número maior de embriões transferíveis após o cultivo *in vitro*. A ultrassonografia diária revelou uma redução do número de pequenos (1-2 mm) folículos antrais desde o início até o final do tratamento superestimulatório, que foi associada com uma mudança progressiva de folículos para a próxima categoria de tamanho em ambos os grupos de 4 ou 7 dias. O número de folículos <5 mm diminuiu durante a superestimulação, sugerindo que não houve recrutamento contínuo de folículos pequenos, e o número de folículos > de 1 mm no início da superestimulação não foi diferente do número de folículos > 1 mm no início da superestimulação. No entanto, o número total de folículos > 3 mm no fim de superestimulação foi maior do que o número de folículos > 3 mm no início de superestimulação, devido ao crescimento da população de 1-2 mm em categorias de tamanho maior durante o tratamento. Os resultados dão subsídio à hipótese de que tanto protocolos de tratamento superestimulatório de 4 dias quanto de 7 dias resultam no resgate de folículos antrais pequenos presentes no momento da emergência da onda. No entanto, o protocolo de tratamento superestimulatório longo levou um maior número de folículos a adquirir a capacidade para ovular, com um aumento do número de ovulações e uma tendência para o aumento da produção de embriões, sem uma diminuição na competência do oócito / embrião.

Palavras chave: bovinos, desenvolvimento folicular, FSH, competência oocitária, protocolo de superestimulação.

Introdução

A melhora da nossa compreensão sobre a função ovariana e sobre as preparações de gonadotrofinas, promoveu mudanças importantes nas estratégias utilizadas para a superovulação em bovinos. Avanços em protocolos de tratamento de superestimulação incluem a capacidade de se iniciar os tratamentos em um tempo determinado (Bo *et al.*,1995; Mapletoft e Bo, 2012; Bó *et al.*, 2006), a utilização de IATF e uma redução do número de tratamentos com FSH (Bo *et al.*,1994; Tríbulo *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*,2014), e todos eles colaboraram para facilitar a implementação dos protocolos. Mais recentemente tem sido observado que a superestimulação está relacionada com o número de folículos presentes no momento da emergência da onda e que este número é inerente a e repetível nos indivíduos (Singh *et al.*,2004; Ireland *et al.*, 2007).

O número de embriões transferíveis é definido, em última análise, pela resposta superestimulatória, taxa de fertilização e subsequente desenvolvimento embrionário. O objetivo deste artigo é revisar as ideias recentes acerca do crescimento folicular e da resposta ovulatória durante a superestimulação, e novas informações sobre como a duração do protocolo de tratamento superestimulatório pode otimizar a resposta das doadoras.

Recrutamento folicular e início do tratamento de FSH

Durante a emergência de ondas foliculares em bovinos, um número variável de folículos de 3 a 5 mm surge ao longo de um período de 2 a 4 dias (Ginther *et al.*, 1989; Lucy *et al.*,1992; Adams *et al.*,2008) em consequência de um pico de FSH que ocorreu 1 a 2 dias mais cedo (Adams *et al.*, 1992). Melhorias na resolução dos equipamentos de ultrassom levaram ao conhecimento de que pequenos folículos antrais (1 a 3 mm) também se desenvolvem em padrão de onda, em resposta aos aumentos do FSH endógeno (Jaiswal *et al.*, 2004). O número de folículos de 1 a 3 mm foi máximo de 1 a 2 dias antes do dia previamente definido de emergência da onda, e foi temporariamente associado com uma elevação de FSH anterior ao pico Além disso, o futuro folículo dominante foi detectado pela primeira vez com um diâmetro de 1 mm, cerca de 66 h antes do dia previamente definido de emergência da onda (com base na detecção do futuro folículo dominante com um diâmetro de 4 mm), e coincidente com o início do aumento de FSH. Esta descoberta, de uma extensão do padrão de onda incluindo folículos em um estágio de desenvolvimento menores, tem implicações importantes para a superestimulação.

[1]Autor para correspondência: reuben.mapletoft@usask.ca

Observou-se que a presença de um folículo dominante funcional suprime a resposta à superestimulação (Guilbault *et al.,* 1991; Bungartz e Niemann, 1994), e demonstrou-se que os tratamentos de superestimulação devem ser iniciados no momento da emergência da onda para a otimização da resposta (Nasser *et al.,* 1993; Adams, 1994). Estas descobertas conduziram o desenvolvimento de métodos para sincronizar a emergência da onda antes do tratamento para superestimulação, utilizando-se uma combinação de estradiol e progesterona (Bo *et al.,* 1995) ou por ablação transvaginal do folículo, guiada por ultrassom (Bergfelt *et al.,* 1994). Em outro estudo, a resposta à superestimulação e o número de embriões congeláveis foram maiores quando o tratamento com FSH foi iniciado dois dias, em vez de um dia, após a punção folicular (OPU), um procedimento que tem efeito similar ao da ablação folicular (Surjus *et al.,* 2014). Como todos os folículos > 3 mm foram aspirados durante a coleta de oócitos, o dia adicional pode ter fornecido tempo para folículos menores da onda alcançarem um estágio ovulatório durante o tratamento de superestimulação.

Em contraste, dados preliminares de outros autores sugerem que a superestimulação iniciada na presença de um folículo dominante funcional resultou no surgimento de uma nova onda folicular, e que a presença de um implante de progesterona durante 4,5 dias durante o período de tratamento com FSH permitiu um tempo adicional suficiente para a onda de folículos induzida por FSH alcançar o pool ovulatório, independentemente do destino do folículo dominante (Bednar e Pursley, 2000). Da mesma forma, em uma revisão de abordagens alternativas para a criação de doadoras para a superestimulação (Bó *et al.,* 2008), dados preliminares foram apresentados, relatando-se os efeitos de um protocolo de superestimulação de 6 dias iniciado sem levar em conta o estado de onda folicular. A resposta ovariana e o número de estruturas recuperadas e de embriões transferíveis não diferiram entre o protocolo estendido sem a sincronização da emergência da onda e um protocolo convencional de 4 dias com a sincronização. No entanto, estudos conduzidos até hoje, não abordaram diretamente a questão se os protocolos de superestimulação podem se sobrepor ao padrão de onda (permitindo a superestimulação independentemente do status das ondas), aumentar o número de folículos que entram na onda, ou resgatar pequenos folículos dentro da onda.

Protocolos estendidos para superestimulação

Com base na noção de que gonadotrofinas exógenas podem se sobrepor o padrão de onda e resultar na "recuperação do folículo subordinado", foram feitas tentativas para se aumentar a resposta superestimulatória, acrescentando-se tratamento com eCG antes do início dos tratamentos de FSH. O pré-tratamento com eCG realizado 2 dias anteriores ao protocolo convencional de tratamento com FSH resultou em valores numericamente superiores de ovulações (16,1 ± 1,5 vs. 12,4 ± 1,4) e embriões viáveis (8,1 ± 1,6 vs. 6,5 ± 1,3) em um grupo não selecionado de doadoras (Caccia *et al.,* 1999) e num número significativamente maior de embriões transferíveis em vacas que foram definidas como doadoras ruins (3,6 ± 0,6 vs. 1,0 ± 0,2; Bó *et al.,* 2008).

Mais recentemente, foi avaliada a resposta superovulatória e de recuperação de embriões em doadoras submetidas ao tratamento superestimulatório com FSH por 4 ou 7 dias (García Guerra *et al.,* 2012). Vinte e quatro vacas foram blocadas pelo número de folículos <5 mm no momento da emergência das ondas e submetidas a um dos protocolos de FSH, de 4 dias ou 7 dias, utilizando-se a mesma dose total de 400 mg de FSH (Folltropin-V; Vetoquinol Inc / Bioniche Saúde Animal; Fig. 1). O número médio de ovulações detectadas por ultrassonografia foi maior no grupo de tratamento de 7 dias (30,9 ± 3,9 vs. 18,3 ± 2,9; P = 0,01), consistente com valor numericamente superior de folículos > 10 mm antes da ovulação (27,5 ± 4,1 vs. 19,5 ± 2,6; P = 0,11; Tabela 1). Além disso, as ovulações ocorreram de forma mais sincronizada no grupo de 7 dias (93% de ovulações ocorreram 12-36 horas pós-LH, em comparação com 66% no grupo de 4 dias), sugerindo que os folículos mais maduros foram superestimulados e capazes de responder ao estímulo de LH. Embora o número total de ovócitos/embriões, ovócitos fertilizados e embriões transferíveis não diferiram estatisticamente, todos os pontos finais favoreceram o grupo de 7 dias. Além disso, quando os dados de vacas com falha na fertilização foram removidos, o número de embriões viáveis tendeu a ser maior no grupo de 7 dias (7,6 ± 1,7 vs. 4,2 ± 1,5; P = 0,07).

Num outro estudo (Dias *et al.,* 2013a), um protocolo de superestimulação 7 dias foi utilizado para investigar os efeitos da duração da fase de crescimento do folículo, sob a influência da progesterona no crescimento folicular, a ovulação e a competência do oócito. Vacas de corte foram superestimuladas com 25 mg de FSH duas vezes por dia por 4 ou 7 dias. Mais uma vez, a resposta superstimultória (número de folículos grandes observados anteriormente à inseminação) foi maior (P <0,05) no grupo de 7 dias, e os números de ovulações (15,4 vs. 11,6) e embriões (6,7 vs. 5,9) foram numericamente superiores no grupo de 7 dias.

A duração do tratamento parece ser responsável pelo aumento da resposta superestimulatória, ao invés da dose de FSH. Nos dois estudos referidos acima, o número de folículos com tamanho ovulatório imediatamente antes da ovulação era maiorno grupo de 7 dias de superestimulação em comparação ao grupo de 4 dias, se a dose total de FSH era maior (Dias *et al.,* 2013a) ou com a mesma dose (García Guerra *et al.,* 2012). No entanto, são necessários mais estudos para se determinar a dose ótima de FSH quando é utilizado o tratamento superestimulatório prolongado.

Tabela 1. Resposta superovulatória (média ± EPM) e recuperação de ovócitos/embriões de vacas de corte submetidas ao tratamento superestimulatório convencional de 4 dias vs.7 dias.

Resultados	Grupo de tratamento		
	4 dias	7 dias	Valor de P
Número de vacas	12	12	
Número de corpos lúteos	20,8 ± 2,2	27,2 ± 2,1	0,04
Total de estruturas recuperadas	11,3 ± 2,0	13,8 ± 2,3	0,44
Ovócitos fertilizados	5,6 ± 1,5	8,0 ± 2,0	0,24
Porcentagem de óvulos fertilizados	59,0 ± 10,7	54,2 ± 9,5	0,58
Embriões degenerados	1,4 ± 0,7	1,7 ± 0,6	0,73
Embriões transferíveis (Grau 1-3)	4,2 ± 1,5	6,3 ± 1,6	0,25
Porcentagem de embriões transferíveis	44,4 ± 11,8	44,1 ± 8,4	0,69

Adaptado de García Guerra *et al.*, 2012.

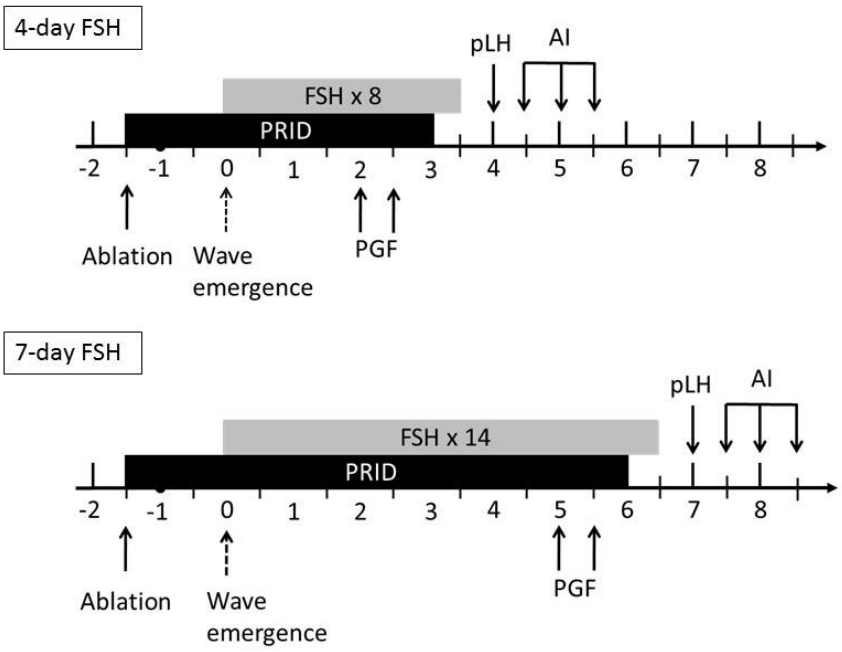

Figura 1. Desenho experimental utilizado para comparar a resposta a protocolos superestimulatórios de 4 dias (convencional) versus de 7 dias em bovinos. De García Guerra et al. (2012). 4-day FSH – tratamento com FSH por 4 dias; 7-day FSH- tratamento com FSH por 7 dias; Ablation – ablação; Wave emergence – emergência da onda; PRID – dispositivo de liberação interna de progesterona; AI – inseminaçaõ artificial; PGF – prostaglandina; pLH – hormônio luteinizante porcino.

Desenvolvimento folicular durante tratamentos superestimulatórios

Um estudo anterior forneceu uma lógica para a hipótese de que o tratamento superestimulatório não recruta mais folículos na onda, mas que permite que um maior número de folículos pequenos de uma onda alcance diâmetros médios e grandes (Adams *et al.*, 1993). Esta hipótese foi testada em um estudo recente delineado para se comparar os efeitos de um protocolo de superestimulação convencional (4 dias) vs. um protocolo extendido (7 dias) sobre a dinâmica folicular (Garcia Guerra *et al.*, 2015). O número de folículos ≥ de 1 mm no final da superestimulação não foi diferente do número de folículos ≥ 1 mm no início de superestimulação, mas o número de folículos antrais pequenos (1-5 mm) diminuiu drasticamente durante a superestimulação. Além disso, houve uma correlação negativa entre o número de folículos ≤5 mm e aqueles > 5 mm. Houve também um maior número de folículos ≥ 3 mm no final do tratamento superestimulatório comparado ao início, o que foi atribuído ao resgate da população de 1-2 mm e o seu crescimento em categorias de maior tamanho durante o tratamento. Estes resultados indicam que o tratamento superestimulatório recupera da atresia folículos antrais pequenos pertencentes à onda, em vez de recrutar mais folículos para a onda (Fig. 2).

Apesar de parecer que folículos pequenos da onda foram resgatados em ambos os grupos, diferenças significativas foram detectadas no padrão de desenvolvimento do grupo em crescimento (Fig. 2). Quando os tratamentos de 4 e 7 dias foram comparados, a diminuição do número de folículos pequenos e aumento do número de folículos grandes tenderam a ocorrer com uma dose acumulada relativamente menor de FSH, e a

taxa de crescimento média de folículos entre o início do tratamento e a ovulação foi inferior (1,3 ± 0,1 vs. 1,9 ± 0.1 mm / dia) no grupo de 7 dias (Garcia Guerra *et al.*, 2015). Uma vez que folículos do protocolo de 7 dias tiveram menor taxa de crescimento e pareciam permanecer com um tamanho ovulatório por mais tempo, eles podem ter tido mais tempo para adquirir a capacidade ovulatória, como indicado pelo maior número de ovulações sincronizadasem comparação ao protocolo de 4 dias (Garcia Guerra *et al.*, 2012).

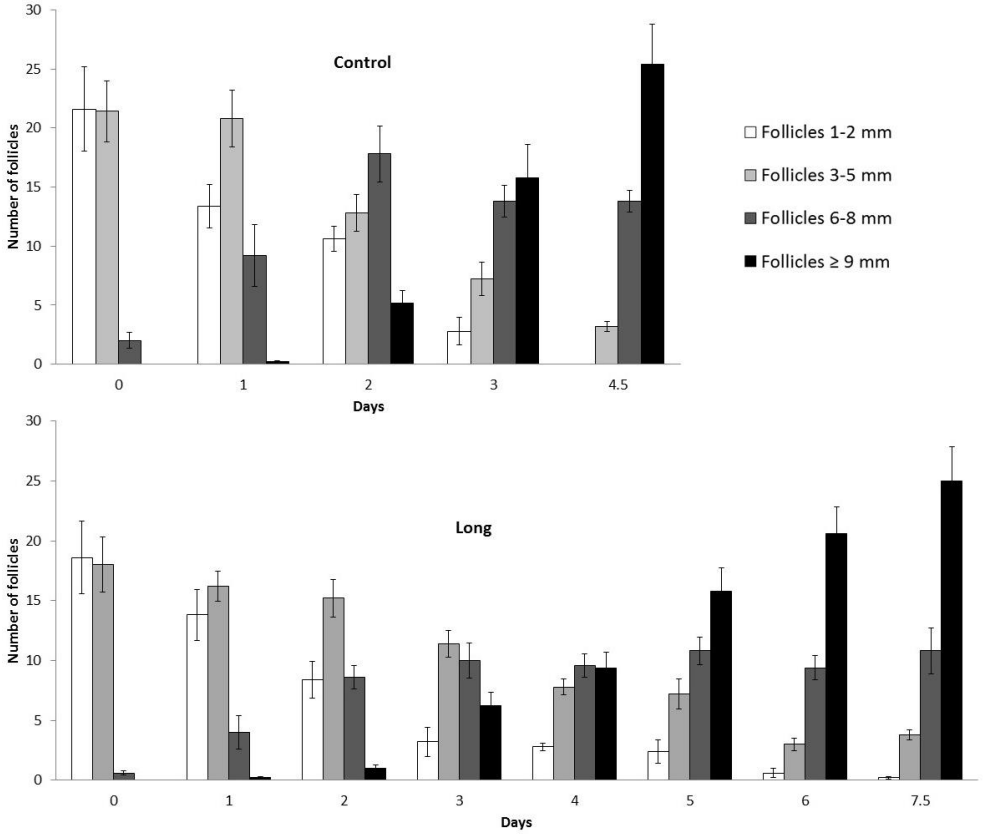

Figura 2. Média (± EPM) do número de folículos de diferentes categorias de tamanho durante um protocolo superestimulatório de 4 dias (convencional) vs. 7 dias em vacas. De García Guerra et al. (2015). Control – controle; Long – estendido; Number of follicles – número de folículos; Days – dias; Follicles –folículos.

Análise de micro-arranjo de folículos antrais grandes

Uma vez que a seleção folícular que irá acontecer na onda é um fator chave para a superestimulação do ovário, o FSH exógeno é utilizado para se evitar a regressão de folículos subordinados para que estes tenham qualidades de um folículo dominante. Em um estudo recente sobre folículos submetidos a um protocolo de superestimulação de 4 dias, a expressão de genes em células da granulosa foi alterada em comparação com um único folículo dominante que ocorre naturalmente (Dias *et al.*, 2013c, 2014). A expressão de genes relacionados com o crescimento (mesmo que o LH tenha sido administrado), semelhante à fase de crescimento folicular pré-LH, e daqueles genes que estão envolvidos na resposta ao estresse oxidativo, foi aumentada em células da granulosa de folículos submetidos a um protocolo de superestimulação com FSH de 4 dias comparadas a um folículo dominante não estimulado, de uma onda folicular. Genes relacionados a um distúrbio na angiogênese foram também mais expressos em folículos superestimulados. Especula-se que a expressão gênica durante um protocolo de superestimulação de 7 dias pode ser mais semelhante à do folículo dominante que ocorre naturalmente.

A aquisição de receptores de LH é comumente utilizada como um marcador da dominância folicular e um pré-requisito para o estabelecimento de capacidade ovulatória (Sartori *et al.*, 2001; Barros *et al.*, 2012). Recentemente, a avaliação da expressão de RNAm de LHR em células da granulosa de folículos superestimulados e não estimulados 12 h após a remoção do dispositivo de progesterona revelou que a expressão do LHR foi diminuída em função da superestimulação (Lucacin *et al.*, 2013). Como resultado, após 4 dias de protocolo de superestimulação convencional com FSH, os folículos tiveram tanto amadurecimento como resposta defasada ao LH em comparação com um único folículo dominante que ocorre naturalmente (Dias *et al.*, 2013c, 2014). Estes resultados fornecem mais embasamento ao conceito de que, após um tratamento de superestimulação de 4 dias, alguns folículos não têm tempo suficiente para amadurecer, aumentar a expressão de genes adequados e adquirir a capacidade de ovular.

O uso de protocolos estendidos de superestimulação para OPU

A maioria dos protocolos usados para estimular o crescimento folicular antes da OPU são protocolos curtos de superestimulação, com a maturação *in vitro* acontecendo após a punção dos oócitos (Blondin *et al.*, 2002). Embora reconheçamos que é pouco provável que seja prático em um estabelecimento comercial, examinamos o uso de um protocolo de tratamento prolongado na superestimulação ovariana para a produção *in vitro* de embriões. Novilhas de corte *Bos taurus* foram superestimuladas utilizando-se um protocolo de FSH de 4 dias ou um de 7 dias e os complexos cumulus-oócito (COC) foram recuperados 24 h após o tratamento de LH (Dias *et al.*, 2013b). Comparado com o protocolo tradicional de FSH de 4 dias, o protocolo de 7 dias resultou num número significativamente maior de folículos ≥ 9 mm no momento da punção dos COC (25,4 ± 5,3 vs. 10,6 ± 2,3), uma tendência para um maior número de COC recuperados (17,8 ± 3,7 vs. 10,5 ± 2,4), e 2,5 vezes mais embriões transferíveis no final do cultivo *in vitro* de embriões (9 dias após a FIV). Curiosamente, > 90% dos COC recuperados no grupo 7 dias foram expandidos, enquanto que no grupo de 4 dias, apenas 74% dos COC estavam expandidos (ns). Em outro estudo, o protocolo de 7 dias resultou na coleta de uma maior proporção de oócitos maduros (59 vs. 22%) em comparação com o protocolo de 4 dias (Dadarwal *et al.*, 2014). Embora o potencial de desenvolvimento de oócitos foi semelhante entre os protocolos de 4 e 7 dias, a produção de embriões foi aumentada no grupo de 7 dias devido a um maior número de folículos maiores de onde os COC puderam ser aspirados.

Conclusões

Uma quantidade crescente de pesquisas sugere que a adição de 2 a 3 dias de tratamento a um protocolo de superestimulação tradicional de 4 dias fornece um tempo maior para que até mesmo os menores folículos de uma onda sejam resgatados da atresia e incorporados no grupo que atinge capacidade ovulatória. Por outro lado, os protocolos convencionais de superestimulação de 4 dias resultam em uma taxa de crescimento acelerada de folículos que podem adquirir a capacidade de ovular, mas que realizam este processo de forma menos sincronizada e podem produzir oócitos de competência subótima. O protocolo de tratamento superestimulatório extendido parece resultar num maior número de embriões viáveis tanto *in vivo* como *in vitro*, por causa de um maior número de folículos maduros. Com base nestes estudos, concluímos que a extensão do período de desenvolvimento folicular durante a superestimulação (6-9 dias entre a emergência da onda e ovulação) aumenta a maturação folicular, o número e a sincronização das ovulações sem comprometer a competência dos ovócitos/embriões eo aumento do número de embriões transferíveis.

Referências

Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP, Ko JCH, Ginther OJ. 1992. Association between surges of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J Reprod Fertil*, 94:177-188.

Adams P, KotK, Smith C, Ginther OJ. 1993. Selection of a dominant follicle and suppression of follicular growth in heifers. *Anim Reprod Sci*, 30:259-271.

Adams GP. 1994. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: implications for synchronization & superstimulation. *Theriogenology*, 41:19-24.

Adams GP, Jaiswa lR, Singh J, Malhi P. 2008. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*, 69:72-80.

Barros CM, Satrapa RA, Castilho ACS, Fontes PK, Razza EM, Ereno RL, Nogueira MFG. 2012. Effect of superstimulatory treatments on the expression of genes related to ovulatory capacity, oocyte competence and embryo development in cattle. *Reprod Fertil Dev*, 25:17-25.

Bednar GW, Pursley JR. 2000. Enhancement of superovulatory response using a norgestomet implant during the FSH treatment period. *J Dairy Sci*, 83:843. (abstract).

Bergfelt DR, Lightfoot KC,Adams GP. 1994. Ovarian synchronization following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. *Theriogenology*, 42:895-907.

Bergfelt DR, Bó GA, Mapletoft RJ, Adams GP. 1997. Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence at random stages of the oestrous cycle in cattle. *Anim Reprod Sci*, 49:1-12.

Blondin P, Bousquet D, Twagiramungu H, Barnes F, Sirard MA. 2002. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. *Biol Reprod*, 66:38-43.

Bó GA, Hockley DK, Nasser LF, Mapletoft RJ. 1994. Superovulatory response to a single subcutaneous injection of Folltropin-V in beef cattle. *Theriogenology*, 42:963-975.

Bó GA, Adams GP, Pierson RA, Mapletoft RJ. 1995. Exogenous controlof follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology*, 43:31-40.

Bó GA, Baruselli PS, Chesta PM, Martins CM. 2006. The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. Theriogenology, 65:89-101.

Bó GA, Guerrero DC, Adams GP. 2008. Alternative approaches to setting up donor cows for superstimulation. *Theriogenology*, 69:81-87.

Bungartz L, Niemann H. 1994. Assessment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination. *J Reprod Fertil*, 101:583-591.

Caccia M, TribuloR, Tribulo H, Bó GA. 1999. Effect of pretreatment with eCG on superovulatory response in beef cattle treated with CIDR-B, estrogen and progesterone. *Theriogenology*, 51:403-403.

Carvalho PD, Hackbart KS, Bender RW, Baez GM, Dresch AR, Guenther JN, Souza AH, Fricke PM. 2014. Use of a single injection of long-acting recombinant bovine FSH to superovulate Holstein heifers: a preliminary study. *Theriogenology*, 82:481-489.

Dadarwal D, Honparkhe M, Dias FC, Alce T, Lessard C, Singh J. 2014. Effect of superstimulation protocols on nuclear maturation and distribution of lipid droplets in bovine oocytes. *Reprod Fertil Dev*. http://dx.doi.org/10.1071/RD13265.

Dias FCF, Costa E, Adams GP, Mapletoft RJ, Kastelic J, Dochi O, Singh J. 2013a. Effect of duration of the

growing phase of ovulatory follicles on oocyte competence in superstimulated cattle. *Reprod Fertil Dev*, 25:523-530.

Dias FCF, Dadarwa lD, Adams GP, Mrigank H, Mapletoft RJ, Singh J. 2013b. Length of the follicular growing phase and oocyte competence in beef heifers. *Theriogenology*, 79:1177-1183.

Dias FCF, Khan MIR, Sirard MA, Adams GP, Singh J. 2013c. Differential gene expression of granulosa cells after ovarian superstimulation in beef cattle. *Reproduction*, 146:181-191.

Dias FCF, Khan MIR, Adams GP, Sirard MA, Singh J. 2014. Granulosa cell function and oocyte competence: super-follicles, super-moms and super-stimulation in cattle. *Anim Reprod Sci*, 149:80-89.

García Guerra A, Tribulo A, Yapura J, Singh J, Mapletoft RJ. 2012. Lengthening the superstimulatory treatment protocol increases ovarian response and number of transferable embryos in beef cows. *Theriogenology*, 78:353-360.

García Guerra A, Tribulo A, Yapura J, Adams GP, Singh J, Mapletoft RJ. 2015. Lengthened superstimulatory treatment in cows: evidence for rescue of follicles within a wave rather than continuous recruitment of new follicles. *Theriogenology*, 84:467-476.

Ginther OJ, Kastelic JP, Knopf L. 1989. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Anim Reprod Sci*, 20:187-200.

Guilbault LA, Grasso F, Lussier JG, Rouillier P, Matton P. 1991. Decreased superovulatory responses in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle. *J Reprod Fertil*, 91:81-89.

Ireland JJ, Ward F, Jimenez-Krassel F, Ireland JLH, Smith GW, Lonergan P, Evans ACO. 2007. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Hum Reprod*, 22:1687-1695.

Jaiswal RS, Singh J, Adams GP. 2004. Developmental pattern of small antral follicles in the bovine ovary. *Biol Reprod*, 71:1244-1251.

Lucacin E, Pupulim AR, Fontes PK, Razza EM, Machado MF, Loureiro B, Ereno RL, Castilho ACS, Satrapa RA, Barros CM. 2013. Expression of genes related to ovulatory capacity (LHR and AGTR2) in granulosa cells from superstimulated or not superstimulated Angus cows. *Reprod Fertil Dev*, 26:218-218.

Lucy MC, Savio JD, Badinga L, De La Sota RL, Thatcher WW. 1992. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J Anim Sci*, 70:3615-3626.

Mapletoft RJ, Bó GA. 2012. The evolution of improved and simplified superovulation protocols in cattle. *Reprod Fertil Dev*, 24:278-283.

Nasser LF, Adams GP, Bó GA, Mapletoft RJ. 1993. Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. *Theriogenology*, 40:713-724.

Sartori R, Fricke PM, Ferreira JCP, Ginther OJ, Wiltbank MC. 2001. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biol Reprod*, 65:1403-1409.

Singh J, DominguezM, Jaiswal R, Adams GP. 2004. A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. *Theriogenology*, 62:227-243.

Surjus RS, Prata AB, Borsato M, Mattos FCSZ, Martins da Silveira MC, Mouráo GB, Pires AV, Wiltbank MC, Sartori R. 2014. In vivo embryo production in cows superovulated 1 or 2 days after ovum pick-up. *Reprod Fertil Dev*, 26:527-532.

Tríbulo A, Rogan D, Tríbulo H, Tríbulo R, Mapletoft RJ, Bó GA. 2012. Superovulation of beef cattle with a split-single intramuscular administration of Folltropin-V in two concentrations of hyaluronan. *Theriogenology*, 77:1679-1685.

Seleção genômica de embriões produzidos *in vitro* e por transferência nuclear de células somáticas para a aceleração do melhoramento genético na produção bovina

H.N. Kadarmideen[1,8], G. Mazzoni[1], Y.F. Watanabe[2], L. Strøbech[3], P.S. Baruselli[4], F.V. Meirelles[5], H. Callesen[6], P. Hyttel[1], J.B.S. Ferraz[5], M.F.G. Nogueira[7]

[1]Department of Veterinary Clinical and Animal Sciences, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen, Frederiksberg C, Denmark.
[2]Watanabe Applied Technology (WTA), Cravinhos, SP, Brazil.
[3]EmbryoTrans Biotech ApS, Koege, Denmark.
[4]Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.
[5]Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, University of São Paulo, Pirassununga, SP, Brazil.
[6]Department of Animal Science, Aarhus University, Tjele, Denmark.
[7]Department of Biological Sciences, University of São Paulo State, Assis, SP, Brazil.

Resumo

Este artigo apresenta conceitos básicos de métodos de seleção genômica (SG) na produção de bovinos de carne e de leite em associação com técnicas de reprodução assistida (TRA), tais como punção ovariana guiada por ultrassom e produção *in vitro* de embrões (OPU-PIV). Inicialmente apresentaremos as ferramentas genômicas e discutiremos os principais métodos de SG atualmente utilizados .A grande vantagem da SG é que ela permite uma seleção precisa de animais muito jovens, utilizando-se de previsões genômicas, particularmente relacionadas aos fenótipos que são dificeis ou caros de medir. Embora seja conhecido que a SG aumenta o ganho genético e o lucro na pecuária convencional, a SG é muito mais desejável quando combinada com OPU-PIV na produção de bovinos. Os benefícios esperados de SG-OPU-PIV excedem em muito os benefícios alcançados por SG ou OPU-PIV isoladamente, principalmente devido à enorme redução no intervalo de gerações. O melhoramento genético pode ser aumentado ainda mais, se o mérito genético das doadoras e dos touros usados na OPU-FIV for máximo para caracterisitcas econômicas importantes. Este artigo também destaca alguns desafios que dizem respeito, particularmente, a biópsias de embriões e quantidade e qualidade do DNA obtido na biósia para uma ampla genotipagem do genoma e, alternativas para superar estas dificuldades. Será discutido brevemente a técnica de transferência nuclear de células somáticas (TNCS), no contexto da aplicação da SG em linhagens celulares de fibroblastos de fetos obtidos a partir de técnicas de OPU-PIV. Será ainda apresentado o nosso ponto de vista sobre como a TNCS pode abrir caminho para o melhoramento ainda mais acelerado de bovinos. A principal conclusão é que o emprego de seleção genômica em TRA, como OPU-PIV de embriões juntamente com sexagem de embriões e TNCS promoverão uma rápida disseminação de animais do alto mérito genétic, em uma escala nunca vista antes. E, finalmente, este documento descreve as atividades de pesquisa que estão sendo desenvolvidas sobre seleção genômica combinada com tecnologias avançadas de reprodução, pelo consórcio chamado projeto GIFT (www.gift.ku.dk

Palavras chave: bovinos, transferência de embriões, seleção genômica, OPU-PIV, transferência nuclear de células somáticas.

Introdução

O rápido crescimento populacional aumentará a demanda por alimentos, bem como por outros produtos de origem animal, particularmente nos países emergentes, gigantes econômicos, como o Brasil e a Índia. Além disso, a urbanização tem um impacto considerável sobre os padrões de consumo de alimentos em geral e sobre a demanda por produtos animais, em particular. Há decadas aprodução de bovinos (de leite e corte) na maioria dos países da América do Norte e Europa possuem infra-estrutura e estruturas organizacionais bem estabelecidas para melhorar características de relevância econômicas. Isto levou ao aumento substancial (maior eficiência) na produção de carne e leite bovinos, bem como na capacidade de ser auto-suficiente , mas mais importante, foi que gerou uma importante fonte de renda nacional decorrente da exportação e de outros usos industriais. Em contraste, existem vários gargalos no estabelecimento de infra-estruturas e estruturas organizacionais para a aquisição de dados de desempenho em fazendas e em centrais de teste/confinamentos para o cálculo de mérito genético estimado (EBVs: os valores genéticos estimados) e aplicação de técnicas de reprodução assistida (TRA), tais como a produção *in vitro* (PIV) de embriões e a transferência de embriões (TE). Além disso, a produtividade e a eficiência da produção em países em desenvolvimento\e ou tropicais são muito baixas devido a fatores de estresse e desafios ambientais (O'Neill *et al.*, 2010).

No entanto, as técnicas moleculares de melhoramento, tais como seleção genômica (SG) associada com TRA modernas, tais como a punção

Autor correspondente: hajak@sund.ku.dk

ovariana guiada por ultrassom e a produção *in vitro* (OPU-PIV) de embriões, fornecem uma via rápida e sustentável para o melhoramento genético tanto para a eficiência quanto para a produtividade. Até certo ponto, isto pode contornar a onerosidade do levantamentos de dados, testes de progênie ou de desempenho para a avaliação genética convencional,que rotineiramente utiliza um grande número de animais.

O mercado global de embriões bovinos atingiu 1.275.874 embriões em 2013 (International Embryo Transfer Society - IETS, 2014). É importante salientar que , de 2000 para 2013, a PIV de embriões aumentoude 17,4 para 40,6% (517.587 embriões produzidos) em comparação com a produção *in vivo* (IETS, 2014). Além disso, este aumento global foi relacionado com a melhora extraordinária no mercado brasileiro da PIV, que foi responsável por 70,8% dos embriões PIV (IETS, 2014). O Brasil expandiu mais de sete vezes a PIV de embriões bovinos de 2001 (50.000 embriões) a 2013 (366.517 embriões). Dos embriões produzidos *in vitro* no Brasil, em 2013, 45,7% (167.452 embriões) foram obtidos de doadoras leiteiras (88,6% de fêmeas *Bos taurus)* e 54,3% (199.065 embriões) de fêmeas bovians de corte (86,8% de fêmeas *Bos indicus*; Viana *et al.*, 2015; Universidade de São Paulo, Brasil; dados não publicados). Portanto, estes índices da PIV refletem o potencial do mercado brasileiro em programas OPU e PIV em larga escala utilizando-se doadoras *Bos indicus* e *Bos taurus*.

Além d do daumento em larga escala da produção de embriões, agora também é teoricamente possível combinar a SG e OPU-PIV com a transferência nuclear de células somáticas (TNCS), alavancando a produção de bovinos bem além de seu potencial atual. A combinação de SG, OPU-PIV e TNCS, se amplamente aplicada, tem um grande potencial para a produção mundial de bovino , incluindo os países desenvolvidos.

Este artigo apresenta os conceitos básicos do uso de métodos de seleção genômica (SG) aplicados para produção de bovinos via OPU-PIV. Este artigo também destaca os desafios, bem como os benefícios esperados da seleção genômica aplicadas à PIV bovina. A técnica de TNCS, é discutida brevemente, no contexto da aplicação de SG em linhagens celulares de fibroblastos de fetos obtidos a partir de técnicas de OPU-PIV. A respeito disso, apresentaremos nossos pontos de vista sobre como ela pode abrir caminho para o rápido melhoramento de bovinos em uma escala que nunca foi vista antes. Por fim, o Consórcio sobre Melhoramento Genético de Características Reprodutivas (Genetic Improvement of Fertilization Traits - GIFT) em bovinos brasileiros e dinamarqueses (www.gift.ku.dk) e as suas principais atividades serão abordadas.

A Genômica na produção e reprodução de bovinos

Genes conhecidos e marcadores genéticos que influenciam características animais, permitem que os criadores realizem o melhoramento usando seleção assistida por genes e seleção assistida por marcadores (SAM. Kadarmideen *et al.*, 2006; Kadarmideen e Reverter, 2007). No entanto, a implementação de programas de SAM raramente tem sido bem sucedida (Goddard e Hayes, 2009). Exceção a este caso ocorre quando genes que se conhece o impacto funcional na reprodução ou fertilidade são utilizados. Por exemplo, no caso da PIV bovina, a qualidade e quantidade de oócitos é importante. Os genes que podem predizer a boa qualidade de oócitos incluem *FSHR* (Izadyar *et al.*, 1998), *EGFR* (Conti *et al.*, 2006), *AREG* (Nautiyal *et al.*, 2010; Peluffo *et al.*, 2012), *PR* (Aparicio *et al.*, 2011), *COX2* (Takahashi et ai, 2006), *GDF9* e *BMP15* (Hussein et ai, 2006; Gilchrist *et al.*, 2008), *H2A* (Pasque *et al.*, 2011), *PDE3* (Richard *et al.*, 2001) e *OOSP1* (Tremblay *et al.*, 2006). Existem genes que podem predizer a boa qualidade dos blastocistos, incluindo *ACSL2* e *HAND1* (Arnold *et al.*, 2006), *G6PD, GPX1, OCT4, PLAC8, SOD2* (Cebrian-Serrano *et al.*, 2013), *GLUT1, GLUT3, KRT8, PGK1* (Machado *et al.*, 2012), *GATA6, SOX2* (Ozawa *et al.*, 2012), *IL1-B* (Paula-Lopes *et al.*, 1998), *LIF* e *LR-B* (Rizos *et al.*, 2003).

O Consórcio para Sequenciamento de Análise Genômica de Bovinos (Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium) inicialmente sequenciou e montou o genoma *Bos taurus* com cobertura de aproximadamente 7 vezes - esta montagem inicial mostrou em torno de 22.000 genes e 14.345 ortólogos comuns entre sete espécies de mamíferos (Elsik *et al.*, 2009). Os benefícios dos esforços para sequenciamento do genoma são relacionados à detecção de dezenas de milhares de marcadores abundantes chamados polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs). Estes inúmeros marcadores SNP que podem variar de vários milhares a um milhão, podem ser utilizados na forma de arranjos de genotipagem ou SNPchips para a seleção genômica completa, em contraste com a SAM que utiliza apenas algumas centenas de marcadores genéticos.

Seleção genômica (SG) e seus benefícios para o acasalamento convencional

A seleção genômica baseia-se na "ampla previsão genômica" do mérito genético e, foi proposta pela primeira vez em um artigo marcarcante de Meuwissen *et al.* (2001). Métodos de SG baseados em modelos de melhor predição linear não enviesada (BLUP) nos permitem predizer o desempenho de animais dado os seus genótipos nos SNPs em toda a extensão do genoma. Estes efeitos dos SNP são estimados a partir de uma grande população referência com genótipos (a partir do SNPchip) e fenótipos de

interesse. Os efeitos estimados do SNP são então usados para determinar o mérito de outros animais genotipados que ainda não estão fenotipados. Os métodos mais comuns de SG são: GBLUP genômica (GBLUP; Goddard *et al.*, 2011). Método BLUP de passo único (ssBLUP; Aguilar *et al.*, 2010) e várias abordagens Bayesianas (BayesA, BayesB e BayesCπ; Meuwissen *et al.*, 2001; Habier *et al.*, 2011).

Modelos de predição genômica variam de acordo com as várias predições relativas à variância das características de interesse. O GBLUP é um método de predição que assume que todos os marcadores contribuem para a variância genômica aditiva. Este método é semelhante ao método tradicional BLUP aplicado em melhoramento animal por mais de 25 anos, exceto por sua matriz de relações genômicas que substitui a matriz de relações do numerador calculada a partir da informações do pedigree. Um outro método chamado de regressão aleatória BLUP (Meuwissen *et al.*, 2001) assume que os efeitos dos SNP são distribuídos aleatoriamente, sendo considerado equivalente ao GBLUP (Goddard *et al.*, 2011). O ssBLUP analisa conjuntamente os fenótipos e genótipos de todos os animais em uma única etapa (Aguilar *et al.*, 2010). A inclusão de todos os animais (com e sem genótipos) resulta na melhor correção dos efeitos genômicos de pré-seleção e, consequentemente fornece uma estimação mais acurada do dos valores genômicos estimados de mérito genético (GEBVs). Várias abordagens Bayesianas têm sido utilizadas para a predição genômica, e estes métodos assumem que existe um conhecimento prévio sobre a distribuição dos efeitos dos SNPs que influenciam uma característica. A análise BayesA assume que todos os SNPs tem um efeito, mas cada SNP tem uma variância diferente que é assumida como sendo equivalente um $\chi 2$ invertido escalado previamete. As análises BayesB e BayesCπ assumem que cada SNP ou tem um efeito de zero ou diferente de zero com probabilidades π e π-1, respectivamente. A acurácia da predisão genômica aumenta à medida que a herdabilidade da característica e a população de referência utilizada para o cálculo de GEBVs aumentam. No geral, os métodos de predição genômica estão melhorando, especialmente com advento do sequenciamento amplo do genoma realizado por sequenciadores de última geração. Atualmente, a diferença de desempenho dos diferentes métodos é marginal para a maioria das características porque essas são controladas por muitos QTLs com pequeno efeito de tamanho. A GBLUP e sua extensão de única etapa, que inclui os animais não-genotipados (ssBLUP), continuam sendo o método mai sutilizado. Um novo método Sistems Genomic BLUP ou sgBLUP foi introduzido por Kadarmideen (2014), e leva em consideração a importância biológica ou funcional dos SNPs em uma estrutura semelhante ao GBLUP.

A SG mudou drasticamente o formato dos testes de progênie tradicionais em bovinos e outras espécies. Isso ocorre porque a SG requer que somente uma pequena proporção dos animais seja avaliada pelo seu desempenho (produção ou capacidade reprodutiva) e genotipada usando SNPchip. Em seguida, a SG prediz o desempenho de uma maior proporção de animais que não foram avaliados quanto ao desempenho, mas foram genotipados. A SG aumenta o ganho genético, pelo aumento da intensidade seleção, acurácia dos valores de mérito genético EBVs (GEBVs) e da variância genética e por reduzir o intervalo entre gerações (Kadarmideen, 2014). Existem duas grandes vantagens da SG em relação a seleção tradicional baseada somente em dados de pedigree e fenotípicos, são elas: q(i) a SG permite selecionar com precisão animais no início da vida (mesmo na fase embrionária) utilizando as suas GEBVs e (ii) pode também prever os fenótipos que são muito difíceis ou onerosos para serem medidos, incluindo, mas não se limitando à, fertilidade, qualidade da carne, resistência a doenças, emissões de metano, e conversão alimentar (Hayes *et al.*, 2013). Em bovinos de leite, por exemplo, a SG pode reduzir o intervalo de geração por pelo menos dois anos, a medida que podemos pré-selecionar os tourinhos para serem ou submetidos ao teste de progênie ou utilizados diretamente nos programas de melhoramento, sem participarem do teste de progênie. Afirma-se que o aumento no ganho genético ou de renda é de 60 a 120% em relação aos métodos tradicionais de teste de progênie (Schaeffer, 2006; Pryce e Daetwyler, 2012), principalmente devido a redução drástica nos custos de criação de grande número de animais e seleção de apenas alguns como reprodutores. Um estudo recente no Brasil (Neves *et al.*, 2014) envolveu a avaliação da capacidade genômica preditiva para 13 diferentes características de peso de carcaça, duração da gestação, circunferência escrotal e dois índices de seleção usando 685 touros da raça Nelore usando o SNP chip Illumina Bovine HD (320.238 SNPs). Os resultados mostraram que a acurácia das predições genômicas variaram de 0,17 (umbigo à desmama) para 0,74 (precocidade de terminação). Para todas as características, os modelos de regressão Bayesiana (Bayes C e BLASSO) foram mais acurados do que o GBLUP. As acurácias empíricas médias foram de 0,39 (GBLUP0), 0,40 (GBLUP20) e 0,44 (Bayes C e BLASSO). Este estudo destacou e demonstrou que a seleção genômica pode ser utilizada em bovinos da raça Nelore do Brasil e, que com essa acurácia de seleção, pode-se esperar uma eficiência semelhante em raças bovinas leiteiras e em outras espécies de animais domésticos

Seleção genômica em embriões bovinos PIV

Ao se combinar a SG com a tecnologia de PIV, leva-se o potencial do melhoramento genético muito além do que pode ser obtido quando se utiliza qualquer uma dessas técnicas isoladamente (seja a SG ou a PIV). Primeiramente, a maioria dos estudos em genética indica que há uma variação hereditária na capacidade das vacas doadoras de produzir boa quantidade e

qualidade de oócitos (Merton *et al.*, 2009) e, da capacidade de vacas receptoras de manter a gestação e produzir bezerros PIV (Spell *et al.*, 2001; Konig *et al.*, 2007). A variação genética e herdabilidade são critérios fundamentais, porque se não houver variação genética ou herdabilidade para uma característica, não haverá possibilidade de realizar a SG. Fertilidade em geral, é uma característica de baixa herdabilidade em bovinos de leite e corte. Por exemplo, Kadarmideen *et al.* (2000, 2003) relataram estimativas de herdabilidade variando de 0,05 a 0,16 para características tais como taxas de não retorno ao estro ou taxas de concepção, dias para o estro e primeira inseminação, número de serviços por concepção, período de serviço e intervalo de partos em bovinos leiteiros da raça Holandesa.

A idade à puberdade tem um efeito importante sobre a eficiência produtiva, reprodutiva e econômica de fêmeas bovinas (Monteiro *et al.*, 2013). Eler *et al.* (2002) estimaram uma herdabilidade de 0,57 ± 0,01 para a taxa de concepção de novilhas jovens quando expostas a touros em estações de monta, e esta alta herdabilidade indica que a seleção genética poderia ser útil para selecionar novilhas com maior precocidade sexual. Além disso, estudos realizados na América do Sul relataram uma alta herdabilidade da idade à puberdade em raças zebuínas (Nogueira, 2004). Portanto, novilhas geneticamente selecionadas para a idade à puberdade, idade à primeira concepção, e, consequentemente, ao primeiro parto devem melhorar a eficiência reprodutiva em rebanhos bovinos. Estas características de fertilidade responderiam a SG devido à existência de variação genética entre os animais.

Com relação à base genética de atributos ou características que são importantes para PIV, Merton *et al.* (2009) analisaram dados do programa OPU-IVP da CRV (antiga Holland Genetics) de janeiro de 1995 a março de 2006 e relataram uma herdabilidade de 0,25 para número de complexos cumulus-oócitos, 0,09 para a qualidade de complexos cumulus-oócitos, 0,19 para o número e proporção de embriões clivados no dia 4, e 0,21 para número e a proporção de embriões totais e transferíveis no dia 7 de cultivo. Estas estimativas de herdabilidade estão pareadas com algunmas informações sobre características de produção de carne e leite que respondem muito bem à SG.

Como descrito acima, o maior aumento em ganho genético pode ser alcançado pela redução do intervalo entre gerações. No caso mais simples de aplicação da SG em PIV, o mérito genético de um animal ainda não nascido é previsto na fase de embriões antes da implantação em vacas receptoras. O ganho genético é, por conseguinte, melhorado rapidamente por redução substancial do intervalo entre gerações porque a seleção é feita em um animal antes dele nascer (Fisher *et al.*, 2012;. Ponsart *et al.*, 2014). Além disso, a disponibilidade de embriões PIV é muito maior comparado com animais vivos nascidos. Portanto, apenas alguns animais são escolhidos a partir de um grande número (na sua fase de embrião) com base no mérito genético (GEBVs), e o restante dos embriões é descartado - isto aumenta rapidamente a intensidade de seleção. A redução do intervalo de gerações e o aumento da intensidade de seleção levarão a um rápido melhoramento genético. A aplicação em larga escala de triagem genômica de embriões pré implantação (Genomic Screens of preimplantation Embryos - GSE) depende do seu custo-benefício para produtores comerciais. De fato, o uso de sêmen sexado em PIV associado com a GSE irá transformar os sistemas de produção de bovinos.

No entanto, a GSE mesmo antes de transferência de embriões ainda seria benéfica economicamente devido aos custos envolvidos na transferência de embriões (TE) de grande número de embriões em receptoras, que apresentam taxas de gestação diferentes, quando consideramos o uso de vacas ou novilhas. Além disso, o custo de criação de bezerros de TE de mérito genético desconhecido com posterior abate de animais inferiores também resultaria em grandes custos logísticos. Por estas razões, a GSE e a seleção de embriões antes da transferência maximizariam o lucro para os produtores, uma vez que permitiriam a transferência de um número "razoável" de embriões e a criação somente de animais com "razoável" mérito genético para a produção de carne ou leite. Na realidade , a GSE será necessária às empresas de melhoramento para que essas possam reduzir custos limitando o s número de TE e a manutenção de bezerros indesejados.

O uso da PIV pode ser ainda mais otimizado, se as vacas doadoras e o sêmen forem geneticamente avaliados para um número de características economicamente importantes (usar somente as vacas doadoras e touros com altos GEBVs em PIV). Isso parece não ser um problema para as grandes empresas de melhoramento de gado comercial, porque todos os animais que estão no programa de melhoramento são submetidos a SG e, portanto, seus GEBVs devem estar disponíveis. No entanto, o problema surge quando as empresas de PIV não estão integradas às empresas de produção de sêmen, e, portanto não têm acesso à informação do GEBV das vacas doadoras e do sêmen utilizados na FIV.

O fluxograma completo (representado na Fig. 1) mostra que, mesmo antes de realizar a GSE, somente vacas doadoras de mérito genético elevado devem ser usadas para OPU e somente sêmen (sexado ou não sexado) de touros de elevado mérito genético deve ser usado na FIV; assim embriões PIV produzidos a partir desses pais já são de elevado mérito genético. No entanto, devido à variância mendeliana das amostras, nem todos os embriões irmãos oriundos dos mesmos pais terão o mesmo mérito genético. A Figura 1 ilustra que o DNA pode ser extraído, e os embriões genotipados podem ser submetidos a GSE antes da transfer. Estas tecnologias de reprodução assistida (TRA), combinadas com a SG terão um impacto drastico nos países em desenvolvimento, onde o

acasalamento tradicional de animais, que melhora as taxas de gestação via inseminação artificial e SG, é difícil de ser atingido devido às limitações de custo e infraestrutura. Por exemplo, os melhores touros e vacas doadoras poderiam ser identificados dentro das grandes fazendas privadas ou de criatórios de repordutores semi-privados ou privados ou fazendas de teste de progênie pertencentes ao governo. Normalmente as empresas de PIV, com a ajuda de laboratórios de avaliação genética, podem produzir embriões de elevado mérito genético e entregar diretamente a lugares onde a TE ocorre. A TE é normalmente realizada em clínicas ou hospitais veterinários e centros de inseminação artificial do governo ou por técnicos empregados em grandes fazendas. Se a PIV e a SG obtiverem sucesso dentro e através de várias aldeias ou vilas, coordenada pelos centros regionais, isto irá conduzir ao melhoramento genético global rapidamente e contribuir para a segurança alimentar.

Desafios da SG em embriões bovinos PIV

Existem algumas limitações técnicas do quanto o uso em larga escala do GSE seria viável na prática. Há questões críticas na realização das biópsias de embriões e na obtenção de qualidade e quantidade suficiente de DNA para SG (Ponsart *et al.*, 2014). Enquanto que para a SG é necessário a realização das biópsias embrionárias para a extração de DNA e a amplificação do DNA para genotipagem, existem outras limitações técnicas , como a redução da cobertura do genoma, o drop-out de alelos em *loci* heterozigotos que leva a diminuição das taxas de determinação de genótipos por SNP em relação aos padrões limite necessários para as análises genéticas aprimoradas por genômica, a falta de genótipos, a amplificação de artefatos, ou drop-in de alelos (Lauri *et al.*, 2013; Kasinathan *et al.*, 2015).

Na Nova Zelândia, Fisher *et al.* (2012) conduziram um experimento de genotipagem utilizando biópsias de uma e três celulas, originárias de morulas bovinas e biópsia de trofoblasto de embriões em estágio de blastocisto e de qualidade para serem transferidos. Os autores concluíram que um maior número de células embrionárias na amostra resultou em uma maior média da taxa de determinação de genótipo e menor erro de replicação. A taxa de determinação de genótipo de 30-40 amostras de células de embrião se aproximou das taxas de 99% normalmente observadas em DNA parental obtido a partir de sangue. Essses resultados são encorajadores.

Ramos-Ibeas *et al.* (2014) estabeleceram um sistema de cultivo *in vitro* para manter o crescimento de células trofoblásticas bovinas a partir de uma biópsia de embriões utilizando meios condicionados com diferentes fontes de células, eliminando assim o risco de contaminação com células alimentadoras. Eles afirmam que os sistema de cultivo *in vitro* facilitaram o estabelecimento de linhagens de células trofoblásticas, que podem ser expandidas (cultivadas) por mais de dois anos e podem ser úteis para estudos que envolvem os processos de placentação. No contexto de genotipagem em larga escala para a SG, esta abordagem também pode ser utilizada para produzir uma quantidade relativamente grande de DNA genômico de boa qualidade para genotipagem e epigenotipagem de embriões bovinos. No geral, GSE em embriões OPU-PIV já está sendo realizada em algumas empresas privadas nos principais países industrializados produtores de de bovinosmas a sua aplicação generalizada ainda não está no patamar ideal.

Transferência nuclear de células somáticas (TNCS) na seleção genômic a

Recentemente, Kasinathan *et al.* (2015) propuseram uma maior redução no intervalo de geração e produção de bezerros de alto mérito genético através da combinação de avançados processos reprodutivos, como OPU-PIV e SG em embriões submetidos a transferência nuclear de células somáticas (TNCS). A coleta de embriões em estágio inicial de desenvolvimento no dia 21-23 após a TE e o estabelecimento de linhagens de células desses embriões, permitiu a determinação rápida do maior mérito genético entre um um grande número de embriões candidatos. Kasinathan *et al.* (2015) mostram que linhagens de células de fibroblastos estabelecidas a partir de embriões em estágio inicial e, subsequente SG em linhagens celulares permitiram a produção de bezerros com alto mérito genético por TNCS com eficiência comparável à embriões PIV. Este método reduz o intervalo de geração em cerca de 7 meses e oferece oportunidade para se produzir vários animais ao mesmo tempo ou em período determinado a partir linhagens celulares de fibroblastos congelados. Oa autores alegaram que a sua abordagem é escalável e pode levar economias consideráveis para os criadores, pela redução substancial no intervalo de gerações e com a produção seletiva de animais com a genética desejada dentro de um prazo de aproximadamente um ano.

Implementação

Nós propomos que, em geral, há quatro fases em que a SG pode ser aplicada em toda a cadeia produtiva: primeiro em vacas doadoras, segundo nos touros, terceiros em embriões pré-implantação e quarto em linhagens de células de fibroblastos. A diferença entre a terceira e quarta etapa é mínima porque o padrão genético do embrião ou do feto é o mesmo, com a diferença de que um feto pode já ter passado no útero por eventos de reprogramação, epigenética e/ou outros. Assim, devido aos custos e limitações práticas da obtenção de DNA adequado para genotipagem, a terceira fase da SG pode ser ignorada se a TNCS for realizada. Se a TNCS não for realizada, vão existir apenas a três primeiras etapas da SG. A SG em

embriões pré-implantação é altamente recomendada para, no mínimo, promover a melhora do mérito genético médio de todos os animais produzidos através de OPU-PIV e, para reduzir os custos de empresas e produtores pela redução das TE indesejáveis e da criação de bezerros com baixo potencial genético. Uma visão geral da SG de embriões, OPU-PIV, sexagem de embriões e TNCS para a disseminação rápida de alto mérito genético de animais na produção de bovino é apresentada na Fig. 1.

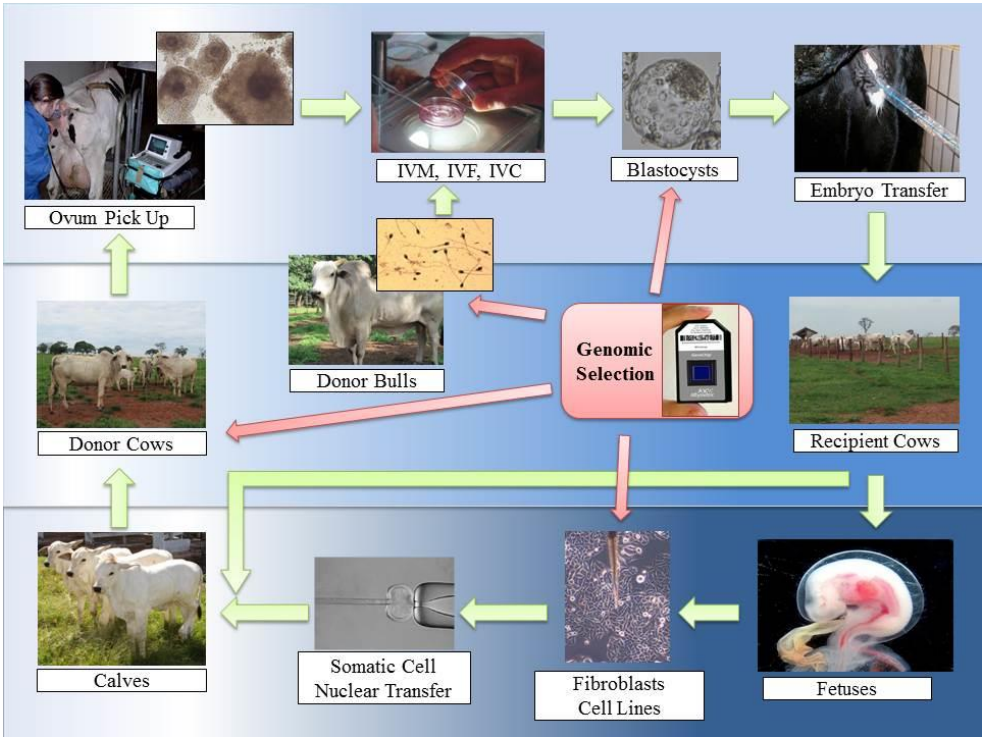

Figura 1. Fluxo de trabalho que descreve um ciclo de Seleção Genômica em vacas doadoras utilizados na OPU-PIV, em touros doadores de sêmen (sexado ou não sexado) utilizados na FIV e em embriões pré-implantação na produção rápida de bezerros de elevado mérito genético. Alternativamente, a seleção genômica é conduzida em linhagens celulares de fibroblastos de fetos e utilizadoa TNCS para a rápida produção de bezerros de elevado mérito genético.

Genomic Selection – Seleção Genômica; Donor cows- vacas doadoras; Donnor Bulls – touros doadores; Ovum pick-up (punção ovariana guiada por ultrassom- OPU); IVM – maturação *in vitro*; IVF – fertilização *in vitro*; IVC – cultivo *in vitro*; Blastocysts – blastocistos; Embryo transfer – transferência de embriões; Recipient cows – vacas receptoras; Fetuses – fetos; Fibroblast cell lines – linhages celulares de fibroblastos; Somatic Cell Nuclear Transfer – Transferência Nuclear de Célula Somática; Calves – bezerros.

Consórcio bilateral Dinamarca-Brasil do projeto GIFT

Grande parte dos comentários feitos neste documento estão realmente acontecendo no projeto bilateral Brasil-Dinamarca chamado GIFT (www.gift.ku.dk). Nosso objetivo é oferecer valores genômicos estimados de mérito genético (GEBVs) e herdabilidade (h2) para as principais características relacionadas a OPU-PIV e as taxas de gestação de novilhas e correlações com outras características pelo uso de ferramentas de avaliação genética convencionais. Características relacionasdas a OPU-PIV incluem Número de Oócitos (ON), Qualidade de oócitos (OQ), as taxas de gestação em vacas receptoras, bem como as taxas de nascimentos normais. Nós realizamos Estudos de Associação de Genoma Amplo (GWAS) para identificar genes e variantes genéticas (SNPs) que influenciam as características mais importantes da PIV em vacas e novilhas.Esperamos fornecer as informações necessárias para desenvolver um SNPchip de baixa densidade que pode melhorar as taxas de gestação de 40 para 60% e, o escore de foliculos/ovário de 1 para 5 em ambos os ovários. Com população referência de 600 animais, pretendemos realizar a predição genômica completa e os métodos de seleção genômica para características de OPU-PIV e, a seleção genômica para gestação em novilhas está sendo realizada com mais de 2000 animais da raça Nelore.

Legislação, ética e custos das TRA

No Brasil, a OPU-FIV é amplamente utilizada e não há barreiras legais. Os desafios são, na verdade, a melhoria da produção e qualidade de pastagens, produção em confinamento, Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF), FIV, TE, Transferência de Embriões em Tempo Fixo de embriões FIV, cálculo e uso de mérito genético (valores genéticos estimados) das vacas, novilhas e touros de IA em pecuária bovina, bem como uma melhor infraestrutura e administração. Isto terá um impacto importante na qualidade e quantidade da produção da carne bovina brasileira. A situação é mais ou menos semelhante na maioria dos países em desenvolvimento. Na Dinamarca, uma série de questões está relacionadas com a utilização desta gama de TRAs na criação e produção de bovinos. Entre as TRAs a TNCS é a mais discutida, já que legislação na Dinamarca proíbe a sua utilização da. No entanto, a questão é continuamente discutida tanto na Dinamarca quanto na UE, no que se refere a própria tecnologia, a sua influência no bem-estar animal e, os possíveis efeitos sobre os produtos alimentares resultantes. Não se sabe se isso mudará no futuro. A discussão ética está relacionada tanto com a visão geral das técnicas, a sua influência sobre os animais e, as atitudes do consumidor em relação aos produtos alimentares resultantes. Há uma visão geral negativa sobre o aumento do uso de TRAs na criação e produção de bovinos, e algumas das razões estão relacionadas a preocupações com o bem-estar animal. Como exemplos, pode-se citar a utilização repetida de agulhas para anestesia e para a obtenção de oócitos em OPU, bem como o risco potencial, tanto para a receptora quanto para o bezerro de PIV, relacionado com a síndrome do bezerro grande (large offspring syndrome - LOS). Problemas particularmente relacionados a LOS foram praticamente r resolvidos pela retirada de soro e melhora dos meios para o cultivo de embriões. Do lado positivo estão os avanços potenciais de uma seleção genética mais robusta quando os objetivos ddo melhoramente são, por exemplo, focados na redução da mastite, em aprumos mais fortes, menos doenças do aparelho digestivo, etc.

Uma discussão aberta e pública sobre estas questões é importante, e na Dinamarca, a assessoria do Conselho Governamental de Ética Animal é um participante chave. Esta discussão deve ter a participação também daqueles que realmente trabalham com estas tecnologias, e esse tipo de informação pode vir de qualquer lugar do mundo. Portanto, o projeto de pesquisa GIFT em curso pode ser uma fonte importante de informação, considerando a enorme experiência do Brasil no uso prático de todas estas TRAs.

Agradecimentos

Os autores agradecem o financiamento do Programme Commission on Health, Food and Welfare of the Danish Council for Strategic Research na Dinamarca e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) para o projeto GIFT (www.gift.ku.dk) . HNK agradece à EU-FP7 Marie Curie Actions - Career Integration Grant (CIG-293511) por financiar parte do seu tempo gasto com este artigo.

Referências

Aguilar I, Misztal I, Johnson D, Legarra A, Tsuruta S, Lawlor T. 2010. Hot topic: a unified approach to utilize phenotypic, full pedigree, and genomic information for genetic evaluation of Holstein final score 1. *J Dairy Sci*, 93:743-752.

Aparicio I, Garcia-Herreros M, O'Shea L, Hensey C, Lonergan P, Fair T. 2011. Expression, regulation, and function of progesterone receptors in bovine cumulus oocyte complexes during in vitro maturation. *Biol Reprod*, 84:910-921.

Arnold DR, Bordignon V, Lefebvre R, Murphy BD, Smith LC. 2006. Somatic cell nuclear transfer alters peri-implantation trophoblast differentiation in bovine embryos. *Reproduction*, 132:279-290.

Cebrian-Serrano A, Salvador I, García-Roselló E, Pericuesta E, Pérez-Cerezales S, Gutierrez-Adán A, Coy P, Silvestre M. 2013. Effect of the bovine oviductal fluid on in vitro fertilization, development and gene expression of in vitro-produced bovine blastocysts. *Reprod Domest Anim*, 48:331-338.

Conti M, Hsieh M, Park J-Y, Su Y-Q. 2006. Role of

the epidermal growth factor network in ovarian follicles. *Mol Endocrinol*, 20:715-723.

Eler JP, Silva J, Ferraz J, Dias F, Oliveira H, Evans J, Golden B. 2002. Genetic evaluation of the probability of pregnancy at 14 months for Nellore heifers. *J Anim Sci*, 80:951-954.

Elsik CG, Tellam RL, Worley KC. 2009. The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. *Science*, 324:522-528.

Fisher PJ, Hyndman DL, Bixley MJ, Oback FC, Popovic L, McGowan LT, Berg MC. 2012. Potential for genomic selection of bovine embryos. *Proc N Z Soc Anim Prod*, 72:156-158.

Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. 2008. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update*, 14:159-177.

Goddard ME, Hayes BJ. 2009. Mapping genes for complex traits in domestic animals and their use in breeding programmes. *Nat Rev Genet*, 10, 381-391.

Goddard M, Hayes B, Meuwissen T. 2011. Using the genomic relationship matrix to predict the accuracy of genomic selection. *J Anim Breed Genet*, 128:409-421.

Habier D, Fernando RL, Kizilkaya K, Garrick DJ. 2011. Extension of the Bayesian alphabet for genomic selection. *BMC Bioinformatics*, 12:186.

Hayes BJ, Lewin HA, Goddard ME. 2013. The future of livestock breeding: genomic selection for efficiency, reduced emissions intensity, and adaptation. *Trends Genet*, 29:206-214.

Hussein TS, Thompson JG, Gilchrist RB. 2006. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. *Dev Biol*, 296:514-521.

International Embryo Transfer Society. 2014. Statistics and data retrieval committee report. *Embryo Transfer Newslett*, 32(4).

Izadyar F, Zeinstra E, Bevers M. 1998. Follicle-stimulating hormone and growth hormone act differently on nuclear maturation while both enhance developmental competence of in vitro matured bovine oocytes. *Mol Reprod Dev*, 51:339-345.

Kadarmideen H, Thompson R, Simm G. 2000. Linear and threshold model genetic parameters for disease, fertility and milk production in dairy cattle. *Anim Sci*, 71:411-419.

Kadarmideen HN, Thompson R, Coffey MP, Kossaibati MA. 2003. Genetic parameters and evaluations from single-and multiple-trait analysis of dairy cow fertility and milk production. *Livest Prod Sci*, 81:183-195.

Kadarmideen HN, von Rohr P, Janss LL. 2006. From genetical genomics to systems genetics: potential applications in quantitative genomics and animal breeding. *Mamm Genome*, 17:548-564.

Kadarmideen HN, Reverter A. 2007. Combined genetic, genomic and transcriptomic methods in the analysis of animal traits. *CABI Review: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 2(042).

Kadarmideen HN. 2014. Genomics to systems biology in animal and veterinary sciences: progress, lessons and opportunities. *Livest Sci*, 166:232-248.

Kasinathan P, Wei H, Xiang T, Molina JA, Metzger J, Broek D, Kasinathan S, Faber DC, Allan MF. 2015. Acceleration of genetic gain in cattle by reduction of generation interval. *Sci Rep*, 5:8674. doi: 10.1038/srep08674.

König S, Bosselmann F, Von Borstel U, Simianer H. 2007. Genetic analysis of traits affecting the success of embryo transfer in dairy cattle. *J Dairy Sci*, 90:3945-3954.

Lauri A, Lazzari G, Galli C, Lagutina I, Genzini E, Braga F, Mariani P, Williams JL. 2013. Assessment of MDA efficiency for genotyping using cloned embryo biopsies. *Genomics*, 101:24-29.

Machado GM, Caixeta ES, Lucci CM, Rumpf R, Franco MM, Dode MAN. 2012. Post-hatching development of bovine embryos in vitro: the effects of tunnel preparation and gender. *Zygote*, 20:123-134.

Merton J, Ask B, Onkundi D, Mullaart E, Colenbrander B, Nielen M. 2009. Genetic parameters for oocyte number and embryo production within a bovine ovum pick-up–in vitro production embryo-production program. *Theriogenology*, 72:885-893.

Meuwissen THE, Hayes BJ, Goddard ME. 2001. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics*, 157:1819-1829.

Monteiro F, Mercadante M, Barros C, Satrapa R, Silva J, Oliveira L, Saraiva N, Oliveira C, Garcia J. 2013. Reproductive tract development and puberty in two lines of Nellore heifers selected for postweaning weight. *Theriogenology*, 80:10-17.

Nautiyal J, Steel JH, Rosell MM, Nikolopoulou E, Lee K, DeMayo FJ, White R, Richards JS, Parker MG. 2010. The nuclear receptor cofactor receptor-interacting protein 140 is a positive regulator of amphiregulin expression and cumulus cell-oocyte complex expansion in the mouse ovary. *Endocrinology*, 151:2923-2932.

Neves HHR, Carvalheiro R, O'Brien AMP, Utsunomiya YT, do Carmo AS, Schenkel FS, Sölkner J, McEwan JC, Van Tassel CP, Cole JB, Silva MVGB, Queiroz SA, Sonstegard TS, Garcia JF. 2014. Accuracy of genomic predictions in *Bos indicus* (Nellore) cattle. *Genet Sel Evol*, 46:17, doi:10.1186/1297-9686-46-17.

Nogueira G. 2004. Puberty in south american *Bos indicus* (Zebu) cattle. *Anim Reprod Sci*, 82:361-372.

O'Neill CJ, Swain DL, Kadarmideen HN. 2010. Evolutionary process of *Bos taurus* cattle in favourable versus unfavourable environments and its implications for genetic selection. *Evol Appl*, 3:422-433.

Ozawa M, Sakatani M, Hankowski K, Terada N, Dobbs K, Hansen P. 2012. Importance of culture conditions during the morula-to-blastocyst period on capacity of inner cell-mass cells of bovine blastocysts for establishment of self-renewing pluripotent cells. *Theriogenology*, 78:1243-1251. e1242.

Pasque V, Gillich A, Garrett N, Gurdon JB. 2011.

Histone variant macroH2A confers resistance to nuclear reprogramming. *EMBO J*, 30:2373-2387.

Paula-Lopes F, De Moraes A, Edwards J, Justice J, Hansen P. 1998. Regulation of preimplantation development of bovine embryos by interleukin-1β. *Biol Reprod*, 59:1406-1412.

Peluffo MC, Ting AY, Zamah AM, Conti M, Stouffer RL, Zelinski MB, Hennebold JD. 2012. Amphiregulin promotes the maturation of oocytes isolated from the small antral follicles of the rhesus macaque. *Hum Reprod*, 27:2430-2437.

Ponsart C, Le Bourhis D, Knijn H, Fritz S, Guyader-Joly C, Otter T, Lacaze S, Charreaux F, Schibler L, Dupassieux D. 2014. Reproductive technologies and genomic selection in dairy cattle. *Reprod Fertil Dev*, 26:12-21.

Pryce J, Daetwyler H. 2012. Designing dairy cattle breeding schemes under genomic selection: a review of international research. *Anim Prod Sci*, 52:107-114.

Ramos-Ibeas P, Calle A, Pericuesta E, Laguna-Barraza R, Moros-Mora R, Lopera-Vásquez R, Maillo V, Yáñez-Mó M, Gutiérrez-Adán A, Rizos D. 2014. An efficient system to establish biopsy-derived trophoblastic cell lines from bovine embryos. *Biol Reprod*, 91:15. doi: 10.1095/biolreprod.114.118430.

Richard FJ, Tsafriri A, Conti M. 2001. Role of phosphodiesterase type 3A in rat oocyte maturation. *Biol Reprod*, 65:1444-1451.

Rizos D, Gutierrez-Adan A, Perez-Garnelo S, De La Fuente J, Boland M, Lonergan P. 2003. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol Reprod*, 68:236-243.

Schaeffer L. 2006. Strategy for applying genome-wide selection in dairy cattle. *J Anim Breed Genet*, 123:218-223.

Spell A, Beal W, Corah L, Lamb G. 2001. Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. *Theriogenology*, 56:287-297.

Takahashi T, Morrow JD, Wang H, Dey SK. 2006. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E2 directs oocyte maturation by differentially influencing multiple signaling pathways. *J Biol Chem*, 281:37117-37129.

Tremblay K, Vigneault C, McGraw S, Morin G, Sirard M-A. 2006. Identification and characterization of a novel bovine oocyte-specific secreted protein gene.*Gene*, 375:44-53.

Competência no desenvolvimento oócitário e qualidade embrionária: melhorias e novas perspectivas

I. Gilbert, A. Macaulay, C. Robert[1]

Département des Sciences Animales, Centre de Recherche en Biologie de la Reproduction, Institut sur la Nutrition et les Aliments Fonctionnels, Université Laval, Québec, QC, Canada.

Resumo

A produção *in vitro* de embriões é a base do tratamento da infertilidade em humanos e é cada vez mais utilizada em bovinos para a propagação de animais de alto mérito genético. Muitas abordagens diferentes foram testadas para aumentar a sua eficiência, as quais, todas se baseiam em conceitos de qualidade e competência no desenvolvimento oocitário. Serão apresentados relatos recentes e perspectivas relacionadas à biologia de oócitos bovinos e análise da qualidade dose blastocistos abordando conceitos sob um ângulo diferente, corroborando a natureza complexa da janela de desenvolvimento dinâmica que envolve desde o final da oogênese até o desenvolvimento do blastocisto. Recentemente foi relatado que o caráter atípico do oócito é mantido por uma vasta nutrição fornecida pelas células do cumulus que o rodeiam, sob a forma de grande transferência de carga, bem como de fosfocreatina, como um meio alternativo de produção de ATP para se atenderem as altas necessidades de energia dos oócitos durante o processo de maturação. Demonstrou-se que na maioria das vezes os determinantes da embriogênese inicial estão incorporados no oócito, no entanto, a análise do transcriptoma não associa a recuperação embrionária a qualidade. Dentro da expressão diferencial de genes, longos RNAs não-codificantes representam uma classe muito diversificada de transcritos que ainda não foram caracterizados sob o ponto de vista funcional, Considerados em conjunto, é necessária uma definição mais clara de qualidade de ambos, oócito e embrião a fim de dar suporte à melhoria da produção *in vitro* de embriões.

Palavras chave: qualidade embrionária, competência oocitária, transferência de RNA.

Introdução

O sucesso reprodutivo pode ser resumido, no âmbito geral, como o nascimento de uma progênie viável e saudável. Para esta conquista se dá após a conclusão de numerosas etapas complexas e seletivas de desenvolvimento que ocorrem ao longo do processo reprodutivo. Curiosamente, muito poucos gametas têm a chance de contribuir para a geração seguinte, e o sucesso reprodutivo depende muito da qualidade desses gametas. Descobertas recentes sugerem uma contribuição adicional do gameta masculino por meio da transferência de proteínas (Saunders *et al.*, 2002) e RNA (Ostermeier *et al.*, 2004) no momento da fertilização e também de um legado epigenético (Lambrot *et al.*, 2013), porém a constituição do embrião inicial é dependente da constituição do oócito. Além do genoma materno, o oócito também fornece os componentes citoplasmáticos incluindo as reservas de RNA e proteínas, bem como o contingente mitocondrial, todos eles necessários para sustentar o desenvolvimento embrionário inicial.

Para alcançar o sucesso reprodutivo, o oócito deve exibir competência para retomar a meiose, clivar após a fecundação, sustentar o desenvolvimento inicial (ou seja, ativar o seu genoma), estabelecer uma gestação e sustentar o crescimento e desenvolvimento do feto até o nascimento. É bem aceito que o sucesso nos primeiros eventos não garante sucesso nos eventos subsequentes (Sirard *et al.*, 2006). É esta capacidade de completar estes passos com sucesso que é referida como competência de desenvolvimento. Como já foi discutido, competência de desenvolvimento é um conceito "conveniente, mas biologicamente confuso" (Duranthon e Renard, 2001) uma vez que em seu sentido mais amplo, o impacto do oócito é carreado até o nascimento de uma progênie saudável e fértil. No entanto, outros fatores, excluindo-se o oócito, têm que ser considerados, como a interação recíproca entre o concepto e o endométrio, no estabelecimento de uma gestação. Geralmente, é utilizada mais precisamente quando a competência de desenvolvimento intrínseca do oócito é estudada até o estágio de blastocisto, após isto, as exigências para o ambiente uterino tornam-se fatores de confundimento.

Ao comparar as taxas de produção de blastocisto produzidos *in vitro* ou *in vivo*, existem três processos principais que sem dúvida afetam os resultados do desenvolvimento; eles são a maturação do oócito, a fertilização e o cultivo de embriões. Demonstrou-se que esta visão resumida da capacidade de desenvolvimento é influenciada fortemente pela qualidade dos oócitos no início e finalização da maturação (Rizos *et al.*, 2002). Ainda hoje, as características que definem a qualidade do oócito são vagas e subjetivas. Estudos focados na morfologia da nuvem de células somáticas que rodeiam o oócito e o aspecto visual do citoplasma do gameta (Blondin e Sirard, 1995). Usando estas características, é possível escolher um subconjunto de complexos cumulus-oócito

Autor correspondente**:** claude.robert@fsaa.ulaval.ca

(CCOs) que irá atingir o estágio de blastocisto *in vitro* em uma proporção maior do que os demais, mas as taxas são raramente superiores a 50% e alguns COCs que não atingem os critérios são capazes de produzir um embrião viável.

Em complemento, tem-se demonstrado que o microambiente ao qual o oócito é submetido, pode ter um impacto profundo na proporção de oócitos que atingem o estágio de blastocisto (Lequarre *et al.,* 2005). A fim de melhorar a taxa de produção embrionária *in vitro,* foram testadas condições como a tensão de oxigênio (Quinn e Harlow, 1978; Olson e Seidel 2000; Corrêa *et al.,* 2008) e a composição do meio (Harper e Brackett, 1993ab, Lonergan *et al.,* 1996; Baldoceda-Baldeon *et al.,* 2014) mostraram aumentar o número de blastocistos, mas ainda raramente em taxas maiores que 50%. A maior parte destes estudos foram feitos usando COCs aspirados de ovários coletados *post-mortem*. Usando essa fonte, demonstrou-se que a obtenção de COCs imediatamente após a morte leva a taxas mais baixas de blastocisto, enquanto ao deixar os ovários incubando em solução salina aquecida por algumas horas antes da aspiração dos COCs melhora as taxas de blastocisto (Blondin *et al.,* 1997). O mecanismo pelo qual a qualidade do oócito melhora dentro do folículo que está em processo de morte ainda é desconhecido, mas isto é, novamente, um bom exemplo de como o microambiente do oócito pode influenciar a aquisição de competência para o desenvolvimento.

Considerando que os tamanhos dos folículos selecionados a partir destes ovários *post-mortem* são geralmente entre 3 e 8 mm, ao passo que um folículo bovino pré-ovulatório pode chegar a mais de 20 mm (Quirk *et al.,* 1986), a produção subótima de embriões poderia, assim, estar associada ao crescimento folicular incompleto ou representar uma situação em que nem todos os oócitos são capazes de adquirir competência para o desenvolvimento. Esta última afirmativa foi testada quando medianted manipulação do ambientehormonal durante estimulação ovariana produziu grupos de oócitos imaturos por vezes, a uma taxa de 100%, foram capazes de sustentar o desenvolvimento *in vitro* e atingir a fase de blastocisto (Blondin *et al.,* 2002;. Nivet *et al,* 2012). Muitas revisões já sintetizaram essas observações (Sirard *et al.,* 2006; Fair, 2010; Keefe *et al.,* 2015; Moussa *et al.,* 2015). No entanto, o caráter dos sinais indutores da aquisição de competência para o desenvolvimento é desconhecido, tanto quanto as características que distinguem um oócito competente para o desenvolvimento dos demais.

A necessidade de se compreender e melhorar a qualidade do oócito é salientada pela aplicação de tecnologias de reprodução assistida (TRAs), tanto em humanos para aliviar problemas de infertilidade, quanto na pecuária para aumentar a taxa de reprodução direcionada. No campo da produção de embriões *in vitro* (PIV) os esforços são direcionados para a melhoria dos sistemas de cultivo visando aumentar a produção de blastocistos, o que agora gera algumas preocupações no que diz respeito ao potencial destas condições em causarem efeitos a curto e longo prazo sobre a qualidade do embrião. Estes efeitos de condições de cultivo podem ser observados como: mudança na cinética do desenvolvimento (Holm *et al.,* 2002), aumento da relação macho:fêmea (Kimura *et al.,* 2005, 2008), e menor tolerância a criopreservação (Rizos *et al.,* 2003, 2008). Sabe-se também que o metabolismo *in vitro* de embriões varia de acordo com as condições de cultivo e difere das condições *in vivo* (Krisher *et al.,* 1999; Khurana e Niemann, 2000).

As preocupações com o impacto do cultivo sobre o desenvolvimento de fenótipos patológicos, potencialmente carreados em estágios muito mais tardios ao estádio de blastocisto, foram relatados na virada do milênio. A produção de embriões *in vitro* foi associada com a síndrome do bezerro grande/anormal em ruminantes (Young *et al.,* 1998; McEvoy *et al.,* 2000), que foi, em seguida, comparada em humanos com a alta frequência de distúrbios de *imprinting* ou seja, as síndromes de Beckwith-Wiedemann, Angelmann, de Prader-Willi e de Silver-Russel (revisado por Jacob e Moley, 2005), além da maior taxa de aborto e anomalia fetal (Taverne *et al.,* 2002). Preocupações sobre o impacto a longo prazo das TRAs agora abrangem todas as etapas, incluindo desde o tratamento de estimulação ovariana (Denomme e Mann, 2012, 2013), devido aos seus efeitos potenciais sobre o desenvolvimento fetal, e até mesmo no desenvolvimento de doenças na vida adulta (Chen *et al.,* 2011; Hart e Norman 2013a,b; Chen *et al.,* 2014). Acredita-se que estes impactos a longo prazo são sustentados pela epigenética e até agora, foram estudados com foco no padrão de metilação do DNA. Estas preocupações trazem a necessidade de se definir qualidade embrionária e incluir um conceito pertinente para embrião saudável ou "normal".

A análise do transcriptoma tem sido utilizada principalmente como um meio de comparação entre os embriões produzidos *in vivo* com os produzidos *in vitro*. Estes estudos foram realizados principalmente com o intuito de melhorar a qualidade embrionária e proporcionar maior capacidade de desenvolvimento. Várias revisões recentes têm avaliado as observações transcriptômicas (Driver *et al.,* 2012; Gad *et al.,* 2012) e, como esperado, devido a um ambiente diferente, as células embrionárias adaptam a sua expressão gênica. O desafio continua para determinar quais genes ou suas extensões estão associados com a qualidade embrionária ou se há desacordo entre eles que levarão a fenótipos ruins. Ambos os conceitos de competência de desenvolvimento do oócito e qualidade embrionária estão intimamente ligados e podem ser de caráter distinto. É necessária uma melhor compreensão da biologia do oócito como uma base para se definir o que é um "bom" oócito, da mesma forma, uma melhor compreensão da embriogênese para se definir dentro de qual intervalo o embrião pode ser definido como "bom".

Observações recentes adicionam complexidade a estes conceitos. O modelo bovino tem sido utilizado para uma potencial aplicação na produção de embriões de vacas doadoras de alto mérito genético, bem como como um modelo valioso para a reprodução humana, uma vez que bovinos são grandes mamíferos monovulares, com semelhantes dinâmica folicular e cinética da embriogênese.

Biologia do oócito

Sabe-se que o gameta adquire competência de desenvolvimento quando atinge seu tamanho final. Em bovinos, oócitos provenientes de folículos de <2 mm não atingiram seu tamanho final e têm pouca capacidade para amadurecer, enquanto oócitos em seu tamanho máximo são encontradas em folículos de 3 mm e tem torno de 30-35% se desenvolvem para atingir estágio de blastocisto (Motlik *et al.,* 1984; Fair *et al.,* 1995;. Feng *et al.,* 2007). Sabe-se que a oogenese progride em sincronia com a foliculogênese através da estreita interdependência sobre as comunicações bilaterais que ocorrem entre as células foliculares e o gameta. As células da granulosa comunicam por meio de sinalização parácrina (por exemplo, peptídeos semelhantes a EGF; Gilchrist, 2011), enquanto as células do cumulus e mais precisamente as camadas internas da corona radiata, a qual contém extensões celulares que alcançam a zona pelúcida (Fig. 1), se comunicam com o oócito através das junções comunicantes encontradas na articulação entre a extremidade das projeções e a membrana plasmática do oócito.

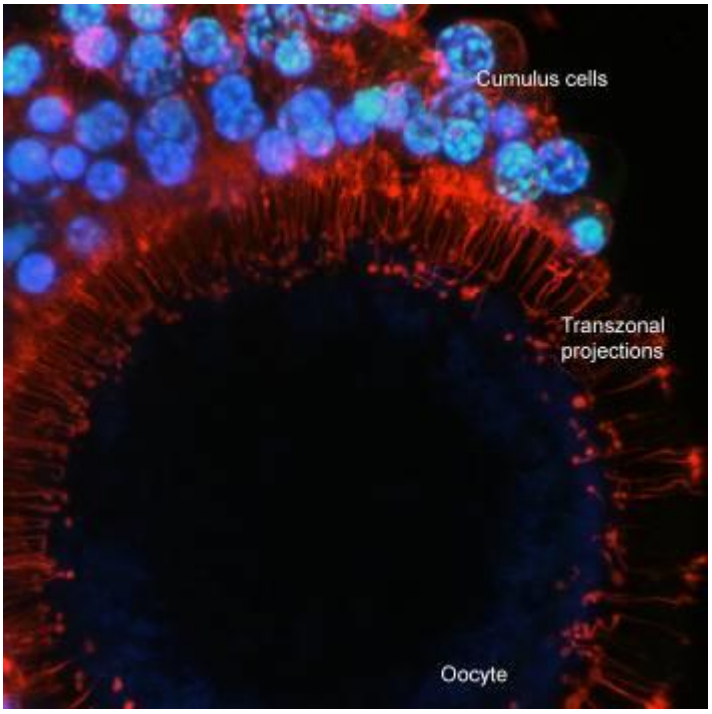

Figura 1. Imagem de intensidade máxima de microscopia confocal mostrando a projeção transzonal. Numerosos microfilamentos de actina em projeções estão em vermelho pela coloração rodamina-faloidina. Núcleos das células do cumulus estão corados em azul (Hoechst 33342).

A transferência de carga para o oócito

Transferência direta a partir de células somáticas para o oócito ocorre onde nucleotídeos cíclicos controlam a retomada da meiose. A importância desta comunicação foi objeto de revisão recente (Gilchrist, 2011). Também sabe-se, que o uso de junções comunicantes (gap junctions) limita o tamanho do material transferido para <1 kDa. Em outros modelos animais isso é diferente, como *c. elegans* e *drosophila* onde materiais de maior volume são transportados durante a oogênese a partir de canais que fazem ponte entre os oócitos de células de suporte (Deng e Lin, 1997;. Wolke *et al.,* 2007). Recentemente reportamos que as projecções transzonais (TZPs) são grandes canais constituídos de filamentos de actina (Macaulay *et al.,* 2014). Foram encontrados grânulos de RNA abundantemente dentro destas estruturas e, a partir de um ensaio de marcação *de novo* combinado com um levantamento do transcriptoma do RNA encontrado dentro da zona pelúcida, propôs-se que os transcritos de células do cumulus são seletivamente transportados ativamente para o oócito. O transcriptoma era composto de RNAs mensageiros, assim como longos RNAs não-codificantes (Macaulay *et al.,* 2014). A análise da interligação mostrou que as vesículas são segregadas e o

contato é mantido até 9 h após o início da maturação, e após isto, as ligações se separaram e são completamente desfeitas em 22 h (Macaulay *et al.*, 2014). A comparação do transcriptomas antes e após a maturação permitiu a identificação de mRNAs em maior abundância durante a maturação do gameta. A origem a partir das células do cumulus é suportada pelo conhecido silenciamento transcricional que ocorre no oócito, associado a condensação da cromatina (Lodde *et al.*, 2008), além do fato de que o aumento foi apenas observado em COCs intactos não em oócitos desnudados (Macaulay *et al.*, 2014). A transferência de grandes cargas foi comprovada ainda, por meio da reconstrução COCs; colocando oócitos desnudos em cultivo com células do cumulus transfectadas com uma proteína de fusão GFP. Após reconstituição, ambos, transcritos e a proteína GFP, foram detectados no oócito (Macaulay *et al.*, 2014). A partir destes resultados, parece que as células somáticas continuam a nutrir o gameta mesmo durante o seu período de silenciamento trancricional. A contribuição destas transferências para a qualidade do oócito e competência de desenvolvimento continua a ser estabelecida. Dados recentes indicam que um subconjunto dos mRNAs transferidos poderia ser traduzido e desempenhar um papel no apoio à maturação (Macaulay *et al.*, 2015; Université Laval, Québec, Canadá; artigo submetido para publicação). Isso abre uma janela de oportunidade para influenciar a qualidade do oócito através das células do cumulus. Além disso, sabe-se que o desenvolvimento inicial baseia-se em estoques de RNAm materno, e que antes da ativação do genoma, transcritos estabilizados em partículas de ribonucleotídeos são recrutados para dar suporte à demanda de síntese de proteínas (Sternlicht e Schultz, 1981). Dessa forma, as células do cumulus poderiam complementar as reservas maternas durante a última fase de preparação do COC.

As células do cumulus são também conhecidos por apoiar o oócito através da transferência de substratos energéticos, tais como lactato e piruvato (Bilodeau-Goeseels, 2006). Tipicamente, a produção de ATP é sustentada pela glicólise, que produz piruvato que é transportado para as mitocôndrias para ser metabolizado através do ciclo de Krebs e da fosforilação oxidativa, que ocorre nas cristas. No entanto, o oócito dos mamíferos é uma célula atípica em que se verificou que a via glicolítica é prejudicada em virtude da falta da enzima fosfofrutoquinase (Cetica *et al.*, 2002). Como uma alternativa, o piruvato é bombeado a partir das células do cumulus para o oócito, onde é metabolizado para gerar ATP (Conti *et al.*, 2002;. Bilodeau-Goeseels *et al.*, 2007). No entanto, a extensão dessa produção de energia pode ser questionada, pois o contingente mitocondrial do gameta é atípico, exibindo uma forma ovóide/arredondada com poucas cristas e que podem ser encapuzados ou conter um vacúolo (Bavister e Squirrell, 2000). Acredita-se que o baixo potencial para fosforilação oxidativa é compensado pelo grande número mitocôndrias (250,000-300,000; revisado por Sutton-Mcdowall *et al.*, 2010).

Ao se explorar o transcriptoma dos polirribossomos durante a maturação do oócito, a característica que se destacou principalmente, é o fato de que a adenilato quinase e a creatina quinase foram altamente representadas nesta subpopulação de mRNAs ativamente traduzidos (Scantland *et al.*, 2011, 2014). Isto enfatiza um potencial de contribuição da via de resgate da adenosina para o acúmulo de ATP do oócito. Este processo necessita de duas reações enzimáticas. A primeira envolve a adenilato-ciclase, que catalisa a interconversão de nucleotidios de adenina, e a segunda é realizada com a creatina quinase que catalisa a conversão de fosfocreatina e ADP para gerar creatina e ATP (Fig. 2).

Mitocôndrias e a produção de energia do oócito

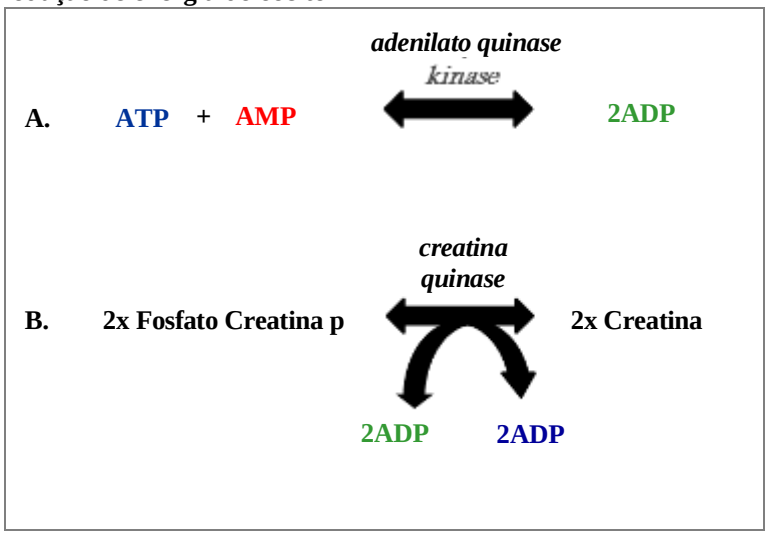

Figura 2. Adenilato quinase e creatina quinase mantêm as concentrações de ATP durante a maturação do oócito.

Por meio da mensuração da concentração de ATP durante a maturação e a adição de inibidores específicos e substratos, mostrou-se que o oócito bovino é capaz de fosforilar AMP para produzir ATP, a, (Scantland *et al.,* 2014). O modelo proposto é baseado na reciclagem do resíduo gerado pela retomada da meiose. Mais precisamente, a grande quantidade de AMP cíclico (cAMP), produzido nas células do cumulus e transferido ao oócito para controlar pausa da meiose, é convertida em AMP por meio da atividade de fosfodiesterase, quando a retomada da meiose é desencadeada, deixando AMP livre para a via de recuperação da adenosina. Esta fonte alternativa de ATP pode ser importante para a qualidade dos oócitos a fim de suportar a síntese de proteínas e a fosforilação, importantes para a maturação do oócito (Stojkovic *et al.,* 2001). O impacto mitocondrial pode agir a longo prazo, devido às suas inúmeras funções além da produção de energia. Na verdade, as mitocôndrias também desempenham um papel central em outros processos subjacentes à qualidade e competência para o desenvolvimento do oócito. As mitocôndrias têm um importante papel na fecundação (sendo envolvidas no armazenamento intracelular de cálcio) e o desenvolvimento do embrião (sendo o centro de controle da morte celular programada; Santos *et al.,* 2006).

É no estágio de 4 a 16 células que as mitocôndrias alongam-se e os números de cristas aumentam em paralelo a maior demanda de glicose e piruvato (Thompson *et al.,* 1996, Bavister e Squirrell, 2000; Wilding *et al.,* 2009). Mostrou-se que a redução da eficiência da respiração mitocondrial e do conteúdo de ATP no oócito e no embrião inicial está correlacionada com uma diminuição do desenvolvimento do embrião, e que o envelhecimento materno também influencia essa relação (Stojkovic *et al.,* 2001; Nagano *et al.,* 2006; Wilding *et al.,* 2009). Além disso, o envelhecimento materno também foi associado com mitocôndrias metabolicamente menos ativas, o que pode gerar impactos a longo prazo, uma vez que a progênie possui maior risco de desenvolvimento de obesidade e outras síndromes metabólicas (Wilding, 2015). Estas observações exemplificam como a qualidade do oócito pode influenciar, não só a competência de desenvolvimento e qualidade embrionária, mas também transmitir efeitos de longo prazo sobre a saúde, que persistem na vida adulta.

Qualidade embrionáia

Para aumentar as taxas de blastocisto, as condições de cultivo foram extensivamente modificadas por meio da adição de compostos que captam radicais livres ou aumentam a sobrevivência de células pela adição de compostos anti-apoptóticos (Brison e Schultz, 1997; Kolle *et al.,* 2002; Livingston *et al.,* 2004; Block *et al.,* 2008; Khalil *et al.,* 2013; Wang *et al.,* 2013). Em última análise, permanece o desafio de se determinar quais os embriões são "sadios" para a transferência. Dessa forma, diferentes características morfológicas são usadas para avaliar a qualidade do embrião, como a cinética de desenvolvimento, em que taxas de clivagem mais rápidas (embriões que atingem 2 células mais rapidamente) levam a maiores taxas de blastocisto, semelhantes a embriões que apresentam duração do ciclo celular "normais" ou visualizando a estrutura embrionária em busca de células simétricas, homogeneidade no embrião, menor fragmentação, menor número de células em apoptose, distribuição de linhagem celular apropriada pela proporção massa celular interna/ trofectoderma (MCI / TE), ou uma interação célula- célula onde as junções comunicantes mais apertadas têm preferência (Lee *et al.,* 1987; Van Soom *et al.,* 1997a, b; Holm *et al.,* 2002; Houghton *et al.,* 2002). Estas características de classificação podem ser subjetivas e os resultados variáveis são muitas vezes obtidos no que diz respeito à sua semelhança *in vivo* ou com o sucesso gestacional após a transferência.

Consequências dos sistemas de cultivo *in vitro*

Como mencionado, desde a introdução da produção *in vitro* de embriões, as taxas de blastocisto foram melhoradas através da utilização de condições mais adequadas de ambiente, incluindo a composição e a suplementação dos meios. No entanto, a produção de embriões a partir de oócitos aspirados de ovários coletados em matadouro atingiu um platô correspondente a 30 a 40% dos oócitos se desenvolvendo em blastocistos. As estratégias de melhoria geralmente usam a taxa de blastocisto como a medida alvo em que o aumento da produção de embriões equivale a um sistema de produção melhor, o que muitas vezes é também interpretado como aquele que produz embriões de melhor qualidade. As observações de mudanças na proporção entre os sexos e o aumento da frequência de partos difíceis, devido ao crescimento excessivo da prole, levantou questões sobre os impactos das condições de cultivo sobre a qualidade embrionária. A presença de componentes de origens biológica (soro, BSA, hormônios) tem sido abordada, uma vez que sua utilização é agora conhecida por representar uma importante fonte de variação devido a contaminantes que permanecem após purificação (Kane, 1983; Batt e Miller, 1988; Rorie *et al.,* 1994). Por mais de uma década, estudou-se a expressão gênica em embriões a fim de determinar os impactos das condições de cultivo, bem como uma tentativa de estabelecer uma definição de qualidade embrionária (Wrenzycki *et al.,* 2007; Carter *et al.,* 2010; Clemente *et al.,* 2011). Até agora, tem sido um desafio se comparar os resultados entre os estudos devido à utilização de plataformas tecnológicas distintas, bem como devido à dificuldade na interpretação dos resultados uma vez que, pelo menos, dois efeitos de confundimento surgem de qualquer modificação de meio de cultivo embrionário

onde o desvio da expressão de genes é parte da resposta celular natural ou talvez uma parte de uma resposta predeterminada (revisado por Robert, 2010; Robert *et al.*, 2011). Isto é provocado pela falta de uma referência de qualidade em que a comparação com embriões produzidos *in vivo* é um pouco inadequada. Embora esta seja a referência mais natural, espera-se também que condições *in vitro* deveriam levar aalgum desvio da expressão de genes uma vez que ambos os tipos de embriões (*in vivo* e *in vitro*) desenvolvem-se em um microambiente muito diferente. De fato, as divergências transcriptômicas são esperadas, mas quando estes desvios tornam-se um sinal de baixa qualidade? A avaliação temporal do estágio de desenvolvimento entre embriões *in vivo* e *in vitro* é também um desafio uma vez que o tempo pós-inseminação é diferente do tempo pós-fertilização. Também tem sido um desafio determinar a diferença entre os efeitos do tratamento e o desvio na expressão gênica causados por uma mudança na cinética de desenvolvimento, consequência da comparação entre blastocistos de diferentes estágios de desenvolvimento ou por uma mudança na proporção de sexos, que enfatizam as diferenças associados ao gênero na expressão gênica (Bermejo-Alvarez *et al.*, 2010). Estes podem tornar-se fatores de confundimento, mas também fazem parte do efeito do tratamento, por exemplo um tratamento pode induzir uma mudança na cinética de desenvolvimento que conduzirá à comparação de embriões em estágios de desenvolvimento um pouco diferentes (blastocistos iniciais comparados com blastocistos expandidos); em tal situação, a comparação de transcriptomas irá identificar desvios que não podem ser um sinal de que os embriões são anormais, mas pode sim ser representativos das diferenças nas populações embrionárias.

Em um de nossos estudos, o transcriptoma embrionário foi comparado em dez sistemas diferentes de produção *in vitro* (Tabela 1; Cote *et al.*, 2011). A premissa inicial foi coletar embriões em um determinado momento pós-fertilização, e comparar blastocistos coletados sem selecionar por morfologia embrionária ou de gênero uma vez que qualquer modificação desses fatores é parte do efeito do tratamento. Mais uma vez, em embriões produzidos *in vitro* foram comparados com embriões produzidos *in vivo*, utilizados como referência. Resultados inesperados mostraram que alguns tratamentos com baixa produção embrionária resultaram em assinaturas transcriptômicas mais próximas da referência *in vivo* do que os sistemas de elevados de rendimento, e que estes sistemas de alto rendimento foram caracterizados por populações embrionárias muito heterogêneas. Para conciliar estas observações propusemos que o aumento das taxas de produção de embriões exige condições mais favoráveis que aumentam a cinética de desenvolvimento e permitem a sobrevivência de embriões mais fracos que de outra forma iriam morrer. Nós levantamos a questão de que pode ser necessário eliminar os embriões fracos para minimizar a expressão de fenótipos pobres (Cote et al. 2011). Embora estes embriões não tenham sido transferidos, este estudo comparativo sugere que é possível a produção de um menor número de embriões de melhor qualidade, por conseguinte, dissociando o potencial de desenvolvimento, definido como o número máximo de embriões produzidos, deste conceito de qualidade embrionária.

Num estudo posterior, foi demonstrado que quando se seleciona um subconjunto de blastocistos utilizando uma morfologia definida em um momento fixo pós-fertilização, o impacto das condições de cultivo na expressão de genes é largamente minimizado (Plourde *et al.*, 2012). Isto confirmou que os resultados anteriores estão relacionados com a estrutura da população embrionária. Este estudo também mostrou que a fonte de oócitos, de ovários de matadouros ou de punção folicular após um protocolo de estimulação ovariana, tem um impacto mais profundo sobre a expressão de genes nos blastocistos do que as condições de cultivo (Plourde *et al.*, 2012). Isto, em contraste, apoia a estreita relação que existe entre a qualidade do oócito e qualidade embrionária. Neste estudo, foi também observado que um dos principais efeitos da produção *in vitro* de embriões em todos os tratamentos em comparação com blastocistos produzidos *in vivo* envolve os genes relacionados com as funções mitocondriais (Plourde *et al.*, 2012). Este novamente apoia a teoria de que as mitocôndrias desempenham um papel central, tanto na qualidade do oócito quanto na capacidade de desenvolvimento. Isto está de acordo com a hipótese do embrião “quieto”, onde a análise dos metabólitos do meio de cultivo pode ser associada com a qualidade do embrião (Leese, 2012). Este conceito correlaciona o metabolismo de embriões individuais pré-implantação com a sua viabilidade *a posteriori*, quando um metabolismo baixo em relação à baixa taxa glicolítica e de produção de aminoácidos e sua alta capacidade antioxidante caracterizam os melhores embriões (Leese, 2012). Assim, um embrião saudável terá metabolismo "silencioso" porque gasta menos energia para reparação dos danos ao genoma, transcriptoma e do proteoma, ou tem menos danos em comparação com um embrião não viável (Leese *et al.*, 2007).

Tabela 1. Comparação de dez diferentes sistemas de produção *in vitro* de embriões.

Treatment o no.	Maturação do oócito (IVM)	Cultivo embrionário (IVC)	Produção de blastocistos	Morfologia do blastocisto no dia 7	Distância do transcriptoma à referência	Variância geral entre replicatas
1	*In vivo*	*In vivo*	N/A	N/A	Referência	++
2	SOF-BSA	SOF-BSA	+++	Totalmente expandido	++	+
3	SOF-soro	SOF-BSA	++	Totalmente expandido	++++	++
4	SOF-BSA	SOF-soro	+++	Totalmente expandido	+++	++++
5	SOF-soro	SOF-soro	+++	Totalmente expandido	++	++++
6	SOF-BSA	SOF-BSA *	+	Pequeno e escuro	+	+++
7	SOF	SOF	+	Pequeno e escuro	+++	++
8	SOF-BSA	SOF co-cultivo	+++	Totalmente expandido-eclodindo	++	++
9	TCM-soro	TCM co-cultivo	+++	Totalmente expandido-eclodindo	+	++
10	TCM-soro	SOF-BSA	+++	Expandido mas escuro	++++	++
11	TCM-soro	TCM-soro	+	Pequeno e escuro	+++	+

* Soro foi adicionado nos últimos 2 dias de cultivo de embriões e, portanto, após a ativação do genoma embrionário, na tentativa de determinar se as células embrionárias totalmente ativas poderiam usar este suplemento rico em hormônios. + Apreciação subjetiva da distância da referência e a variância do tratamento. Adaptado de Cote *et al.*, 2011.

Explorando o transcriptoma embrionário: o papel dos RNAs não-codificantes

Durante os levantamentos de transcriptomas, verificou-se que as células embrionárias bovinas expressam um grande contingente de transcritos não caracterizados (Cote *et al.*, 2011; Plourde *et al.*, 2012). A análise das sequências indica que estes transcritos não contém uma fase aberta de leitura (ORF – open-reading frame) que corresponda aos padrões mínimos internacionais de 300 nucleotídeos de tamanho (100 aminoácidos; Dinger *et al.*, 2009) e que são gerados a partir de ambos genomas nuclear e mitocondrial (Cote *et al.*, 2011; Plourde *et al.*, 2012). Estes RNAs não-codificantes longos (lncRNA) constituem a maior classe de RNA não-codificantes. Por definição, eles são mais longos do que 200 nucleotídeos, e não servem como um molde para a síntese de proteínas. Até agora, cerca de 15.000 genes codificando lncRNA foram identificados em humanos (Derrien *et al.*, 2012). Evidências demonstrando que eles têm várias funções biológicas e desempenham papéis críticos no circuito regulador de células tronco embrionárias, começaram a surgir através do modelo murino apenas alguns anos atrás (Guttman *et al.*, 2010; Sheik Mohamed *et al.*, 2010). No entanto, compreender o papel de lncRNA é um desafio e apenas 1% de todos os transcritos humanos não-codificantes têm sido associados a uma função (Perkel, 2013).

Ao se compararem transcriptomas para se identificar a expressão diferencial de genes associados com condições de cultivo, mostrou-se que algumas destas moléculas de lncRNA são altamente sensíveis ao microambiente embrionário (Cote *et al.*, 2011; Plourde *et al.*, 2012). Até agora, os seus papéis não foram caracterizados. Uma vez que os RNAs não codificantes são parte da epigenética, e alguns deles podem regular a expressão gênica (Bouwland-Ambos *et al.*, 2013;. Bhan e Mandal, 2014), previu-se que alguns destes lncRNAs podem ser indicativos de perturbações epigenéticas causadas pelas condições de cultivo (Le Bouc *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2010). Para investigar isto, três lncRNAs candidatos foram caracterizados e surpreendentemente foram encontrados no citoplasma, em vez de no núcleo, e também foram associados com os polirribossomos (Caballero *et al.*, 2014). Além disso, um deles foi encontrado entre os transcritos isolados a partir de TZPs, entre as células do cumulus e o oócito (Caballero *et al.*, 2014). A redução desta transcrição em oócitos maturados inesperadamente acelerou a cinética de desenvolvimento embrionário (Caballero *et al.*, 2014). Sobrepondo-se as análises de transcriptoma e de metiloma de DNA, mostrou-se que esta redução impactou quatro genes (Vírus Coxsackie e Receptores de Adenovírus (*CXADR*), advilina (*AVIL*), molécula CD9, e ativador de plasminogênio uroquinase *(PLAU*)) onde a metilação do DNA e abundância de transcrição seguiram a regra de que o aumento de metilação resulta na redução da expressão gênica e vice-versa. Os dois últimos genes identificados são conhecidos por estarem associados com a morte e a sobrevivência de blastocistos durante o período de pré-implantação, respectivamente (El-Sayed *et al.*, 2006). Os papéis destes lncRNAs na embriogênese inicial ainda não foi elucidado. Assim como as proteínas a partir do RNAm, é possível que lncRNAs estejam envolvidos em numerosos aspectos das funções celulares.

Conclusões

É evidente que ambos os conceitos de competência de desenvolvimento oócitário e qualidade embrionária estão intimamente relacionados, o que é

evidente pela possibilidade de aumentar o número de blastocistos produzidos *in vitro* através da modulação das condições foliculares. Ainda, de maneira inversa, é possível modular as condições de cultivo para aumentar também os de baixa qualidade. Portanto, a taxa de blastocisto pode não ser uma medida suficiente para melhorar a produção *in vitro* de embriões. Como outros têm proposto há mais de uma década, parece claro que um denominador comum entre o potencial de desenvolvimento embrionário e qualidade está associado à presença de mitocôndrias saudáveis (Van Blerkom, 2008, 2009, 2011). Esta é a base da intervenção terapêutica feita para aumentar a fertilidade de oócitos de mulheres em idade avançada (St John, 2012; Tilly e Sinclair, 2013). Apesar de promissor, qualquer desenvolvimento no domínio da produção de embriões ainda necessita da definição de um oócito de boa qualidade e de um embrião de qualidade superior. Dado o impacto do epigenoma e a sensibilidade dos oócitos e embriões iniciais ao seu ambiente, a definição mais ampla de competência para o desenvolvimento deve compreender um todo, quando a meta de produção de embriões é induzir gestação, tendo uma prole saudável como o resultado final.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pelo Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) do Canadá (projeto número SD293184), Fonds de recherche du Québec - Nature et technologies (2014-PR-182922) e também pelo Canadian Institute of Health Research - Institute of Human Development, Child and Youth Health (projeto número CAP-120358).

Referências

Baldoceda-Baldeon LM, Gagne D, Vigneault C, Blondin P, Robert C. 2014. Improvement of bovine in vitro embryo production by vitamin K(2) supplementation. *Reproduction*, 148:489-497.

Batt PA, Miller BG. 1988. Development of sheep embryos in vitro in a medium supplemented with different batches of serum albumin. *Aust J Biol Sci*, 41:371-376.

Bavister BD, Squirrell JM. 2000. Mitochondrial distribution and function in oocytes and early embryos. *Hum Reprod*, 15(suppl. 2):189-198.

Bermejo-Alvarez P, Rizos D, Rath D, Lonergan P, Gutierrez-Adan A. 2010. Sex determines the expression level of one third of the actively expressed genes in bovine blastocysts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107:3394-3399.

Bhan A, Mandal SS. 2014. Long noncoding RNAs: emerging stars in gene regulation, epigenetics and human disease. *Chem Med Chem*, 9:1932-1956.

Bilodeau-Goeseels S. 2006. Effects of culture media and energy sources on the inhibition of nuclear maturation in bovine oocytes. *Theriogenology*, 66:297-306.

Bilodeau-Goeseels S, Sasseville M, Guillemette C, Richard FJ. 2007. Effects of adenosine monophosphate-activated kinase activators on bovine oocyte nuclear maturation in vitro. *Mol Reprod Dev*, 74:1021-1034.

Block J, Wrenzycki C, Niemann H, Herrmann D, Hansen PJ. 2008. Effects of insulin-like growth factor-1 on cellular and molecular characteristics of bovine blastocysts produced in vitro. *Mol Reprod Dev*, 75:895-903.

Blondin P, Sirard MA. 1995. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol Reprod Dev*, 41:54-62.

Blondin P, Guilbault LA, Sirard MA. 1997. The time interval between FSH-P administration and slaughter can influence the developmental competence of beef heifer oocytes. *Theriogenology*, 48:803-813.

Blondin P, Bousquet D, Twagiramungu H, Barnes F, Sirard MA. 2002. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. *Biol Reprod*, 66:38-43.

Bouwland-BothMI, van Mil NH, Stolk L, Eilers PH, Verbiest MM, Heijmans BT, Tiemeier H, Hofman A, Steegers EA, Jaddoe VW, Steegers-Theunissen RP. 2013. DNA methylation of IGF2DMR and H19 is associated with fetal and infant growth: the generation R study. *PLoS One*, 8:e81731

Brison DR, Schultz RM. 1997. Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha. *Biol Reprod*, 56:1088-1096

Caballero J, Gilbert I, Fournier E, Gagne D, Scantland S, Macaulay A, Robert C. 2014. Exploring the function of long non-coding RNA in the development of bovine early embryos. *Reprod Fertil Dev*, 27:40-52.

Carter F, Rings F, Mamo S, Holker M, Kuzmany A, Besenfelder U, Havlicek V, Mehta JP, Tesfaye D, Schellander K, Lonergan P. 2010. Effect of elevated circulating progesterone concentration on bovine blastocyst development and global transcriptome following endoscopic transfer of in vitro produced embryos to the bovine oviduct. *Biol Reprod*, 83:707-719.

Cetica P, Pintos L, Dalvit G, Beconi M. 2002. Activity of key enzymes involved in glucose and triglyceride catabolism during bovine oocyte maturation in vitro. *Reproduction*, 124:675-681.

Chen M, Norman RJ, Heilbronn LK. 2011. Does in vitro fertilisation increase type 2 diabetes and cardiovascular risk? *Curr Diabetes Rev*, 7:426-432.

Chen M, Wu L, Zhao J, Wu F, Davies MJ, Wittert GA, Norman RJ, Robker RL, Heilbronn LK. 2014. Altered glucose metabolism in mouse and humans conceived by IVF. *Diabetes*, 63:3189-3198.

Clemente M, Lopez-Vidriero I, O'Gaora P, Mehta JP, Forde N, Gutierrez-Adan A, Lonergan P, Rizos

D. 2011. Transcriptome changes at the initiation of elongation in the bovine conceptus. *Biol Reprod*, 85:285-295.

Conti M, Andersen CB, Richard F, Mehats C, Chun SY, Horner K, Jin C, Tsafriri A. 2002. Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. *Mol Cell Endocrinol*, 187:153-159.

Correa GA, Rumpf R, Mundim TC, Franco MM, Dode MA. 2008. Oxygen tension during in vitro culture of bovine embryos: effect in production and expression of genes related to oxidative stress. *Anim Reprod Sci*, 104:132-142.

Cote I, Vigneault C, Laflamme I, Laquerre J, Fournier E, Gilbert I, Scantland S, Gagne D, Blondin P, Robert C. 2011. Comprehensive cross production system assessment of the impact of in vitro microenvironment on the expression of messengers and long non-coding RNAs in the bovine blastocyst. *Reproduction*, 142:99-112.

Deng W, Lin H. 1997. Spectrosomes and fusomes anchor mitotic spindles during asymmetric germ cell divisions and facilitate the formation of a polarized microtubule array for oocyte specification in Drosophila. *Dev Biol*, 189:79-94.

Denomme MM, Mann MR. 2012. Genomic imprints as a model for the analysis of epigenetic stability during assisted reproductive technologies. *Reproduction*, 144:393-409.

Denomme MM, Mann MR. 2013. Maternal control of genomic imprint maintenance. *Reprod Biomed Online*, 27:629-636.

Derrien T, Johnson R, Bussotti G, Tanzer A, Djebali S, Tilgner H, Guernec G, Martin D, Merkel A, Knowles DG, Lagarde J, Veeravalli L, Ruan X, Ruan Y, Lassmann T, Carninci P, Brown JB, Lipovich L, Gonzalez JM, Thomas M, Davis CA, Shiekhattar R, Gingeras TR, Hubbard TJ, Notredame C, Harrow J, Guigo R. 2012. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res*, 22:1775-1789.

Dinger ME, Pang KC, Mercer TR, Crowe ML, Grimmond SM, Mattick JS. 2009. NRED: a database of long noncoding RNA expression. *Nucleic Acids Res*, 37(database issue):D122-126.

Driver AM, Penagaricano F, Huang W, Ahmad KR, Hackbart KS, Wiltbank MC, Khatib H. 2012. RNA-Seq analysis uncovers transcriptomic variations between morphologically similar *in vivo*- and in vitro-derived bovine blastocysts. *BMC Genomics*, 13:118.

Duranthon V, Renard JP. 2001. The developmental competence of mammalian oocytes: a convenient but biologically fuzzy concept. *Theriogenology*, 55:1277-1289.

El-Sayed A, Hoelker M, Rings F, Salilew D, Jennen D, Tholen E, Sirard MA, Schellander K, Tesfaye D. 2006. Large-scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. *Physiol Genomics*, 28:84-96.

Fair T, Hyttel P, Greve T. 1995. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol Reprod Dev*, 42:437-442.

Fair T. 2010. Mammalian oocyte development: checkpoints for competence. *Reprod Fertil Dev*, 22:13-20.

Feng WG, Sui HS, Han ZB, Chang ZL, Zhou P, Liu DJ, Bao S, Tan JH. 2007. Effects of follicular atresia and size on the developmental competence of bovine oocytes: a study using the well-in-drop culture system. *Theriogenology*, 67:1339-1350.

Gad A, Hoelker M, Besenfelder U, Havlicek V, Cinar U, Rings F, Held E, Dufort I, Sirard MA, Schellander K, Tesfaye D. 2012. Molecular mechanisms and pathways involved in bovine embryonic genome activation and their regulation by alternative *in vivo* and in vitro culture conditions. *Biol Reprod*, 87:100.

Gilchrist RB. 2011. Recent insights into oocyte-follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to in vitro maturation. *Reprod Fertil Dev*, 23:23-31.

Guttman M, Garber M, Levin JZ, Donaghey J, Robinson J, Adiconis X, Fan L, Koziol MJ, Gnirke A, Nusbaum C, Rinn JL, Lander ES, Regev A. 2010. Ab initio reconstruction of cell type-specific transcriptomes in mouse reveals the conserved multi-exonic structure of lincRNAs. *Nat Biotechnol*, 28:503-510.

Harper KM, Brackett BG. 1993a. Bovine blastocyst development after follicle-stimulating hormone and platelet-derived growth factor treatment for oocyte maturation in vitro. *Zygote*, 1:27-34.

Harper KM, Brackett BG. 1993b. Bovine blastocyst development after in vitro maturation in a defined medium with epidermal growth factor and low concentrations of gonadotropins. *Biol Reprod*, 48:409-416.

Hart R, Norman RJ. 2013a. The longer-term health outcomes for children born as a result of IVF treatment: Part I-General health outcomes. *Hum Reprod Update*, 19:232-243.

Hart R, Norman RJ. 2013b. The longer-term health outcomes for children born as a result of IVF treatment. Part II-Mental health and development outcomes. *Hum Reprod Update* 19:244-250.

Holm P, Booth PJ, Callesen H. 2002. Kinetics of early in vitro development of bovine *in vivo*- and in vitro-derived zygotes produced and/or cultured in chemically defined or serum-containing media. *Reproduction*, 123:553-565.

Houghton FD, Barr KJ, Walter G, Gabriel HD, Grummer R, Traub O, Leese HJ, Winterhager E, Kidder GM. 2002. Functional significance of gap junctional coupling in preimplantation development. *Biol Reprod*, 66:1403-1412.

Jacob S, Moley KH. 2005. Gametes and embryo epigenetic reprogramming affect developmental outcome: implication for assisted reproductive

technologies. *Pediatr Res*, 58:437-446.

Kane MT. 1983. Variability in different lots of commercial bovine serum albumin affects cell multiplication and hatching of rabbit blastocysts in culture. *J Reprod Fertil*, 69:555-558.

Keefe D, Kumar M, Kalmbach K. 2015. Oocyte competency is the key to embryo potential. *Fertil Steril*, 103:317-322.

Khalil WA, Marei WF, Khalid M. 2013. Protective effects of antioxidants on linoleic acid-treated bovine oocytes during maturation and subsequent embryo development. *Theriogenology*, 80:161-168.

Khurana NK, Niemann H. 2000. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or *in vivo*. *Biol Reprod*, 62:847-856.

Kimura K, Spate LD, Green MP, Roberts RM. 2005. Effects of D-glucose concentration, D-fructose, and inhibitors of enzymes of the pentose phosphate pathway on the development and sex ratio of bovine blastocysts. *Mol Reprod Dev*, 72:201-207.

Kimura K, Iwata H, Thompson JG. 2008. The effect of glucosamine concentration on the development and sex ratio of bovine embryos. *Anim Reprod Sci*, 103:228-238.

Kolle S, Stojkovic M, Boie G, Wolf E, Sinowatz F. 2002. Growth hormone inhibits apoptosis in in vitro produced bovine embryos. *Mol Reprod Dev*, 61:180-186.

Krisher RL, Lane M, Bavister BD. 1999. Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi-defined and defined culture media. *Biol Reprod*, 60:1345-1352.

Lambrot R, Xu C, Saint-Phar S, Chountalos G, Cohen T, Paquet M, Suderman M, Hallett M, Kimmins S. 2013. Low paternal dietary folate alters the mouse sperm epigenome and is associated with negative pregnancy outcomes. *Nat Commun*, 4:2889.

Le Bouc Y, Rossignol S, Azzi S, Brioude F, Cabrol S, Gicquel C, Netchine I. 2010. [Epigenetics, genomic imprinting and developmental disorders]. *Bull Acad Natl Med*, 194:287-297; Discussion, 297-300.

Lee S, Gilula NB, Warner AE. 1987. Gap junctional communication and compaction during preimplantation stages of mouse development. *Cell*, 51:851-860.

Leese HJ, Sturmey RG, Baumann CG, McEvoy TG. 2007. Embryo viability and metabolism: obeying the quiet rules. *Hum Reprod*, 22:3047-3050.

Leese HJ. 2012. Metabolism of the preimplantation embryo: 40 years on. *Reproduction*, 143:417-427.

Lequarre AS, Vigneron C, Ribaucour F, Holm P, Donnay I, Dalbies-Tran R, Callesen H, Mermillod P. 2005. Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. *Theriogenology*, 63:841-859.

Livingston T, Eberhardt D, Edwards JL, Godkin J. 2004. Retinol improves bovine embryonic development in vitro. *Reprod Biol Endocrinol*, 2:83.

Lodde V, Modina S, Maddox-Hyttel P, Franciosi F, Lauria A, Luciano AM. 2008. Oocyte morphology and transcriptional silencing in relation to chromatin remodeling during the final phases of bovine oocyte growth. *Mol Reprod Dev*, 75:915-924.

Lonergan P, Carolan C, Van Langendonckt A, Donnay I, Khatir H, Mermillod P. 1996. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development in vitro. *Biol Reprod*, 54:1420-1429.

Macaulay AD, Gilbert I, Caballero J, Barreto R, Fournier E, Tossou P, Sirard MA, Clarke HJ, Khandjian EW, Richard FJ, Hyttel P, Robert C. 2014. The gametic synapse: RNA transfer to the bovine oocyte. *Biol Reprod*, 91:90.

McEvoy TG, Sinclair KD, Young LE, Wilmut I, Robinson JJ. 2000. Large offspring syndrome and other consequences of ruminant embryo culture in vitro: relevance to blastocyst culture in human ART. *Hum Fertil (Camb)*, 3:238-246.

Motlik J, Crozet N, Fulka J. 1984. Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles. *J Reprod Fertil*, 72:323-328.

Moussa M, Shu J, Zhang XH, Zeng F. 2015. Maternal control of oocyte quality in cattle: a review. *Anim Reprod Sci*, 155:11-27.

Nagano M, Katagiri S, Takahashi Y. 2006. ATP content and maturational/developmental ability of bovine oocytes with various cytoplasmic morphologies. *Zygote*, 14:299-304.

Niv*et al.*, Bunel A, Labrecque R, Belanger J, Vigneault C, Blondin P, Sirard MA. 2012. FSH withdrawal improves developmental competence of oocytes in the bovine model. *Reproduction*, 143:165-171.

Olson SE, Seidel GE Jr. 2000. Reduced oxygen tension and EDTA improve bovine zygote development in a chemically defined medium. *J Anim Sci*, 78:152-157.

Ostermeier GC, Miller D, Huntriss JD, Diamond MP, Krawetz SA. 2004. Reproductive biology: delivering spermatozoan RNA to the oocyte. *Nature*, 429(6988):154.

Perkel JM. 2013. Visiting "noncodarnia". *Biotechniques*, 54:301, 303-304.

Plourde D, Vigneault C, Lemay A, Breton L, Gagne D, Laflamme I, Blondin P, Robert C. 2012. Contribution of oocyte source and culture conditions to phenotypic and transcriptomic variation in commercially produced bovine blastocysts. *Theriogenology*, 78:116-131.e1-3.

Quinn P, Harlow GM. 1978. The effect of oxygen on the development of preimplantation mouse embryos in vitro. *J Exp Zool*, 206:73-80.

Quirk SM, Hickey GJ, Fortune JE. 1986. Growth and regression of ovarian follicles during the follicular phase of the oestrous cycle in heifers undergoing spontaneous and PGF-2 alpha-induced luteolysis. *J Reprod Fertil*, 77:211-219.

Rizos D, Lonergan P, Boland MP, Arroyo-Garcia R, Pintado B, de la Fuente J, Gutierrez-Adan A. 2002.

Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. *Biol Reprod*, 66:589-595.

Rizos D, Gutierrez-Adan A, Perez-Garnelo S, de la Fuente J, Boland MP, Lonergan P. 2003. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol Reprod*, 68:236-243.

Rizos D, Clemente M, Bermejo-Alvarez P, de la Fuente J, Lonergan P, Gutierrez-Adan A. 2008. Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and quality. *Reprod Domest Anim*, 43(suppl. 4):44-50.

Robert C. 2010. Microarray analysis of gene expression during early development: a cautionary overview. *Reproduction*, 140:787-801

Robert C, Nieminen J, Dufort I, Gagne D, Grant JR, Cagnone G, Plourde D, Niv*et al.*, Fournier E, Paquet E, Blazejczyk M, Rigault P, Juge N, Sirard MA. 2011. Combining resources to obtain a comprehensive survey of the bovine embryo transcriptome through deep sequencing and microarrays. *Mol Reprod Dev*, 78:651-664.

Rorie RW, Miller GF, Nasti KB, McNew RW. 1994. In vitro development of bovine embryos as affected by different lots of bovine serum albumin and citrate. *Theriogenology*, 42:397-403.

Santos F, Hyslop L, Stojkovic P, Leary C, Murdoch A, Reik W, Stojkovic M, Herbert M, Dean W. 2010. Evaluation of epigenetic marks in human embryos derived from IVF and ICSI. *Hum Reprod*, 25:2387-2395.

Santos TA, El Shourbagy S, St John JC. 2006. Mitochondrial content reflects oocyte variability and fertilization outcome. *Fertil Steril*, 85:584-591.

Saunders CM, Larman MG, Parrington J, Cox LJ, Royse J, Blayney LM, Swann K, Lai FA. 2002. PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca(2+) oscillations in eggs and embryo development. *Development*, 129:3533-3544.

Scantland S, Grenon JP, Desrochers MH, Sirard MA, Khandjian EW, Robert C. 2011. Method to isolate polyribosomal mRNA from scarce samples such as mammalian oocytes and early embryos. *BMC Dev Biol*, 11:8.

Scantland S, Tessaro I, Macabelli CH, Macaulay AD, Cagnone G, Fournier E, Luciano AM, Robert C. 2014. The adenosine salvage pathway as an alternative to mitochondrial production of ATP in maturing mammalian oocytes. *Biol Reprod*, 91:75.

Sheik Mohamed J, Gaughwin PM, Lim B, Robson P, Lipovich L. 2010. Conserved long noncoding RNAs transcriptionally regulated by Oct4 and Nanog modulate pluripotency in mouse embryonic stem cells. *RNA*, 16:324-337.

Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C. 2006. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*, 65:126-136.

St John JC. 2012. Transmission, inheritance and replication of mitochondrial DNA in mammals: implications for reproductive processes and infertility. *Cell Tissue Res*, 349:795-808.

Sternlicht AL, Schultz RM. 1981. Biochemical studies of mammalian oogenesis: kinetics of accumulation of total and poly(A)-containing RNA during growth of the mouse oocyte. *J Exp Zool*, 215:191-200.

Stojkovic M, Machado SA, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Goncalves PB, Wolf E. 2001. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biol Reprod*, 64:904-909.

Sutton-McDowall ML, Gilchrist RB, Thompson JG. 2010. The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. *Reproduction*, 139:685-695.

Taverne MA, Breukelman SP, Perenyi Z, Dieleman SJ, Vosa PL, Jonker HH, de Ruigh L, Van Wagtendonk-de Leeuw JM, Beckers JF. 2002. The monitoring of bovine pregnancies derived from transfer of in vitro produced embryos. *Reprod Nutr Dev*, 42:613-624.

Thompson JG, Partridge RJ, Houghton FD, Cox CI, Leese HJ. 1996. Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos. *J Reprod Fertil*, 106:299-306.

Tilly JL, Sinclair DA. 2013. Germline energetics, aging, and female infertility. *Cell Metab*, 17:838-850.

Van Blerkom J. 2008. Mitochondria as regulatory forces in oocytes, preimplantation embryos and stem cells. *Reprod Biomed Online*, 16:553-569.

Van Blerkom J. 2009. Mitochondria in early mammalian development. *Semin Cell Dev Biol*, 20:354-364.

Van Blerkom J. 2011. Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence. *Mitochondrion*, 11:797-813.

Van Soom A, Boerjan ML, Bols PE, Vanroose G, Lein A, Coryn M, de Kruif A. 1997a. Timing of compaction and inner cell allocation in bovine embryos produced *in vivo* after superovulation. *Biol Reprod*, 57:1041-1049.

Van Soom A, Ysebaert MT, de Kruif A. 1997b. Relationship between timing of development, morula morphology, and cell allocation to inner cell mass and trophectoderm in in vitro-produced bovine embryos. *Mol Reprod Dev*, 47:47-56.

Wang Z, Fu C, Yu S. 2013. Green tea polyphenols added to IVM and IVC media affect transcript abundance, apoptosis, and pregnancy rates in bovine embryos. *Theriogenology*, 79:186-192.

Wilding M, Coppola G, Dale B, Di Matteo L. 2009. Mitochondria and human preimplantation embryo development. *Reproduction*, 137:619-624.

Wilding M. 2015. Potential long-term risks associated

with maternal aging (the role of the mitochondria). *Fertil Steril*, 103:1397-1401.

Wolke U, Jezuit EA, Priess JR. 2007. Actin-dependent cytoplasmic streaming in C. elegans oogenesis. *Development*, 134:2227-2236.

Wrenzycki C, Herrmann D, Niemann H. 2007. .

Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. *Theriogenology*, 68(suppl. 1):S77-83.

Young LE, Sinclair KD, Wilmut I. 1998. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev Reprod*, 3:155-163

Metabolismo do oócito e do embrião pré-implantação

M.L. Sutton-McDowall[1], J.G. Thompson

Australian Research Council Centre of Excellence for Nanoscale BioPhotonics (CNBP), Robinson Research Institute, School of Paediatrics and Reproductive Health and Institute for Photonics and Advanced Sensing, The University of Adelaide, Medical School, Adelaide, SA, Australia.

Resumo

A compreensão do metabolismo do oócito e do embrião é fundamental para o desenvolvimento de novos sistemas de cultivo *in vitro*. Nos últimos 60-70 anos, ocorreu uma constante evolução na forma em que os estudos de metabolismo têm sido conduzidos. Isto inclui uma mudança no estudo do metabolismo do oócito, que passou a avaliar o metabolismo do complexo *cumulus* oócito, e não mais do oócito isoladamente. Estudos do ambiente *in vivo* levaram ao desenvolvimento de sistemas de cultivo sequenciais e definidos, que permitiram ultrapassar o bloqueio de embrionário e, melhoraram o desenvolvimento do embrião. As técnicas para o estudo do metabolismo evoluíram desde o uso de isótopos radiomarcados até sondas fluorescentes cada vez mais específicas que juntamente com a metabolômica permitem o estabelecimento de perfis integrados. O metabolismo pode ser utilizado como potencial diagnóstico para selecionar os embriões com maior probabilidade de implantação. Prevemos que o futuro do metabolismo vai envolver a capacidade de medir 'mais-em-menos' (mais substratos, menos volumes), permitindo a abordagem de diversos componentes simultaneamente para a compreensão da relação entre o metabolismo e a competência para o desenvolvimento, pois é inconcebível que um único produto metabólico seja a capaz de avaliar a saúde e/ou qualidade do oócito ou embrião.

Palavras chave: embrião, produção *in vitro* de embriões, metabolismo, oócito.

Introdução

Há cinquenta anos, Robert Edwards descobriu que a liberação mecânica de um oócito a partir dos folículos antrais ovarianos poderia iniciar os estágios finais de maturação do oócito (Edwards, 1965). Desde então, a maturação *in vitro* de oócitos (MIV), a fecundação *in vitro* (FIV) e o cultivo de embriões pós-fecundação (cultivo *in vitro* de embriões, CIV), coletivamente conhecidos como produção *in vitro* de embriões (PIV), tem sido amplamente utilizados para o estudo de oócitos e do desenvolvimento embrionário pré-implantação, além de estarem sendo cada vez mais utilizados na produção animal e na reprodução humana assistida.

Uma correta compreensão do metabolismo do complexo *cumulus*-oócito (COC) e dos embriões é crítica não só para permitir a criação de melhores sistemas de cultivo, resultando no desenvolvimento de embriões PIV mais saudáveis, mas também como um marcador potencial do da competência para desenvolvimento, determinando quais os embriões são os mais saudáveis e, que têm maiores chances de resultar em uma gestação normal.

Existem inúmeros artigos de revisão, que abordam o metabolismo do COC (Sutton *et al.*, 2003b; Thompson *et al.*, 2007, 2014; Sutton-McDowall *et al.*, 2010; Krisher, 2013) e do embrião (Bavister, 1995; Thompson, 2000; Leese *et al.*, 2008; Leese, 2012). Com isto em mente, o foco desta revisão é apresentar um breve resumo das mudanças no metabolismo que ocorrem durante o desenvolvimento pré-implantacional, das limitações dos diagnósticos metabólicos utilizados atualmente, e das possíveis direções futuras para determinar o metabolismo de COCs e de embriões pré-implantação. Apesar de reconheçermos que o COC e o embrião utilizam diversas fontes de energia, tais como lipídios (Sturmey *et al.*, 2009; Dunning *et al.*, 2014) e aminoácidos (Wale e Gardner, 2012), esta revisão focará sobre o metabolismo de carboidratos e moléculas de sinalização resultantes.

Metabolismo: *timing* (e estágio) é tudo

O período peri-concepção, que abrange as fases finais de maturação do oócito até o desenvolvimento embrionário pré-implantação, é um período altamente dinâmico, com o COC e o embrião expostos a diversos microambientes diferentes, que vão desde o altamente vascular e perfundido do folículo ovariano, até os de baixos níveis de oxigênio (Tervit *et al.*, 1972; Maas *et al.*, 1976; Fischer and Bavister, 1993), no ambiente uterino repleto de muco. Está bem estabelecido que o metabolismo do COC e do embrião pré-implantação varia (Fig. 1) e este é, em grande parte, reflexo do ambiente *in vivo* (Krisher, 2013).

Em uma tentativa de melhorar o sucesso da PIV, sistemas de cultivo têm sido formulados com base na composição do ambiente *in vivo* do trato reprodutivo da fêmea (revisado por Summers e Biggers, 2003; Sutton *et al.*, 2003a; Tabela 1), resultando em taxas significativamente mais elevadas de desenvolvimento e gestação. |Em um trabalho pioneiro, Tervit e colaboradores (1976) usaram a composição do fluido tubário de ovelhas

Autor correspondente: melanie.mcdowall@adelaide.edu.au

(caracterizado por Restall e Wales, 1966) para criar o Fluido de Oviduto Sintético (SOF), realizando cultivos em baixas concentrações de oxigênio (Tervit *et al*., 1972). Este sistema com várias versões modificadas, ainda é amplamente utilizado, na PIV de grandes animais (Gandhi *et al*.,2000).

No entanto, devido à natureza estática, mas quimicamente definida dos sistemas de cultivo, em contraste ao ambiente *in vivo* altamente perfundidos e complexos, os meios ainda podem ser melhorados. Consequentemente, as composições dos meios de PIV estão em constante evolução. Até a presente data, os meios mais bem sucedidos incluem meios sequenciais, que tentam atender as mudanças nas necessidades metabólicas (Summers e Biggers, 2003; Lane e Gardner, 2007), embora este ainda seja um desafio para FIV humana, em que os sistemas de um único meio são os mais utilizados (Cohen *et al*., 2008; Paternot *et al*, 2010).

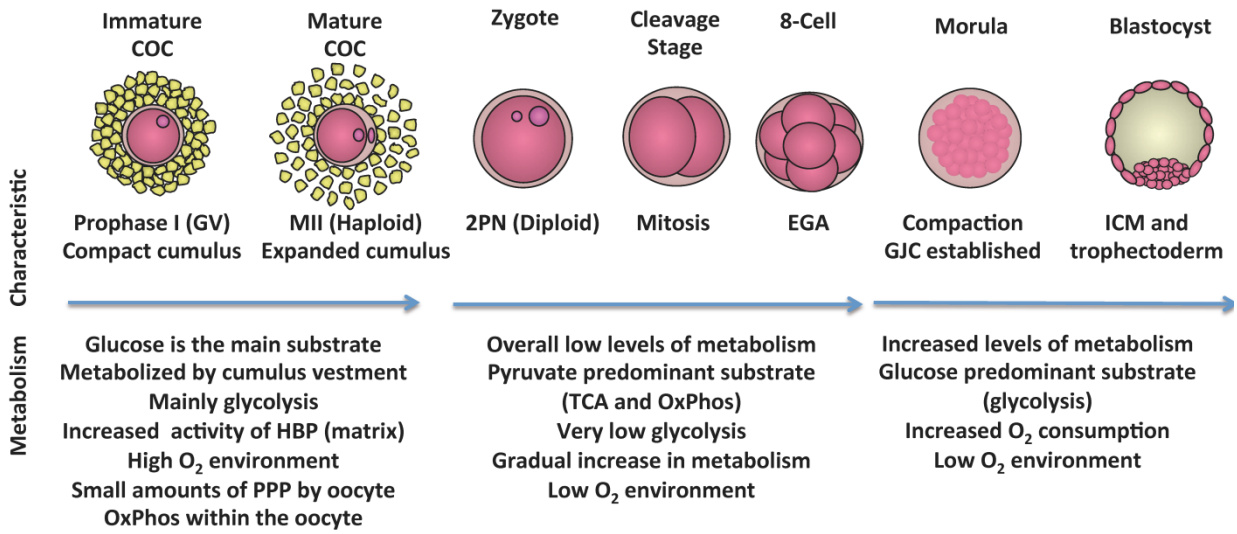

Figura 1. Alterações no metabolismo dos complexos *cumulus*-oócitos (COCs) e embriões pré-implantação. 2PN = 2 pró-núcleos; GJC = junções gap; GV = vesícula germinativa; HBP = via de hexosaminas biossintéticas; ICM=massa celular interna; OxPhos = fosforilação oxidativa e TCA cycle = ciclo do ácido tricarboxilico.

Tabela 1. Composição de carboidratos dos ambientes *in vivo vs. in vitro* aos quais os complexos *cúmulos*-oócitos (COCs) e embriões são expostos.

	COC		Fecundação		Embriões		
	In vivo	*In vitro*	*In vivo* (Tuba)	*In vitro*	*In vivo* (Útero)	*In vitro* (Clivagem)	*In vitro* (Pós-Compactação)
Glicose (mM)	1,4-2,3[1] 2-3,8 [2]	1,5 (SOFM) 5,6 (M199)	2,4-3[3] 0,5-3,11[4]	2,8 (HTF) 0 (Fert TALP)	0,5[5] 0,02-0,04[6] 3,15 [4]	1,5 (SOFC1) 0,5 (G1,2)	3 (SOFC2) 3,2 (G2,2)
Lactato (mM)	3-6,4[1] 5-14,4[2]		2,5[7] 4,9-10,5[4]	21,4 (HTF) 10 (Fert TALP)	8,6[5] 5,9[4]	10,5 (G1,2)	5,9 (G2,2)
Piruvato (mM)	0,4 [1]	0,33 (SOFM) 0,2 (M199)	0,2[7] 0,24[4]	0,33 (SOFM) 0,3 (HTF) 0,2 (Fert TALP)	0,17[5] 0,1[4]	0,33 (SOFC1) 0,32 (G1,2)	0,33 (SOFC1) 0,1 (G2,2)

SOF = Fluido de oviduto Sintético; HTF = Fluido Tubário Humano (Quinn et al., 1985); Fert TALP = Meio Modificado de Tyrode (Gardner et al., 2004); G1.2/G2.2 (Lane et al., 2003). [1]Sutton-McDowall et al., 2005; [2]Leroy et al., 2004; [3]Lippes et al., 1972; [4]Gardner et al., 1996; [5]Dickens et al., 1995; [6]Carlson et al., 1970 and [7]Lopata et al., 1976.

Pre-ovulação: complexo cumulus oócito

O metabolismo de carboidratos no oócito tem sido descrito por diversos autores (Biggers *et al*., 1967; Rieger and Loskutoff, 1994; Bavister, 1995; Krisher and Bavister, 1999; Spindler *et al*., 2000). No entanto, na última década, foi relatada a importância das células do *cumulus*, para suprir o oócito com nutrientes e substratos, para que este possa adquirir a competência (Dumesic *et al*., 2015), mas isso só ocorreu com o maior entendimento da comunicação bidirecional entre o oócito e o *cumulus* (Eppig, 1991;

Albertini *et al.*, 2001; Matzuk *et al.*, 2002).

Desta forma, em nossa opinião, a caracterização do perfil metabólico do COC como um todo é essencial. No entanto, o COC contém dois tipos de células distintas, com diferentes perfis metabólicos: o oócito, que sofre predominantemente fosforilação oxidativa e o *cumulus*, que tem elevada taxa de atividade glicolítica (Thompson *et al*., 2007). O substrato principal do COC é a glicose, a qual é metabolizada por numerosas vias, fornecendo energia e substratos para a formação da matriz extracelular e mucificação do *cumulus*, síntese de ácido nucleico, além de desempenhar um papel importante como molécula de detecção de estresse/combustível (revisado por Sutton-McDowall *et al.*, 2010). Com a progressão da maturação do COC, o metabolismo aumenta de forma constante, sendo observados aumentos nos níveis de glicose, piruvato e consumo de oxigênio (Sutton *et al*., 2003a).

O ambiente no qual o COC é exposto durante a maturação, tanto *in vivo* como *in vitro*, tem grande impacto na sua competência para o desenvolvimento (Sutton *et al*., 2003c; Krisher, 2013; Dumesic *et al.*, 2015). Por exemplo, a hiperglicemia e a hiperlipidemia maternas, comprometem a saúde do COC, o desenvolvimento embrionário e os resultados da gestação (Chang *et al.*, 2005; Leroy *et al.*, 2008; Robker, 2008; Purcell and Moley, 2011; Van Hoeck *et al.*, 2011). Até a presente data, ainda não está disponível uma tecnologia para medir o metabolismo de oócitos e COCs dentro do folículo. Atualmente, as mensurações são realizadas *ex vivo*, e geralmente, com um grau de manipulação adicional *in vitro*. Isso inclui a remoção física do oócito a partir do folículo, às vezes combinada com hiperestimulação da fêmea, para recuperar um número adequado de COCs, além da exposição dos mesmos aos meios de cultivo. Isso levanta a questão de qual seria a influência da exposição dos COCs, mesmo que breve, às condições *in vitro*, sobre o metabolismo dos COCS *in vivo*. Nós temos relatado que até mesmo uma breve exposição (1 h) dos COCs imaturos de camundongo aos meios de "coleta", contendo diferentes concentrações de glicose, podem gerar um efeito dramático sobre o desenvolvimento do embrião pós-fecundação (Frank *et al*., 2013).

Na última década, as melhoras na PIV, têm sido amplamente atribuídas às melhorias do sistema de MIV, criando ambientes que mimetizam as condições *in vivo*. Sistemas mais parecidos com os *in vivo* fornecem indicações de quais os parâmetros metabólicos estão associados com as melhoras na competência para o desenvolvimento. Estes por sua vez, estão surgindo de estudos com suplementos nos meios que melhoram o desenvolvimento do COC. Um exemplo disso é a adição fatores secretados pelo ovócito (OSF), especificamente a proteína morfogenica óssea recombinada 15 (BMP 15) e fator diferenciador de crescimento 9 (GDF 9), resultando no aumento da competência (Gilchrist and Thompson, 2007). Enquanto os OSFs promovem fenótipos distintos como a mucificação, proliferação (Buccione *et al.*, 1990; Salustri *et al.*, 1990a, b); esteroidogênese (Vanderhyden and Macdonald, 1998) e a prevenção de apoptose das células do *cumulus* (Hussein *et al.*, 2005), os OSFs também promovem o metabolismo das células do *cumulus*. Isso, porque tanto a glicólise quanto a biossíntese *de novo* do colesterol estão comprometidas em COC que foram oocitomizados (OOX , um COC em que o oócito é removido cirurgicamente), e a atividade destas vias pode ser restaurada com a adição de OSFs exógenos (Sugiura e Eppig , 2005).

A natureza complexa do metabolismo do COC associado com o aumento da competência para o desenvolvimento foi demonstrada através da análise do impacto da suplementação de BMP15 e FSH *in vitro*. Na ausência de FSH, os COCs bovinos tratados apenas com BMP15 consumem menos glicose e produzem menos lactato em comparação com os tratados apenas com o FSH. Naquele grupo ocorre uma menor expansão do *cumulus* comparada com as condições de MIV padrões, que utilizam o FSH. No entanto, ambos os grupos têm taxas semelhantes de atividade glicolítica (Sutton-McDowall *et al*., 2012). O tratamento com BMP15 promoveu no oócito a fosforilação oxidativa e a atividade do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) (FAD e NAD(P)H, respectivamente) e como consequência, foram detectadas níveis mais elevados de antioxidante glutationa reduzida (GSH) e de espécies reativas de oxigênio (ROS, H_2O_2; Sutton-McDowall *et al.*, 2012, 2015; Sudiman *et al.*, 2014). Em comparação, o FSH estimulou o consumo de glicose pelas células do *cumulus*, com o aumento dos níveis de glicose utilizados pela via biossintética hexosamina para a expansão do *cumulus* no final da MIV (Sutton-Mcdowall *et al.*, 2005). Estes dois tratamentos independentes melhoraram significativamente competência para o desenvolvimento. Assim, BMP15 e FSH agem por vias metabólicas distintas em diferentes compartimentos do COC. Quando combinados o FSH e o BMP15, estimulam um equilíbrio metabólico (Sutton-McDowall *et al.*, 2012, 2015), no qual o efeito metabólico individual é "mascarado". Este tratamento combinado apresentou elevado desenvolvimento embrionário (blastocisto).

Metabolismo pré e pós-compactação

O primeiro estágio da transição oócito-embrião é a ativação do oócito após a fecundação. Isto inclui a reação dos grânulos corticais e endurecimento da zona pelúcida para impedir a polispermia, a retomada da meiose, a formação e singamia pro nuclear. Estes eventos são iniciados pela liberação citoplasmática de pequenos íons de

sinalização, tais como cálcio e zinco (Wang e Machaty, 2013; Que *et al.*, 2014), e o mínimo de transcrição gênica e demanda energética. Os zigotos e embriões no estágio de clivagem dependem da oxidação de ácidos carboxílicos, tais como lactato e piruvato através do ciclo do TCA e fosforilação oxidativa dentro das mitocôndrias, com atividade glicolítica mínima já que a demanda por ATP é baixa (Fig 1;. Thompson, 2000). Na pós-compactação de embriões no estágio de mórula e blastocisto, o metabolismo global aumenta, com a glicólise se tornando a fonte predominante de ATP, um padrão observado em embriões de camundongos (Houghton *et al.*, 1996), vacas (Thompson *et al.*, 1996), porcas (Swain *et al.*, 2001;. Sturmey e Leese, 2003) e mulheres (Gott *et al.*, 1990). Além disso, o consumo de oxigênio, o ciclo do TCA e fosforilação oxidativa também aumentam (Thompson, 2000).

O desenvolvimento de sistemas de cultivo de embrião foi impulsionado pela incapacidade de superar o bloqueio específico do ciclo celular induzido por um ambiente de cultivo inadequado. O desenvolvimento inicial na presença de níveis elevados de glicose e substratos provocam no metabolismo um efeito semelhante ao *Crabtree* (aumento da atividade glicolítica e depressão da fosforilação oxidativa). Tais condições induzem o bloqueio no desenvolvimento que coincide com a ativação do genoma embrionário, denominado de bloqueio de duas células no camundongo (Lawitts e Biggers, 1991) e de 8 células em ruminantes (Thompson *et al.*, 1992; Gardner *et al.*, 1997; Summers and Biggers, 2003). Como mencionado previamente, o desenvolvimento de sistemas de cultivo sequenciais, adaptado para refletir as necessidades metabólicas dos COCs e embriões (isto é, reduzir as concentrações de substrato durante o período de pré-compactação), tem apresentado melhorias significativas nos resultados de desenvolvimento de embriões de PIV, superando o bloqueio do desenvolvimento.

Como mensurar o metabolismo

O metabolismo pode ser mensurado de duas maneiras: a) medição direta de metabólitos (incluindo proteínas associadas, genes ou moléculas de sinalização dentro do COC), de embriões, ou b) amostragem do ambiente circundante, tais como fluidos *in vivo* ou do meio de cultivo. A amostragem do ambiente *in vivo* tem sido fundamental na formulação de sistemas de cultivo com base nos perfis metabólicos de COCs e embriões e tem resultado em melhor desenvolvimento embrionário (Summers e Biggers, 2003).

Mensurações diretas no COC, oócito e embrião

PCR (RNAm), Western blots (níveis de proteína e modificações pós-traducionais), ensaios enzimáticos diretos e imunohistoquímica (localização) têm sido utilizados para estudar a presença e as atividades relativas das enzimas metabólicas essenciais e seus alvos. No entanto, a maioria dos estudos iniciais de metabolismo foi realizada utilizando substratos radiomarcados. O método *Hanging Drop* envolve o cultivo de oócitos ou embriões em ~ 3 ul de meio contendo substratos “frios” e quentes” (marcados com radioisótopos). A gota é suspensa na tampa de um tubo de centrífuga (ou recipiente semelhante) contendo uma solução de hidróxido de sódio ou bicarbonato de sódio (este último exige CO_2 gaseificado), o qual atua como um isótopo "armadilha", e fornece a umidificação da câmara (O ' Fallon e Wright, 1986). Dependendo de qual carbono/ hidrogênio foi marcado, a produção de CO_2 ou H_2O marcadas indicam a proporção do substrato metabolizado em vias específicas. Por exemplo, a produção de $^{14}CO_2$ medida a partir da atividade da glicose [1-^{14}C] mensura a atividade da via das pentoses fosfato (PPP) e ciclo do TCA. Do mesmo modo, a produção de $^{3}H_2O$ a partir de glicose [5-^{3}H] é indicativa de atividade glicolítica. Um esquema síntese do metabolismo da glicose marcada por isótopos está disponível em Downs e Utecht (1999).

Amplamente utilizado na década de 1980-1990 (O'Fallon e Wright, 1986; Rieger e Guay, 1988; Downs e Utecht, 1999), o método *Hanging Drop* apresenta como vantagens o uso de produtos radiomarcados que amplificam o sinal metabólico, resultando em alta sensibilidade e capacidade para medir a atividade das vias metabólicas nos oócitos e embriões individualmente (Bavister, 1987). Classificado como método não invasivo, a transferência de embriões pode ser realizada ao final do ensaio (O'Fallon e Wright, 1986). No entanto, não pode ser usado em conjunto com transferência de embriões em humanos, devido à utilização de substratos marcados radioativamente. Além disso, vários de kits que permitem que as concentrações absolutas dos substratos sejam determinadas estão disponíveis no mercado. Exemplos de kits comercialmente disponíveis incluem kits ADP / ATP (Sutton-McDowall *et al.*, 2012; Zeng *et al.*, 2013; Richani *et al.*, 2014) ou analisadores clínicos para piruvato, lactato e glicose.

A influência do metabolismo no desenvolvimento pode ser estudada usando inibidores e/ou estimuladores de enzimas específicas das vias metabólicas. Os oócitos e embriões são cultivados na presença dos antagonistas / agonistas e assim, os resultados da maturação nuclear e do desenvolvimento embrionário são, avaliados (Downs, 1997; Downs and Mastropolo, 1997; Downs *et al.*, 1998; Downs and Utecht, 1999; Sutton-McDowall *et al.*, 2006). Em combinação com outras mensurações do metabolismo, tais como volume de substrato, a

utilização de antagonistas e agonistas continua a ser altamente valiosa para determinar o impacto de uma via metabólica no oócito e/ou competência do embrião.

Mais recentemente, o desenvolvimento de uma variedade de sondas fluorescentes eficazes que reagem com enzimas ou substrato específicos, combinadas com a maior acessibilidade da tecnologia de microscopia confocal, melhorou a mensuração do metabolismo em um único oócitos e/ou embrião, uma vez que possuem a capacidade de combinar informações de quantificação e localização da atividade. Ao contrário de marcações tradicionais, como a imunohistoquímica, onde as células precisam se submeter a extenso processamento, tais como fixação e permeabilização, uma grande proporção destas sondas mais recentes são projetados para o uso em células vivas. Por exemplo, a absorção de glicose em um COC pode ser medida utilizando 6- (N- (7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il) amino) -6-desoxiglicose (6-NBDG), um marcador fluorescente análogo da glicose que é não hidrolisável (Sutton-McDowall *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012a, b), esse método que avalia a da captação de glicose complementa as informações de expressão de genes de transportadores de glicose (Wang *et al*, 2012a, b).

A maior acessibilidade às sondas comercialmente disponíveis tem sido particularmente vantajoso para os estudos das mitocôndrias. A saúde e a funcionalidade mitocondrial dependem de múltiplos fatores tais como densidade, localização e distribuição, maturidade e atividade (Babayev e Seli, 2015). Nos parágrafos seguintes a marcação mitocondrial será utilizada como um exemplo de como sondas podem ter como alvo características diferentes.

As sondas mitocondriais mais utilizadas são a JC-1 e a MitoTracker. JC-1 (5,5 ', 6,6'-tetracloro-1,1', 3,3'-tetraetillbenzimidazolilcarbocianina iodeto) é uma sonda de emissão dupla e razão métrica que foi utilizada para medir alterações no potencial da membrana mitocondrial (ΔΨm) no camundongo vivo e em oócitos humanos (Diaz *et al.*, 1999; Wilding *et al.*, 2001; Van Blerkom *et al.*, 2002, 2003; Zeng *et al.*, 2013). Quando o ΔΨm é baixo, JC-1 se apresenta como um monômero (emissão verde) e é convertida em J-dímeros/agregados (emissão vermelha) com alta ΔΨm. Assim, a razão entre a fluorescência vermelha e a verde indica alterações no ΔΨm independente do tamanho, forma e densidade mitocondrial. No entanto, como o JC-1 é muito sensível à concentração apresenta algumas desvantagens; com a utilização de concentrações elevadas de JC-1 pode levar a falsos positivos, e é altamente sensível a outros fatores, tais como H_2O_2, e requer um tempo longo de incubação e apresenta baixa retenção celular (Perry *et al*., 2011). Enquanto JC-1 funciona bem em oócitos e embriões de roedores, na nossa experiência, JC-1 tem uma fraca permeabilidade celular quando incubado com oócitos e embriões de bovinos, exigindo permeabilização celular ou a remoção da zona pelúcida; ambos os processos podem prejudicar o oócito e o embrião e, portanto, não são convenientes considerando que a sonda é utilizada para avaliar a função das células.

Alternativas ao JC-1, são a gama de sondas Mitotracker: domínios clorometil levemente reativos ao tiol, que são cátions lipofílicos, altamente permeáveis a célula e só fluorescem no interior das mesmas. Além disso, elas são mais robustos do que o JC-1, com maior fotoestabilidade, e requerem menos tempo de reação, apresentando maior capacidade de retenção celular e menor reação cruzada com outros fatores (Perry *et al*., 2011). Há duas formas principais de sondas MitoTracker: baseadas em carbocianinas ou rosaminas. A fluorescência das sondas que tem como base a carbocianina, tais como carbocianina Mitotracker verde FM (MTG) são independentes do ΔΨm, por conseguinte são indicadores da massa mitocondrial total juntamente com a localização, sendo particularmente útil em estudos comparativos da biossíntese mitocondrial em oócitos imaturo e maduros (Stojkovic *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2001; Sturmey *et al.*, 2006; Gendelman and Roth, 2012). Já as sondas baseadas em rosamina, tais como Mitotracker CMXRos, (MTR). são oxidadas no interior das células e são sequestradas para dentro da mitocôndria, portanto,são indicadores de atividade e ΔΨm (Castaneda *et al.*, 2013; Viet Linh *et al.*, 2013; Niu *et al.*, 2015; Sanchez *et al.*, 2015; Sutton-McDowall *et al.*, 2015). Num conceito semelhante ao de JC-1, as células podem ser co-marcadas com MTR e MTG para determinar a proporção de mitocôndria ativa em relação ao total (Pendergrass *et al.*, 2004), embora não seja de nosso conhecimento, se tal comparação tenha sido realizada em oócitos ou embriões.

Com os avanços no desenho das sondas, e na microscopia e tecnologia de imagem, a análise das imagens também evoluiu para medir diferentes atributos de pixel, como a distribuição, co-localização e padronização, além da intensidade. Isto pode melhorar a qualidade da informação sobre o papel das mitocôndrias em diferentes fases e qualidades de oócitos e embriões. As pesquisas em ultrassonografia, dermatologia e câncer são campos que rotineiramente utilizam matrizes avançadas de imagem para avaliar variações nos padrões de características de pixel como rugas, lisura, uniformidade e entropia de imagens (Castellano *et al.*, 2004; Alvarenga *et al.*, 2007; Mittra e Parekh, 2011). Em comparação, as análises de imagens nas pesquisas em embriões pré-implantação são em grande parte limitadas à medição da intensidade de fluorescência ou avaliação visual. Recentemente, utilizamos análises de textura (Haralick *et al.*, 1973; Murata *et al.*, 2001; Cabrera, 2006) para avaliar a influência da exposição dos COCs bovinos ao FSH e

ao BMP15 sobre a distribuição de MTR, monoclorobimana (MCB; indicativo de glutationa reduzida) e peroxifluor 1 (PF1; mede as concentrações de H_2O_2, um derivado de espécies reativas de oxigênio (Sutton-McDowall *et al.*, 2015). Além da intensidade de pixel, a análises de textura demonstraram associação com a localização homogênea da fluorescência e melhor desenvolvimento embrionário (Sutton-McDowall *et al*., 2015). À medida que a tecnologia melhora, os mecanismos pelos quais os produtos liberados são medidas continuarão a evoluir.

Enquanto as sondas fluorescentes são valiosas para o estudo do metabolismo, métodos não tóxicos e livres de marcadores seriam preferíveis para caracterizar o metabolismo e a viabilidade, em particular para ser utilizado como potencial diagnóstico da saúde do oócito e do embrião. Os doadores de elétrons NADPH/NADH (NAD(P)H) e o receptor de elétrons de FAD são fluoróforos endógenos com diferentes propriedades espectrais e, portanto, podem ser medidos simultaneamente por meio de microscopia confocal. NADH tem localização citoplasmática e mitocondrial, enquanto FAD está localizado exclusivamente na mitocôndria (Tabela 2). FAD e NAD(P)H são críticos para a homeostase de energia, portanto, sua medição indica o estado redox das células (FAD: NAD(P)H; Skala e Ramanujam, 2010). A mensuração da autofluorescência intracelular não tem sido amplamente explorada nas investigações sobre o metabolismo celular de embriões. No entanto, Dumollard *et al*. (2007a, b) utilizam autofluorescência como um método livre de marcadores para a localização de mitocôndrias (Dumollard *et al*., 2007a) e para estudar a influência de substratos de energia no estado redox ao longo do tempo (Dumollard *et al*., 2007b). Além disso, as medições de autofluorescência têm sido utilizadas e mostraram alterações nas razões de redox nos COCs após serem maturados na presença de OSF (Sutton-McDowall *et al.*, 2012, 2015; Sugimura *et al.*, 2014) e peptídeos semelhantes ao EGF (Richani *et al.*, 2014).

Tabela 2. Parâmetros de autofluorescência das moléculas envolvidas no metabolismo.

	Elétron	Localização	Vias	Excitação (nm)	Emissão (nm)
NADH	Doador	Citoplasma Mitocôndria	Glicolise ciclo TCA Fosforilação oxidativa	350	460
NADPH	Doador	Citoplasma	PPP	350	460
FAD	Receptor	Mitocôndria	Fosforilação oxidativa	450	535

Amostragem de meios de cultura

As técnicas convencionais para a determinação dos metabolitos incluem espectrometria de massa/cromatografia e analisadores químicos clínicos (Sutton-Mcdowall *et al*., 2012, 2014). Leese e colaboradores indicaram ensaios fluorométricos para medir nano e pico litros de amostras com base na oxidação e/ou redução de moléculas de sinalização, tais como autofluorescência FAD e NAD(P)H (Leese e Bronk, 1972). De fato, muitos desses ensaios ainda são utilizados devido à sua elevada sensibilidade e a capacidade para medir o *turnover* de metabólito em um único COC ou embrião.

A metabolômica é o mais novo membro da família das "omicas" e ao contrário de outros ensaios metabólicos, traz uma abordagem mais holística para os perfis, pois permite não só a medição do *turnover* do substrato, mas também as mudanças na atividade da via e dos alvos subsequente (Krisher *et al*., 2015). Metabolômica combina duas tecnologias para separar (cromatografia gasosa ou cromatografia líquida de alta eficiência), e detectar (espectrometria de massa, ressonância magnética nuclear ou espectrometria Raman) em meios de cultivo um número maior de metabólitos do que os detectados em ensaios fluorométricos e outros métodos analíticos. Ambas as medições quantitativas ou qualitativas podem ser realizadas com medidas quantitativas que exige a geração de curvas padrão, o que limita o número de substratos que podem ser medidos (Thompson *et al*., 2014). Algumas plataformas metabolômicas tem sido utilizadas para análise de meios visando mensurar a qualidade do embrião com resultados favoráveis (Krisher *et al*., 2015), entretanto essas análises não estão sendo utilizadas na FIV em humanos devido aos resultados inconsistentes e dependente de formulações de meios.

O futuro das mensurações metabólica em oócitos e embriões

Uma grande lacuna no conhecimento que ainda permanece é a caracterização do metaboloma do COC e dos embriões *in vivo* já que a capacidade de medir esta característica *in situ* é inexistente. Existe uma necessidade de se criar novas tecnologias que permitam a medição *in vivo* de reações bioquímicas, uma vez que mesmo curtas exposições às condições *in vitro* podem alterar o metabolismo dos COCs e embriões. O desenvolvimento de diagnósticos de sensoriamento remoto, como fibras ópticas, micro e nano-partículas são opções para fazer sensoriamento de forma minimamente invasiva. Um candidato ideal é a adaptação de endoscópios multi-fótons em microfibras óticas para permitir uma medição *in vivo* da autofluorescência, e do estado

redox dos COCs e embriões (Helmchen, 2002).

Mesmo *in vitro*, as exigências metabólicas de COCs são dinâmicas, com altos níveis de plasticidade, onde a maioria das medições são feitas em um único ponto do tempo. Além disso, numerosas vias metabólicas estão em jogo e a atividade diferencial pode resultar em numerosas consequências. Por esta razão, a utilização de uma única medição de um único metabólito não é suficiente. Plataformas que permitam avaliação de diferentes aspectos do metabolismo são críticas para o avanço do conhecimento da maturação ovocitária. Isto poderia ser alcançado usando tecnologias livre de marcadores, sem marcadores, não tóxicas e sondas reversíveis, permitindo medições repetidas e alterações no metabolismo, que são cruciais para períodos dinâmicos no desenvolvimento, tais como a maturação do oócito, fecundação e ativação do genoma embrionário. Essencialmente, mensurar mais em menos. A meta em longo prazo poderia envolver o desenvolvimento de sondas e sistemas de detecção que podem ser integrados em incubadoras, permitindo o monitoramento continuo das mudanças no metabolismo e, assim, prever a saúde e a qualidade dos embriões e oócitos.

Referências

Albertini DF, Combelles CM, Benecchi E, Carabatsos MJ. 2001. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction*, 121:647-653.

Alvarenga AV, Pereira WC, Infantosi AF, Azevedo CM. 2007. Complexity curve and grey level co-occurrence matrix in the texture evaluation of breast tumor on ultrasound images. *Med Phys*, 34:379-387.

Babayev E, Seli E. 2015. Oocyte mitochondrial function and reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 27:175-181.

Bavister BD. 1987. *The Mammalian Preimplantation Embryo: Regulation of Growth and Differentiation In Vitro*. New Yok, NY: Plenum Press.

Bavister BD. 1995. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum Reprod Update*, 1:91-148.

Biggers JD, Whittingham DG, Donahue RP. 1967. The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. *Zoology*, 58: 560-567.

Buccione R, Vanderhyden BC, Caron PJ, Eppig JJ. 1990. FSH-induced expansion of the mouse cumulus oophorus in vitro is dependent upon a specific factor(s) secreted by the oocyte. *Dev Biol*, 138:16-25.

Cabrera J. 2006. Texture analyzer. July 7, 2006. Available on: http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/texture.html.

Carlson D, Black DL, Howe GR. 1970. Oviduct secretion in the cow. *J Reprod Fertil*, 22:549-552.

Castaneda CA, Kaye P, Pantaleon M, Phillips N, Norman S, Fry R, D'Occhio MJ. 2013. Lipid content, active mitochondria and brilliant cresyl blue staining in bovine oocytes. *Theriogenology*, 79:417-422.

Castellano G, Bonilha L, Li LM, Cendes F. 2004. Texture analysis of medical images. *Clin Radiol*, 59:1061-1069.

Chang AS, Dale AN, Moley KH. 2005. Maternal diabetes adversely affects preovulatory oocyte maturation, development, and granulosa cell apoptosis. *Endocrinology*, 146:2445-2453.

Cohen J, Rieger D, Wiemer K. 2008. A single medium for culture of the human embryo from zygote to blastocyst. *Reprod Biomed Online*, 17:S-19.

Diaz G, Setzu MD, Zucca A, Isola R, Diana A, Murru R, Sogos V, Gremo F. 1999. Subcellular heterogeneity of mitochondrial membrane potential: relationship with organelle distribution and intercellular contacts in normal, hypoxic and apoptotic cells. *J Cell Sci*, 112(pt.7):1077-1084.

Dickens CJ, Maguiness SD, Comer MT, Palmer A, Rutherford AJ, Leese HJ. 1995. Human tubal fluid: formation and composition during vascular perfusion of the fallopian tube. *Hum Reprod*, 10:505-508.

Downs SM. 1997. Involvement of purine nucleotide synthetic pathways in gonadotropin- induced meiotic maturation in mouse cumulus cell-enclosed oocytes. *Mol Reprod Dev*, 46:155-167.

Downs SM, Mastropolo AM. 1997. Culture conditions affect meiotic regulation in cumulus cell-enclosed mouse oocytes. *Mol Reprod Dev*, 46:551-566.

Downs SM, Humpherson PG, Leese HJ. 1998. Meiotic induction in cumulus cell-enclosed mouse oocytes: involvement of the pentose phosphate pathway. *Biol Reprod*, 58:1084-1094.

Downs SM, Utecht AM. 1999. Metabolism of radiolabeled glucose by mouse oocytes and oocyte-cumulus cell complexes. *Biol Reprod*, 60:1446-1452.

Dumesic DA, Meldrum DR, Katz-Jaffe MG, Krisher RL, Schoolcraft WB. 2015. Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. *Fertil Steril*, 103:303-316.

Dumollard R, Duchen M, Carroll J. 2007a. The role of mitochondrial function in the oocyte and embryo. *Curr Top Dev Biol*, 77:21-49.

Dumollard R, Ward Z, Carroll J, Duchen MR. 2007b. Regulation of redox metabolism in the mouse oocyte and embryo. *Development*, 134:455-465.

Dunning K, Russell DL, Robker R. 2014. Lipids and oocyte developmental competence: the role of fatty acids and B-oxidation. *Reproduction*, 148:R15-27.

Edwards RG. 1965. Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature*, 208:349-351.

Eppig JJ. 1991. Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells.

Bioessays, 13:569-574.

Fischer B, Bavister BD. 1993. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *J Reprod Fertil*, 99:673-679.

Frank LA, Sutton-McDowall ML, Russell DL, Wang X, Feil DK, Gilchrist RB, Thompson JG. 2013. Effect of varying glucose and glucosamine concentration in vitro on mouse oocyte maturation and developmental competence. *Reprod Fertil Dev*, 25:1095-104.

Gandhi AP, Lane M, Gardner DK, Krisher RL. 2000. A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. *Hum Reprod*, 15:395-401.

Gardner DK, Lane M, Calderon I, Leeton J. 1996. Environment of the preimplantation human embryo *in vivo*: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. *Fertil Steril*, 65:349-353.

Gardner DK, Lane MW, Lane M. 1997. Bovine blastocyst cell number is increased by culture with EDTA for the first 72 hours of development from the zygote. *Theriogenology*, 47:278. (abstract).

Gardner DK, Lane M, Watson AJ. 2004. *A Laboratory Guide to the Mammalian Embryo*. New York, NY: Oxford University Press.

Gendelman M, Roth Z. 2012. Incorporation of coenzyme Q10 into bovine oocytes improves mitochondrial features and alleviates the effects of summer thermal stress on developmental competence. *Biol Reprod*, 87:118. doi: 10.1095/biolreprod.112.101881.

Gilchrist RB, Thompson JG. 2007. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. *Theriogenology*, 67:6-15.

Gott AL, Hardy K, Winston RM, Leese HJ. 1990. Non-invasive measurement of pyruvate and glucose uptake and lactate production by single human preimplantation embryos. *Hum Reprod*, 5:104-108.

Haralick RM, Shanmuga K, Dinstein I. 1973. Textural features for image classification. *IEEE Trans Syst Man Cyb*, Smc3:610-621.

Helmchen F. 2002. Miniaturization of fluorescence microscopes using fibre optics. *Exp Physiol*, 87:737-745.

Houghton FD, Thompson JG, Kennedy CJ, Leese HJ. 1996. Oxygen consumption and energy metabolism of the early mouse embryo. *Mol Reprod Dev*, 44:476-485.

Hussein TS, Froiland DA, Amato F, Thompson JG, Gilchrist RB. 2005. Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *J Cell Sci*, 118:5257-5268.

Krisher R. 2013. In vivo and in vitro environmental effects on mammalian oocyte quality. *Ann Rev Anim Biosci*, 1:393-417.

Krisher RL, Bavister BD. 1999. Enhanced glycolysis after maturation of bovine oocytes in vitro is associated with increased developmental competence. *Mol Reprod Dev*, 53:19-26.

Krisher RL, Heuberger AL, Paczkowski M, Stevens J, Pospisil C, Prather RS, Sturmey RG, Herrick JR, Schoolcraft, WB. 2015. Applying metabolomic analyses to the practice of embryology: physiology, development and assisted reproductive technology. *Reprod Fertil Dev*. doi: 10.1071/RD14359.

Lane M, Gardner DK, Hasler M, Hasler JF. 2003. Use of G1.2/G2.2 media for commercial bovine embryo culture: equivalent development and pregnancy rates compared to co-culture. *Theriogenology*, 60:407-419.

Lane M, Gardner DK. 2007. Embryo culture medium: which is the best? *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 21:83-100.

Lawitts JA, Biggers JD. 1991. Overcoming the 2-cell block by modifying standard components in a mouse embryo culture medium. *Biol Reprod*, 45:245-251.

Leese HJ, Bronk JR. 1972. Automated fluorometric analysis of micromolar quantities of ATP, glucose, and lactic acid. *Anal Biochem*, 45:211-221.

Leese HJ, Baumann CG, Brison DR, McEvoy TG, Sturmey RG. 2008. Metabolism of the viable mammalian embryo: quietness revisited. *Mol Hum Reprod*, 14:667-672.

Leese HJ. 2012. Metabolism of the preimplantation embryo: 40 years on. *Reproduction*, 143:417-427.

Leroy JL, Vanholder T, Delanghe JR, Opsomer G, Van Soom A, Bols PE, de Kruif A. 2004. Metabolite and ionic composition of follicular fluid from different-sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. *Anim Reprod Sci*, 80:201-211.

Leroy JL, Van Soom A, Opsomer G, Bols PE. 2008. The consequences of metabolic changes in high-yielding dairy cows on oocyte and embryo quality. *Animal*, 2:1120-1127.

Lippes J, Enders RG, Pragay DA, Bartholomew WR. 1972. The collection and analysis of human fallopian tubal fluid. *Contraception*, 5:85-103.

Lopata A, Patullo MJ, Chang A, James B. 1976. A method for collecting motile spermatozoa from human semen. *Fertil Steril*, 27:677-684.

Maas DH, Storey BT, Mastroianni L Jr. 1976. Oxygen tension in the oviduct of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Fertil Steril*, 27:1312-1317.

Matzuk MM, Burns KH, Viveiros MM, Eppig JJ. 2002. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science*, 296:2178-2180.

Mittra AK, Parekh R. 2011. Automated detection of skin diseases using texture features. *Int J Eng Sci Technol*, 3:4801-4808.

Murata S, Herman P, Lakowicz JR. 2001. Texture analysis of fluorescence lifetime images of AT- and

GC-rich regions in nuclei. *J Histochem Cytochem*, 49:1443-1451.

Niu Y, Wang C, Xiong Q, Yang X, Chi D, Li P, Liu H, Li J, Huang R. 2015. Distribution and content of lipid droplets and mitochondria in pig parthenogenetically activated embryos after delipation. *Theriogenology*, 83:131-138.

O'Fallon JV, Wright RW Jr. 1986. Quantitative determination of the pentose phosphate pathway in preimplantation mouse embryos. *Biol Reprod*, 34:58-64.

Paternot G, Debrock S, D'Hooghe TM, Spiessens C. 2010. Early embryo development in a sequential versus single medium: a randomized study. *Reprod Biol Endocrinol*, 8:83,7 pp.

Pendergrass W, Wolf N, Poot M. 2004. Efficacy of mitotracker green and CMXrosamine to measure changes in mitochondrial membrane potentials in living cells and tissues. *Cytometry A*, 61:162-169.

Perry SW, Norman JP, Barbieri J, Brown EB, Gelbard HA. 2011. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Biotechniques*, 50:98-115.

Purcell SH, Moley KH. 2011. The impact of obesity on egg quality. *J Assist Reprod Genet*, 28:517-524.

Que EL, Bleher R, Duncan FE, Kong BY, Gleber SC, Vogt S, Chen S, Garwin SA, Bayer AR, Dravid VP, Woodruff TK, O'Halloran TV. 2014. Quantitative mapping of zinc fluxes in the mammalian egg reveals the origin of fertilization-induced zinc sparks. *Nat Chem*, 7:130-139.

Quinn P, Kerin JF, Warnes GM. 1985. Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil Steril*, 44:493-498.

Restall BJ, Wales RG. 1966. The fallopian tube of the sheep. 3. The chemical composition of the fluid from the fallopian tube. *Aust J Biol Sci*, 19:687-698.

Richani D, Sutton-McDowall ML, Frank LA, Gilchrist RB, Thompson JG. 2014. Effect of epidermal growth factor-like peptides on the metabolism of in vitro- matured mouse oocytes and cumulus cells. *Biol Reprod*, 90:49. doi: 10.1095/biolreprod.113.115311.

Rieger D, Guay P. 1988. Measurement of the metabolism of energy substrates in individual bovine blastocysts. *J Reprod Fertil*, 83:585-591.

Rieger D, Loskutoff NM. 1994. Changes in the metabolism of glucose, pyruvate, glutamine and glycine during maturation of cattle oocytes in vitro. *J Reprod Fertil*, 100:257-262.

Robker RL. 2008. Evidence that obesity alters the quality of oocytes and embryos. *Pathophysiology*, 15:115-121.

Salustri A, Ulisse S, Yanagishita M, Hascall VC. 1990a. Hyaluronic acid synthesis by mural granulosa cells and cumulus cells in vitro is selectively stimulated by a factor produced by oocytes and by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem*, 265:19517-19523.

Salustri A, Yanagishita M, Hascall VC. 1990b. Mouse oocytes regulate hyaluronic acid synthesis and mucification by FSH-stimulated cumulus cells. *Dev Biol*, 138:26-32.

Sanchez F, Romero S, De Vos M, Verheyen G, Smitz J. 2015. Human cumulus-enclosed germinal vesicle oocytes from early antral follicles reveal heterogeneous cellular and molecular features associated with in vitro maturation capacity. *Hum Reprod*, 30:1396-409.

Skala M, Ramanujam N. 2010. Multiphoton redox ratio imaging for metabolic monitoring *in vivo*. *Methods Mol Biol*, 594:155-162.

Spindler RE, Pukazhenthi BS, Wildt DE. 2000. Oocyte metabolism predicts the development of cat embryos to blastocyst in vitro. *Mol Reprod Dev*, 56:163-171.

Stojkovic M, Machado SA, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Goncalves PB, Wolf E. 2001. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biol Reprod*, 64:904-909.

Sturmey RG, Leese HJ. 2003. Energy metabolism in pig oocytes and early embryos. *Reproduction*, 126:197-204.

Sturmey RG, O'Toole PJ, Leese HJ. 2006. Fluorescence resonance energy transfer analysis of mitochondrial:lipid association in the porcine oocyte. *Reproduction*, 132:829-837.

Sturmey RG, Reis A, Leese HJ, McEvoy TG. 2009. Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. *Reprod Domest Anim*, 44(suppl.3):50-58.

Sudiman J, Sutton-McDowall ML, Ritter LJ, White MA, Mottershead DG, Thompson JG, Gilchrist RB. 2014. Bone morphogenetic protein 15 in the pro-mature complex form enhances bovine oocyte developmental competence. *PLoS One*, 9:e103563.

Sugimura S, Ritter, LJ, Sutton-McDowall ML, Mottershead DG, Thompson JG, Gilchrist RB. 2014. Amphiregulin co-operates with bone morphogenetic protein 15 to increase bovine oocyte developmental competence: effects on gap junction-mediated metabolite supply. *Mol Hum Reprod*, 20:499-513.

Sugiura K, Eppig JJ. 2005. Society for Reproductive Biology Founders' Lecture 2005. Control of metabolic cooperativity between oocytes and their companion granulosa cells by mouse oocytes. *Reprod Fertil Dev*, 17:667-674.

Summers MC, Biggers JD. 2003. Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues. *Hum Reprod Update*, 9:557-582.

Sun QY, Wu GM, Lai L, Park KW, Cabot R, Cheong HT, Day BN, Prather RS, Schatten H. 2001. Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development in vitro. *Reproduction*, 122:155-163.

Sutton ML, Cetica PD, Beconi MT, Kind KL, Gilchrist RB, Thompson JG. 2003a. Influence of oocyte-secreted factors and culture duration on the metabolic activity of bovine cumulus cell complexes. *Reproduction*, 126:27-34.

Sutton ML, Cetica PD, Gilchrist RB, Thompson JG. 2003b. The metabolic profiles of bovine cumulus-oocyte complexes: effects of oocyte-secreted factors and stimulation of cumulus expansion. *Theriogenology*, 59:500. (abstract).

Sutton ML, Gilchrist RB, Thompson JG. 2003c. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Hum Reprod Update*, 9:35-48.

Sutton-McDowall ML, Gilchrist RB, Thompson JG. 2005. Effect of hexoses and gonadotrophin supplementation on bovine oocyte nuclear maturation during in vitro maturation in a synthetic follicle fluid medium. *Reprod Fertil Dev*, 17:407-415.

Sutton-McDowall ML, Mitchell M, Cetica P, Dalvit G, Pantaleon M, Lane M, Gilchrist RB, Thompson JG. 2006. Glucosamine supplementation during in vitro maturation inhibits subsequent embryo development: possible role of the hexosamine pathway as a regulator of developmental competence. *Biol Reprod*, 74:881-888.

Sutton-McDowall M, Gilchrist R, Thompson J. 2010. The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. *Reproduction*, 139:685-695.

Sutton-McDowall ML, Mottershead DG, Gardner DK, Gilchrist RB, Thompson JG. 2012. Metabolic differences in bovine cumulus-oocyte complexes matured in vitro in the presence or absence of follicle-stimulating hormone and bone morphogenetic protein 15. *Biol Reprod*, 87:87, 81-88.

Sutton-McDowall ML, Yelland R, Macmillan KL, Robker RL, Thompson JG. 2014. A study relating the composition of follicular fluid and blood plasma from individual Holstein dairy cows to the in vitro developmental competence of pooled abattoir-derived oocytes. *Theriogenology*, 82:95-103

Sutton-McDowall ML, Purdey M, Brown HM, Abell AD, Mottershead DG, Cetica PD, Dalvit GC, Goldys EM, Gilchrist RB, Gardner DK, Thompson JG. 2015. Redox and anti-oxidant state within cattle oocytes following in vitro maturation with bone morphogenetic protein 15 and follicle stimulating hormone. *Mol Reprod Dev*, 82:281-294.

Swain JE, Bormann CL, Krisher RL. 2001. Development and viability of in vitro derived porcine blastocysts cultured in NCSU23 and G1.2/G2.2 sequential medium. *Theriogenology*, 56:459-469.

Tervit HR, Whittingham DG, Rowson LE. 1972. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J Reprod Fertil*, 30:493-497.

Thompson JG, Simpson AC, Pugh PA, Tervit HR. 1992. Requirement for glucose during in vitro culture of sheep preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev*, 31:253-257

Thompson JG, Partridge RJ, Houghton FD, CoxCI, Leese HJ. 1996. Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos. *J Reprod Fertil*, 106:299-306.

Thompson JG. 2000. In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos - a decade of achievement. *Anim Reprod Sci*, 60-61:263-275.

Thompson JG, Lane M, Gilchrist RB. 2007. Metabolism of the bovine cumulus-oocyte complex and influence on subsequent developmental competence. *Soc Reprod Fertil Suppl*, 64:179-190.

Thompson JG, Gilchrist RB, Sutton-McDowall ML. 2014. Metabolism of the bovine cumulus oocyte complex revisited. *In*: Juengel JL, Miyamoto A, Price C, Reynolds LP, Smith MF, Webb R (Ed.). *Reproduction in Domestic Ruminants VIII*. London, UK: Society for Reproduction and Fertility. vol. 1, pp. 311-326.

Van Blerkom J, Davis P, Mathwig V, Alexander S. 2002. Domains of high-polarized and low-polarized mitochondria may occur in mouse and human oocytes and early embryos. *Hum Reprod*, 17:393-406.

Van Blerkom J, Davis P, Alexander S. 2003. Inner mitochondrial membrane potential (DeltaPsim), cytoplasmic ATP content and free Ca2+ levels in metaphase II mouse oocytes. *Hum Reprod*, 18:2429-2440.

Van Hoeck V, Sturmey RG, Bermejo-Alvarez P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Leese HJ, Bols PE, Leroy JL. 2011. Elevated non-esterified fatty acid concentrations during bovine oocyte maturation compromise early embryo physiology. *PloS One*, 6:e23183.

Vanderhyden BC, Macdonald EA. 1998. Mouse oocytes regulate granulosa cell steroidogenesis throughout follicular development. *Biol Reprod*, 59:1296-1301.

Viet Linh N, Kikuchi K, Nakai M, Tanihara F, Noguchi J, Kaneko H, Dang-Nguyen TQ, Men NT, Van Hanh N, Somfai T, Nguyen BX, Nagai T, Manabe N. 2013. Fertilization ability of porcine oocytes reconstructed from ooplasmic fragments produced and characterized after serial centrifugations. *J Reprod Dev*, 59:549-556.

Wale PL, Gardner DK. 2012. Oxygen regulates amino acid turnover and carbohydrate uptake during the preimplantation period of mouse embryo development. *Biol Reprod*, 87:24, 21-28.

Wang C, Machaty Z. 2013. Calcium influx in mammalian eggs. *Reproduction*, 145:R97-R105.

Wang Q, Chi MM, Moley KH. 2012a. Live imaging

reveals the link between decreased glucose uptake in ovarian cumulus cells and impaired oocyte quality in female diabetic mice. *Endocrinology*, 153:1984-1989.

Wang Q, Chi MM, Schedl T, Moley KH. 2012b. An intercellular pathway for glucose transport into mouse oocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 302:E1511-1518.

Wilding M, Dale B, Marino M, di Matteo L, Alviggi C, Pisaturo ML, Lombardi L, De Placido G. 2001. Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. *Hum Reprod*, 16:909-917.

Zeng HT, Ren Z, Guzman L, Wang X, Sutton-McDowall ML, Ritter LJ, De Vos M, Smitz J, Thompson JG, Gilchrist RB. 2013. Heparin and cAMP modulators interact during pre-in vitro maturation to affect mouse and human oocyte meiosis and developmental competence. *Hum Reprod*, 28:1536-1545.

Quais os avanços na criopreservação de embriões?

C. Almiñana[1,3], C. Cuello[2]

[1]UMR85, Physiologie de la Reproduction et des Comportements, INRA, Nouzilly, France.
[2]Department of Animal Medicine and Surgery, Faculty of Veterinary, University of Murcia, Campus de Espinardo, Murcia. Spain

Resumo

A criopreservação de embriões é uma ferramenta fundamental para o armazenamento e para o intercâmbio de recursos genéticos de animais de produção e espécies ameaçadas de extinção. A criopreservação de embriões tem inúmeras aplicações na medicina humana, na produção animal, e no uso de outras biotécnicas para fins de pesquisa, portanto, existe a necessidade de se estabelecer um protocolo padrão que possa ser utilizado nas várias áreas de aplicação. Esta revisão visa fornecer ao leitor um breve resumo dos procedimentos "clássicos" de criopreservação de embriões em animais de produção, com uma análise mais aprofundada das "novas tendências". Além disso, os efeitos de criopreservação no embrião são revistos, desde o dano celular visível até o dano em nível de transcriptoma, proteoma e lipidoma, sendo também abordados os efeitos epigenéticos desta tecnologia. Finalmente, são feitas algumas considerações pessoais sobre os fatores que se deve levar em conta quando criopreservação de embriões é realizada: como selecionar os melhores embriões para criopreservação, a eterna pergunta por quanto tempo pode-se armazenar os embriões criopreservados, o fato de que o tamanho e a quantidade de lipídeos são importantes na criopreservação de embriões e, finalmente, a sugestão de se criar protocolos de criopreservação "à la carte" atendendo às necessidades de cada tipo de embrião.

Palavras-chave criopreservação, embrião, animais de produção, congelamento lento, vitrificação.

Introdução

A criopreservação de embriões tem sido uma ferramenta muito útil à embriologia desde a primeira criopreservação realizada com sucesso em embriões de camundongo em 1972 (Whittingham *et al.,* 1972). Esta tecnologia é o melhor método para a preservação em longo prazo de recursos genéticos valiosos, tanto de animais experimentais como de produção. O uso da criopreservação é também essencial para a utilização generalizada da transferência de embriões, que permite a troca de genética com custos reduzidos de transporte, evitando interferências no o bem-estar dos animais e com um risco mínimo de transmissão da doença. Atualmente, existem milhões de produtos nascidos de embriões criopreservados de mais de 40 espécies de mamíferos (Saragusty e Arav, 2011)

O aperfeiçoamento dos protocolos de congelamento e o desenvolvimento da técnica de vitrificação levaram a grandes avanços na criopreservação de embriões nos últimos 30 anos. Comparando os resultados atuais com aqueles obtidos quando os primeiros sistemas de congelamento foram utilizados, torna-se evidente que estamos no caminho certo. Os pesquisadores das áreas de criobiologia e biologia da reprodução têm gerado informações que permitem uma melhor compreensão dos princípios físicos das técnicas de criopreservação (Liu *et al.,* 2012), e seus efeitos biológicos de curto e longo prazo sobre o embrião. Atualmente, a criopreservação de embriões é rotineiramente utilizada em programas comerciais de transferência de embriões (TE) bovinos. De acordo com o 23º relatório anual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) que contém os dados relativos à atividade de TE em 2013, quase 60% das transferências de embriões *in vivo* de bovinos foram realizadas utilizando-se embriões criopreservados, havendo uma grande variação entre países (IETS, 2014). Para outras espécies de animais domésticos (pequenos ruminantes, suínos e equinos) pouco se sabe sobre o uso dessa tecnologia, principalmente devido à falta de relatórios dessa atividade nessas espécies. Além disso, a dificuldade e o alto custo para obtenção de grande número de embriões tem limitado o número de estudos sobre criopreservação de embriões realizando a TE nessas espécies. No entanto, acredita-se que a atividade de criopreservação de embriões de TE está a aumentando, principalmente em suínos.

Até momento, a ausência de um protocolo universal ótimo e as baixas taxas de sobrevivência e de parto observadas com o congelamento lento em algumas espécies de mamíferos (revisado por Vajta, 2013), representam os principais obstáculos para uma utilização mais abrangente da criopreservação de embriões.

Nesta revisão, são apresentados os últimos avanços obtidos na criopreservação de embriões e, alguns dos grandes desafios que aqueles envolvidos nas áreas de biologia da reprodução e criobiologia precisam superar nos próximos anos. Nosso objetivo é dar algumas dicas que possam ser utilizadas por pesquisadores como um guia para aperfeiçoar os protocolos de criopreservação de embriões, de forma que essa técnica possa ser utilizada rotineiramente em várias espécies.

99

[3]Autor Correspondente: calminana@tours.inra.fr

Estratégias e seus princípios: congelamento lento e vitrificação

Duas estratégias básicas têm dominado a área de criopreservação de embriões: o congelamento lento, também conhecido como convencional, "congelamento de equilíbrio" ou "congelamento lento controlado" e, a vitrificação. Na presente revisão, os princípios básicos destas duas estratégias são abordados resumidamente, uma vez que avaliações mais detalhadas sobre estes sistemas podem ser facilmente encontradas na literatura (Leibo e Songsasen, 2002; Mazur, 2004; Fahy e Rall, 2007).

No processo de congelamento lento, o embrião é colocado numa solução hipertônica contendo 1-1,5 mol/L de crioprotetores permeáveis de baixo peso molecular para facilitar sua desidratação parcial e, portanto, para evitar a formação de cristais intracelulares de gelo durante a criopreservação. Os embriões são lentamente resfriados (0,2-2,0ºC / min) utilizando-se um congelador programável para temperaturas negativas (-30 a -70°C), e, em seguida, imersos em nitrogênio líquido (-196ºC). Neste procedimento, os embriões atingem o equilíbrio osmótico com a solução de crioprotetores (CPA) antes do congelamento (Palasz e Mapletoft, 1996; Youngs *et al.*, 2011). O procedimento de congelamento lento é eficaz em embriões de camundongos, bovinos e humanos. No entanto, para os embriões mais sensíveis aos danos por frio, como os de suínos, embriões produzidos *in vitro* ou embriões em fase inicial do desenvolvimento, o congelamento lento não é eficiente.

A vitrificação é definida como a solidificação de uma solução à base de água formando um estado vítreo amorfa como vidro, sem formação de cristais de gelo. A vitrificação pode ser obtida usando altas taxas de resfriamento e de concentração elevada de CPA (Fahy *et al.*, 1984). A vitrificação de embriões, que foi relatada pela primeira vez por Rall e Fahy (1985), tem duas vantagens principais em comparação com o congelamento lento; elimina a formação de gelo e reduz o dano pelo frio (revisado em Kasai e Mukaida, 2004). A vitrificação é mais eficaz, muito mais rápida e mais simples do que o congelamento lento controlado, uma vez que não necessita de equipamento automatizado, podendo ser feita mesmo em condições de campo. No entanto, requer pessoal altamente treinado para a manipulação de embriões em pequenos volumes e em tempos de equilíbrio curtos. No processo de vitrificação, o embrião é exposto primeiro a uma solução de baixa concentração de CPA (1-1,5 mol / L) e, em seguida, a uma solução muito mais concentrada (4-8 mol / L). A vitrificação depende especialmente de dois aspectos que estão intimamente ligados entre si: 1) uma taxa de resfriamento muito elevada (cerca de 20000 °C / min ou superior), o que é conseguida por imersão em nitrogênio líquido (-196ºC) utilizando diferentes dispositivos ou palhetas (revisado em Arav, 2014), que permitam a vitrificação de embriões em volumes mínimos; e 2) a elevada viscosidade dos meios de vitrificação, o que depende da concentração dos CPA. A alta concentração de agentes crioprotetores necessária para atingir uma elevada viscosidade é a principal preocupação da vitrificação, porque estes podem ser tóxicos para o embrião e podem causar danos osmóticos (Libermann *et al.*, 2002). A taxa de resfriamento e as concentrações de CPA estão inversamente relacionadas, quanto mais rápido o resfriamento, menor será a concentração necessária de CPA para se realizar a vitrificação (Liu *et al.*, 2012). Este é um ponto chave para se reduzir a toxicidade das soluções de vitrificação.

Aspectos importantes para o sucesso de um protocolo de criopreservação: o clássico e as novas tendências

Novos dispositivos para a criopreservação de embriões

O congelamento lento é comumente realizado usando-se as tradicionais palhetas de 0,25 ml. No entanto, um avanço considerável ocorreu no desenvolvimento de dispositivos para vitrificação nos últimos anos, sendo que e novos dispositivos que minimizam o volume em que os embriões são vitrificados (0,1-1 mL) têm sido propostos (revisado em Arav, 2014). Estes dispositivos, que aumentam as taxas de resfriamento e aquecimento (até 20000ºC / min), podem ser classificados em grupos: 1) técnicas de superfície e sistemas abertos, que permitem a maior taxa de resfriamento e também altas taxas de aquecimento por exposição direta a soluções; e 2) os sistemas fechados, que permitem elevadas taxas de resfriamento, com a vantagem de serem mais seguros e mais fáceis de manusear. A principal limitação destes dispositivos é o alto custo e o baixo número de embriões que podem conter, o que é uma grande desvantagem para a criopreservação de rotina de embriões de animais pluríparos, como os suínos. Para superar este problema, sistemas que permitem a criopreservação de grande número de embriões, tais como o sistema de fibra oca (hollow fiber; Matsunari *et al.*, 2012) e o dispositivo de papel (Kim *et al.*, 2012) foram propostos recentemente. Além disso, novas tendências visam à automatização da preparação da amostra para a vitrificação de embriões de mamíferos utilizando microcanais digitais (Pyne *et al.*, 2014).

Meios de criopreservação e crioprotetores

Os meios de congelamento e vitrificação são soluções aquosas de crioprotetores em meio de cultivo tamponado com tampão fosfato ou Hepes. Embora alguns meios de criopreservação e de aquecimento estejam comercialmente disponíveis para bovinos, equinos e suínos, a maioria dos dados publicados sobre criopreservação de embriões de animais de produção, foi obtida utilizando-se soluções "artesanais".

Comumente estes meios contêm componentes do soro ou soro. Entretanto, existe uma preocupação crescente relacionada às vantagens de utilizar meios quimicamente definidos para criopreservação de embriões, o que eliminaria o risco sanitário e reduziria as fontes de variação entre laboratórios. Neste sentido, meios sintéticos já foram descritos para a vitrificação de embriões bovinos (Hasler, 2010) e suínos (Sánchez-Osorio *et al.*, 2010). A comercialização e uso destes meios sintéticos traria um grande benefício para a o uso generalizado desta tecnologia.

O congelamento lento e a vitrificação requerem a exposição de embriões a CPAs, a fim de evitar a formação de cristais de gelo. Durante as últimas décadas, uma ampla gama de agentes crioprotetores têm sido utilizados na criopreservação de embrião, esses podem ser divididas em três grupos: 1) CPAs permeáveis, de peso molecular baixo, tais como glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), propileno glicol, etileno glicol (EG) e outros alcoóis; 2) CPAs não permeáveis de baixo peso molecular, que incluem sacarose, trealose e outros açúcares; e, 3) CPAs não permeáveis de alto peso molecular, tais como álcool polivinílico e outros polímeros (revisado em Palasz e Mapletoft, 1996).

Na prática, os protocolos de congelamento lento geralmente requerem o uso de um único CPA permeável, enquanto que a vitrificação envolve o uso de misturas de dois CPAs permeáveis em combinação com um açúcar (revisado por Palasz e Mapletoft, 1996; Kasai e Mukaida, 2004). Pelo fato da vitrificação requerer altas concentrações de CPAs, a toxicidade é um problema importante a ser considerado quando se busca a otimização dos protocolos. A alta concentração de CPA pode levar a toxicidade química e lesão osmótica. Desta forma, a combinação de dois CPAs permeáveis tem sido utilizada com sucesso para reduzir a toxicidade de agentes individuais durante a vitrificação de embriões de várias espécies de mamíferos (Ishimori *et al.*, 1992, Vicente *et al.*, 1994). Além disso, a adição de um CPA não permeável, como um açúcar ou uma macromolécula, à solução de vitrificação reduz significativamente a quantidade de CPA permeável necessária para vitrificação e, por conseguinte, reduz a toxicidade (Liebermann *et al.*, 2002, Liu *et al.*, 2012). O CPA mais comum e aceito para vitrificação é o EG que tem uma baixa toxicidade e é altamente permeável (Emiliani *et al.*, 2000). Cada CPA tem uma permeabilidade diferente e assim, para se ter sucesso no processo de vitrificação, é necessário estabelecer um equilíbrio entre a concentração de CPA, o tempo de exposição e a temperatura de trabalho. . Também são necessárias adaptações dos protocolos dependendo da espécie ou do estágio de desenvolvimento embrionário. Assim, enquanto a mistura DMSO, EG e sacarose é a preferida para a criopreservação de embriões suínos e bovinos; glicerol e EG parecem ser os CPA preferidos para embriões equinos (Barfield *et al.*, 2009; Kingma *et al.*, 2011).

O congelamento lento é mundialmente usado para embriões de bovinos, ovinos e caprinos produzidos *in vivo*, com taxas de gestação e aparto adequadas (Tabela 1). Até o momento a vitrificação não substituiu o congelamento lento, mas é uma alternativa para situações em que os procedimentos tradicionais de criopreservação produzem resultados insatisfatórios. Este é o caso de embriões de suínos, embriões em fases iniciais de desenvolvimento e embriões produzidos *in vitro* (revisado em Vajta, 2000).

Tabela 1. Resumo das publicações relativas a taxas de parto após a transferência de embriões, produzidos *in vivo* e criopreservados de várias espécies domésticas.

Espécie	Referência	Protocolo de criopreservação	Método de TE	Número de TEs	Número de embriões / receptora	Taxa de parição (%)
Bovina	Revisado porHasler, 2014	Congelamento lento	Cirúrgico	586	1-2	71
		Congelamento lento	Não cirúrgico	72		60
	Van Wagtendonk-de Leeuw,1997	Vitrificação	Não cirúrgico	393	1	44.5
		Congelamento lento		335		45.1
Suína	Martinez *et al.*, 2015	SOPS-Vitrificação	Não cirúrgico	33	40	72.7
	Gomis *et al.*, 2012	SOPS-Vitrificação	Não cirúrgico	10	35	50
	Cuello *et al.*, 2005	OPS-Vitrificação	Não cirúrgico	21	20	42.9
Ovina	Bettencourt *et al.*, 2009	OPS-Vitrificação	Laparoscopia	11	2	54.6
		Congelamento lento		19	2	68.4
	Green *et al.*, 2009	OPS-Vitrificação	Laparoscopia	44	1	55.8
		Congelamento lento	Laparoscopia	43	1	38.6
	Papadopoulos *et al.*, 2002	OPS-Vitrificação	Cirúrgico	10	2	50
	Baril *et al.*, 2001	Vitrificação em palheta de 0.25 ml	Cirúrgico	25	2	72
Caprina	Guignot *et al.*, 2006	Congelamento lento	Cirúrgico	26	2	69
		Vitrificação em palheta de 0.25 ml		29	2	48
		OPS-Vitrificação		37	2	22
Equina	Hinrichs, 2012	DM Vitrificação	Não cirúrgico	8	1	75**
	Choi *et al.*, 2011	DM Vitrificação	Não cirúrgico	7	1	71**
	Eldridge-Panuska *et al.*, 2005	Vitrificação em palheta de 0.25 ml	Não cirúrgico	26	1	62*

*TE: transferência de embriões; * Dia 20 de gestação, aproximadamente; ** Em estágio de detecção do batimento cardíaco. OPS:* Open Pulled Straw*; SOPS: OPS Superfina; DM: ponteiras de diâmetro fino, utilizando dimetilsulfóxido.*

Protocolos de descongelamento e aquecimento

Ao contrário dos procedimentos de congelamento lento e vitrificação, os protocolos de descongelamento e aquecimento são muito semelhantes, ambos utilizando altas taxas de aquecimento. Normalmente, os dispositivos para armazenamento de embriões são removidos do nitrogênio líquido e os embriões são colocados em soluções com concentrações decrescentes de sacarose (ou outro açúcar não-permeável), que levam os CPAs a sairem dos embriões através de um gradiente osmótico. O desenvolvimento de métodos eficientes de descongelamento e aquecimento diretos que permitam a transferência direta de embriões, sem remoção de CPAs, é essencial para a utilização de embriões criopreservados em condições de campo. Protocolos de transferência direta foram descritos pela primeira vez para embriões congelados bovinos produzidos *in vivo* (Leibo, 1984). Desde então, estes procedimentos têm sido amplamente utilizados, permitindo a transferência direta de embriões bovinos vitrificados/descongelados com taxas de gestação semelhantes às obtidas após a transferência dos embriões frescos (60%, 3/5; Saha *et al.*, 1996). Atualmente, o principal desafio em bovinos é desenvolver um método de transferência direta para embriões produzidos *in vitro*. Inaba *et al.*, relataram taxas de gestação aceitáveis com embriões bovinos produzidos *in vitro* e vitrificados (44,4%, 09/04; Inaba *et al.*, 2011). Embora não existam dados sobre a taxa de parto, os resultados parecem promissores. Métodos de aquecimento e de transferência direta também foram desenvolvidos para melhorar a taxa de nascimento de embriões vitrificados em suínos (42.9%, 9/21; Cuello *et al.*, 2005; e 50%, 5/10; Gomis *et al.*, 2012), caprinos (56%, 14/25; Guignot *et al.*, 2006) e ovinos (57.1%, 12/21; Green *et al.*, 2009). Além disso, taxas de gestação promissoras também foram obtidas com embriões vitrificados equinos (62%, 16/26; Eldridge-Panuska *et al.*, 2005).

Efeito da criopreservação no embrião: o que vemos e o que não vemos

Alterações celulares

Durante a criopreservação há um risco de danos por fratura, que têm uma incidência mais elevada nos procedimentos de congelamento lento (Kasai *et al.,* 1996). Além disso, a etapa de equilíbrio de qualquer protocolo de criopreservação pode causar um choque osmótico, levando o embrião a contrair . A lesão osmótica pode perturbar o citoesqueleto (Dobrinsky *et al.,* 2000). Despolimerização de microtúbulos e de microfilamentos foram observados após a criopreservação e a vitrificação tradicional de embriões, usando palhetas de 0,25 ml (revisado em Dobrinsky, 1997). Para evitar esse tipo de dano, a utilização de agentes estabilizadores do citoesqueleto tais como citocalasina B foi proposta durante o processo de vitrificação em suínos. No entanto, quando os procedimentos de vitrificação ultra-rápidos foram usados para mórulas e blastocistos criopreservados de suínos, os estabilizadores do citoesqueleto não eram necessários (Tharasanit *et al.,* 2005; Cuello *et al.,* 2010).

O congelamento lento (Fair *et al.,* 2001. Dalcin *et al.,* 2013) e a vitrificação (Fabian *et al.,* 2005; Cuello *et al.,* 2007a; Dalcin *et al.,* 2013; Chrenek *et al.,* 2014) causam mudanças ultraestruturais nos embriões, como a acumulação de detritos celulares, aumento de vesículas e mudanças nas microvilosidades trofoblásticas. A criopreservação também induz distribuição anormal de mitocôndrias, (Nagai *et al.,* 2006), intumescimento, alteração na forma e a ruptura das suas membranas (Cuello *et al.,* 2007a). Recentemente, Dalcin *et al.* (2013) relataram não só alterações morfológicas, mas também perturbação da atividade mitocondrial em embriões congelados e vitrificados. Uma vez que as mitocôndrias são essenciais para o metabolismo aeróbio e produção de ATP no embrião, a adição de glicina como um protetor das mitocôndrias para os meios de vitrificação tem sido proposta para evitar esses efeitos negativos (Zander-Fox *et al.,* 2013).

Apesar de todas estas alterações morfológicas ao nivel celular, se elas forem leves, o embrião é capaz de se regenerar e eliminar as células mortas. Neste caso, a morfologia normal do embrião pode ser quase totalmente restabelecida depois de 24 h de cultivo, sem afetar a viabilidade do embrião (Vajta *et al.,* 1997).

Alterações moleculares

O congelamento lento e a vitrificação afetam a integridade do DNA (Cuello *et al.,* 2005, Fabian *et al.,* 2005, Kader *et al.,* 2009). Considerando- que o aumento da fragmentação de DNA em embriões criopreservados é, em parte, causado por um excesso de radicais livres, a adição de antioxidantes aos meios poderia reduzir este efeito (Hosseini *et al.,* 2009). Embriões criopreservados também apresentam alterações na expressão de vários genes quando comparados com embriões frescos (Mamo *et al.,* 2006; Stinshoff *et al.,* 2011; Shaw *et al.,* 2012). A maior parte destas alterações está relacionada com a homeostase, metabolismo e regulação das atividades celulares e fisiológicas, tais como a proliferação celular, ciclo celular, desenvolvimento, biossíntese, respiração e a expressão de genes relacionados com o estresse (Boonkusol *et al.,* 2006; Mamo *et al.,* 2006; Stokes *et al.,* 2007). Por exemplo, alterações na expressão gênica da Proteína de Choque Térmico A1 e da Proteína Carreadora de Solutos A3 2, que são indicadores de funções de estresse térmico e funções de carreador de soluto, têm sido observadas em embriões congelados/descongelados (Kuzmany *et al.,* 2011; Stinshoff *et al.,* 2011). Parece lógico que os embriões tentem compensar o choque osmótico e as condições de baixa temperatura, alterando seu metabolismo. Esta adaptação e plasticidade geram consequências para o embrião e pouco se sabe sobre o efeito potencial sobre eles e o efeito indireto na descendência (Thompson *et al.,* 2007). Por outro lado, o endométrio, considerado como o sensor final da qualidade e saúde dos embriões, pode distinguir entre embriões frescos e vitrificados (Almiñana *et al.,* 2014), como demonstrado pela expressão gênica alterada no útero em relação à presença de embriões congelados quando, comparado com embriões frescos. Além disso, em coelhos, foi observado que a vitrificação modifica o padrão de expressão de genes e proteínas na placenta após a implantação (Saenz-de-Juanjo *et al.,* 2014).

Além disso, quando as alterações do metabolismo foram monitoradas com relação à captação de piruvato em embriões vitrificados e congelados, os embriões congelados lentamente foram metabolicamente mais afetados do que aqueles que foram vitrificados (Lane, *et al.,* 2002). As pesquisas sugerem que a vitrificação causa menos danos no proteoma e no metabolismo energético do embrião do que o congelamento lento (Varghese *et al.,* 2009).

Associando a alteração na expressão de genes, de proteínas e de metabólitos de embriões criopreservados com a resposta do endométrio que é diferente para embriões congelados e frescos, pode-se explicar as taxas de parição inferiores obtidas com embriões criopreservados quando comparado aos frescos (Papadopoulos *et al.,* 2002; revisado em Hasler *et al.,* 2014).

Efeitos epigenéticos

Existe uma preocupação crescente de que a criopreservação possa induzir marcas epigenéticas e alterações de longo prazo no embrião. Até o momento, existem estudos muito limitados e contraditórios quanto aos possíveis efeitos epigenéticos do processo de criopreservação no embrião. Por um lado, algumas pesquisas têm mostrado que a vitrificação não altera padrões de metilação de genes em blastocistos murinos (Zhao *et al.,* 2012). Por outro, já foi relatado que a

vitrificação aumenta a metilação de genes em embriões bovinos de duas células (Zhao *et al.*, 2012). Além disso, o processo de vitrificação de embriões aumentou significativamente a perda de metilação da região diferencialmente metilado do gene H19 em fetos de camundongo derivados de embriões vitrificados (Wang *et al.*, 2010). A metilação do DNA é uma modificação epigenética chave, essencial para o desenvolvimento embrionário normal. Os complexos padrões de metilação do DNA são estabelecidos e mantidos por DNA metiltransferases (DNMTs). Recentemente, Petrussa *et al.* (2014) relataram que a criopreservação resultou em padrões de expressão alterados de DNMTs em embriões pré-implantação humanos. Estes resultados despertam a necessidade de mais pesquisas para avaliar se esses padrões alterados de expressão das DNMTs em embriões podem levar a consequências em longo prazo para o desenvolvimento do embrião.

Considerações pessoais

O objetivo deste tópico é expor nossas considerações pessoais e os aspectos práticos a serem levados em conta quando a criopreservação de embriões é usada em animais de produção.

Como selecionar os embriões para a criopreservação?

A qualidade é o fator que mais afeta congelabilidade do embrião, e é uma característica difícil ser avaliada objetivamente. A morfologia por estereomicroscopia é a ferramenta mais utilizada para avaliar a qualidade do embrião (Cuello *et al.*, 2007a; Dalcin *et al.*, 2013). Entretanto, atualmente a avaliação de imagens obtidas temporalmente (time-lapse) de embriões pré-implantação têm sido sugeridas como uma ferramentas mais objetivas para a avaliação de embriões. Dados de *time-lapse*, em conjunto com a avaliação tradicional baseada na morfologia dos embriões, podem permitir uma melhor seleção de embriões para criopreservação e subsequente transferência (Conaghan *et al.*, 2013).

Por quanto tempo um embrião pode ser criopreservado?

Tem sido demonstrado em diferentes espécies que o tempo de armazenamento de embriões congelados não tem efeito sobre a sua sobrevivência pós-descongelamento, taxas de implantação, gestação clínica, aborto e nascimento (até 20 anos em humanos: Riggs *et al.*, 2010; até 3 anos em suínos: Sanchez-Osorio *et al.*, 2010; após 15 anos em bovinos: Fang *et al.*, 2014; após 7,5 anos em ovinos: Yao *et al.*, 2012). O armazenamento de embriões criopreservados por um longo período exige temperaturas inferiores a -130ºC, que é a temperatura de transição vítrea da água, e que pode ser facilmente atingida por armazenagem em recipientes de nitrogênio líquido a -196ºC. De fato, Glenister *et al.* (1984), usando camundongos como modelo experimental, salientaram que embriões congelados armazenados em nitrogênio líquido permaneceriam "vivos" por pelo menos 2000 anos. Com base nesses resultados, parece que a principal limitação para o armazenamento de embriões de longo prazo é o custo da grande quantidade necessária de nitrogênio líquido, o espaço de armazenamento e o equipamento para atender a demanda de nitrogênio líquido. O desenvolvimento atual da tecnologia permite o armazenamento de células e gametas no estado liofilizado, poderá, futuramente, superar este inconveniente (Arav, 2014).

Tamanho é importante? Quando ser grande é um problema e ser pequeno é crucial

O tamanho realmente importa quando se trata de criopreservação de embriões. A criopreservação de embriões equinos representa um desafio relacionado com o seu tamanho (revisado em Stout, 2012). Embora a utilização de métodos de congelamento lento e de vitrificação em blastocistos equinos pequenos (<300 µm de diâmetro) foi eficaz, o seu uso em blastocistos expandidos (> 300 µm de diâmetro) produziu resultados ruins após a transferência (Hinrichs, 2012). Acertar o período para a obtenção de blastocistos pequenos em equinos é incerto e este período é limitado a 24 h (Betteridge, 2007). Esta dificuldade técnica torna necessário melhorar a criopreservação de blastocistos expandidos. Os problemas associados com a criopreservação de blastocistos expandidos em equinos parece estar relacionado com o tamanho da blastocele e com a presença da cápsula embrionária (revisado em Stout, 2012; Hinrichs, 2012). Atualmente, tem sido proposta a redução de tamanho do embrião equino por aspiração do conteúdo da blastocele utilizando-se micropipeta “piezo drill” ou laser (Choi *et al.*, 2011; Scherzer *et al.*, 2011). Estes estudos têm relatado resultados promissores sobre as taxas de sobrevivência de embriões, sugerindo que o grande volume de embriões equinos é o principal impedimento para o sucesso da criopreservação.

Mas não só o tamanho dos embriões de equinos que é um desafio, o tamanho da gota de vitrificação também é um aspecto preocupante. Como mencionado acima um volume mínimo é um dos fatores mais importantes para o sucesso da vitrificação, (revisado em Arav, 2014). Assim, manter o volume tão pequeno quanto possível, é uma “obrigação” quando se utiliza qualquer dispositivo de vitrificação.

Gordura é importante? A composição lipídica do embrião

Neste caso, o motivo de preocupação está mais relacionado com o impacto da quantidade de lipídeos no embrião criopreservado. A grande quantidade de gotículas lipídicas no citoplasma do embrião, que é mais

evidente em algumas espécies como suínos, e em embriões produzidos *in vitro* e em estágios iniciais de desenvolvimento, implica em maior sensibilidade dos embriões a injúrias causadas pelo frio. Para superar este problema, a remoção mecânica de lipídeos antes da criopreservação de embriões foi proposta em suínos (Nagashima *et al.*, 1995). No entanto, uma vez que as manipulações que perturbam a zona pelúcida devem ser evitadas, a delipidação parcial por agentes químicos tem sido proposta como uma estratégia mais adequada. Neste sentido, o uso da Forscolina (Homens *et al.*, 2006; Cuello *et al.*, 2013) e L-carnitina (Takahashi *et al.*, 2013) aumentaram a capacidade de criopreservação de embriões iniciais e embriões produzidos *in vitro*.

Criopreservação "à la carte"

Como já foi mencionada, a eficiência de qualquer protocolo de criopreservação é afetada principalmente pela espécie, qualidade do embrião, origem do embrião (*in vivo* ou *in vitro*) e a fase de desenvolvimento. Cada espécie é única em muitos aspectos e, portanto, o que pode funcionar para uma espécie, pode não funcionar para outra. Embora resultados satisfatórios fossem obtidos após a transferência de embriões criopreservados em humanos, camundongos, bovinos, suínos, ovinos e caprinos, resultados ruins foram obtidos em outras espécies domésticas, tais como a equina (Tabela 1). As diferenças na capacidade de criopreservação entre as espécies foram parcialmente atribuídas a diferenças na composição lipídica do embrião. Esta é a razão para o baixo sucesso de congelamento lento em suínos (Polge e Willadsen, 1978; Nagashima *et al.*, 1994). Além disso, embriões de diferentes espécies apresentam características especifica que podem afetar os procedimentos de criopreservação, tal como a cápsula embrionária equina (Hinrichs, 2012) ou a diferente permeabilidade aos CPA (Jin *et al.*, 2011).

Tamanho do embrião, água, teor de lipídios e permeabilidade da membrana plasmática variam não só entre as espécies, mas também entre os diferentes estádios de desenvolvimento nas mesmas espécies, o que afeta o resultado da criopreservação (Agca *et al.*, 1998; Sánchez-Osorio *et al.*, 2008; Jin *et al.*, 2011). Embora a maioria dos estudos de criopreservação de embriões humanos mostrou ligeira ou nenhuma diferença na sobrevivência pós-descongelamento entre embriões congelados nos estádios pronuclear, de clivagem ou de blastocisto (Salumets *et al.*, 2003; Moragianni *et al.*, 2010), estudos demonstraram que a mórula e o blastocisto suínos são superiores para efeitos de vitrificação do que embriões de 2-4 células, com base em taxas de sobrevivência de embriões (Cuello *et al.*, 2007b). Nessa mesma linha, Asgari *et al.*, (2012) observaram que o potencial de embriões bovinos de 5-8 células para sobreviverem à vitrificação e para se desenvolverem até o estádio de blastocisto foi significativamente mais baixo em comparação aos embriões vitrificados de 8-16 células e embriões em fase de mórula. As diferenças na capacidade de criopreservação foram também observadas em função da origem embrionária (*in vivo* vs *in vitro*). A elevada sensibilidade à ao resfriamento e congelamento de embriões *in vitro* tem sido associada ao seu elevado teor de lipídios (Romek *et al.*, 2009) e a sua qualidade inferior (revisado em Rizos *et al.*, 2008) em comparação com embriões produzidos *in vivo*.

Até a presente data, o protocolo perfeito para criopreservação de embriões ainda não foi estabelecido. Uma triagem preliminar deve ser feita para cada espécie de interesse e para a característica embrionária (estágio de desenvolvimento, origem, etc) para posteriormente selecionar as melhores condições de criopreservação para aquele embrião. Assim, propomos que usar um protocolo de criopreservação "à la carte" pode, em diferentes situações, nos levar aos melhores resultados.

Agradecimentos

Agradecemos ao professor Emilio A. Martinez por sua leitura e parecer construtivo sobre este manuscrito. Este trabalho foi apoiado pela UE no the Marie-Curie FP7 COFUND People Programme, através da disponibilização de uma bolsa AgreenSkills, programa AgreenSkills: projeto no 267196; o MINECO-FEDER / AGL2012-38621, Madrid (Espanha) e da Fundación Séneca / GERM 04543/07, Murcia (Espanha).

Referências

Agca Y, Monson RL, Northey DL, Mazni OA, Schaefer DM, Rutledge JJ. 1998. Transfer of fresh and cryopreserved IVP bovine embryos: normal calving, birth weight and gestation lengths. *Theriogenology*, 50:147-162.

Alminana C, Caballero I, Cuello C, Parrilla I, Gil MA, Gomis J, Angel MA, Sanchez-Osorio J, del Olmo D, Lucas X, Vazquez JM, Vazquez JL, Fazeli A, Roca J, Martinez EA. 2013. The pig uterus distinguishes between vitrified and fresh embryos. *Reprod Domest Anim*, 48(suppl.1):106. (abstract).

Arav A. 2014. Cryopreservation of oocytes and embryos. *Theriogenology*, 81:96-102.

Asgari V, Hosseini SM, Forouzanfar M, Hajian M, Nasr-Esfahani MH. 2012. Vitrification of in vitro produced bovine embryos: effect of embryonic block and developmental kinetics. *Cryobiology*, 65:278-83.

Barfield JP, McCue PM, Squires EL, Seidel GE Jr. 2009. Effect of dehydration prior to cryopreservation of large equine embryos. *Cryobiology*, 59:36-41.

Baril G, Traldi AL, Cognié Y, Leboeuf B, Beckers JF, Mermillod P. 2001. Successful direct transfer of vitrified sheep embryos. *Theriogenology*, 56:299-305.

Bettencourt EM, Bettencourt CM, Chagas e Silva J, Ferreira P, Pereira Matos C, Romão RJ, Rocha A. 2009. Fertility rates following the transfer of ovine embryos cryopreserved using three protocols. *Small*

Rumin Res, 82:112-116.

Betteridge KJ. 2007. Equine embryology: an inventory of unanswered questions. *Theriogenology*, 68:9-21.

Boonkusol D, Gal AB, Bodo S, Gorhony B, Kitiyanant Y, Dinnyes A. 2006. Gene expression profiles and in vitro development following vitrification of pronuclear and 8-cell stage mouse embryos. *Mol Reprod Dev*, 73:700-708.

Choi YH, Velez IC, Riera FL, Roldán JE, Hartman DL, Bliss SB, Blanchard TL, Hayden SS, Hinrichs K. 2011. Successful cryopreservation of expanded equine blastocysts. *Theriogenology*, 76:143-52.

Chrenek P, Makarevich AV, Popelková M, Schlarmannová J, Toporcerová S, Ostró A, Zivčák J, Bosze Z. 2014. Ultrastructure of vitrified rabbit transgenic embryos. *Zygote*, 22:558-564.

Conaghan J, Chen AA, Willman SP, Ivani K, Chenette PE, Boostanfar R, Baker VL, Adamson GD, Abusief ME, Gvakharia M, Loewke KE, Shen S. 2013. Improving embryo selection using a computer-automated time-lapse image analysis test plus day 3 morphology: results from a prospective multicenter trial. *Fertil Steril*, 100:412-419.

Cuello C, Berthelot F, Martinat-Botté F, Venturi E, Guillouet P, Vázquez JM, Roca J, Martínez EA. 2005. Piglets born after non-surgical deep intrauterine transfer of vitrified blastocysts in gilts. *Anim Reprod Sci*, 85:275-286.

Cuello C, Berthelot F, Delaleu B, Venturi E, Pastor LM, Vazquez JM, Roca J, Martinat-Botté F, Martinez EA. 2007a. The effectiveness of the stereomicroscopic evaluation of embryo quality in vitrified-warmed porcine blastocysts: an ultrastructural and cell death study. *Theriogenology*, 67:970-982.

Cuello C, Gil MA, Almiñana C, Sánchez-Osorio J, Parrilla I, Caballero I, Vázquez JM, Roca J, Rodríguez-Martínez H, Martínez EA. 2007b. Vitrification of *in vitro* cultured porcine two-to-four cell embryos. *Theriogenology*, 68:258-264.

Cuello C, Sanchez-Osorio J, Almiñana C, Gil MA, Parrilla I, Roca J, Vazquez JM, Martinez EA, Rodriguez-Martinez H. 2010. Superfine open pulled straws vitrification of porcine blastocysts does not require pretreatment with cytochalasin B and/or centrifugation. *Reprod Fertil Dev*, 22:808-817.

Cuello C, Gomis J, Almiñana C, Maside C, Sanchez-Osorio J, Gil MA, Sánchez A, Parrilla I, Vazquez JM, Roca J, Martinez EA. 2013. Effect of MEM vitamins and forskolin on embryo development and vitrification tolerance of *in vitro*-produced pig embryos. *Anim Reprod Sci*, 136:296-302.

Dalcin L, Silva RC, Paulini F, Silva BD, Neves JP, Lucci CM. 2013. Cytoskeleton structure, pattern of mitochondrial activity and ultrastructure of frozen or vitrified sheep embryos. *Cryobiology*, 67:137-145.

Dobrinsky JR. 1997. Cryopreservation of pig embryos. *J Reprod Fertil Suppl*, 52:301-312.

Dobrinsky JR, Pursel VG, Long CR, Johnson LA. 2000. Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. *Biol Reprod*, 62:564-70.

Eldridge-Panuska WD, Caracciolo di Brienzab V, Seidel Jr GE , Squiresa EL , Carnevalea EM. 2005. Establishment of pregnancies after serial dilution or direct transfer by vitrified equine embryos. *Theriogenology*, 63:1308-1319.

Emiliani S, Van den Bergh M, Vannin AS, Biramane J, Englert Y. 2000. Comparison of ethylene glycol, 1,2-propanediol and glycerol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes, 4-cell embryos and blastocysts. *Hum Reprod*, 15:905-910.

Fabian D, Gjorret JO, Berthelot F, Martinat-Botte´ F, Maddox-Hyttel P. 2005. Ultrastructure and cell death of *in vivo* derived and vitrified porcine blastocysts. *Mol Reprod Dev*, 70:155-165.

Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA, Meryman HT. 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*, 21:407-426.

Fahy, GM, Rall, WF. 2007. Vitrification: an overview. In: Liebermann J, Tucker MJ (Ed.). *Vitrification in Assisted Reproduction: a User's Manual and Troubleshooting Guide*. Boca Raton, FL: CRC Press. pp. 21-32.

Fair T, Lonergan P, Dinnyes A, Cottell DC, Hyttel P, Ward FA, Boland MP. 2001. Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: effect of method of blastocyst production. *Mol Reprod Dev*, 58:186-189.

Fang Y, Zeng S,Fu X, Jia B, Li S, An X, Chen Y, Zhu S. 2014. Developmental competence *in vitro* and *in vivo* of bovine IVF blastocyst after 15 years of vitrification. *Cryo Lett*, 35:232-238.

Glenister PH, Whittingham DG, Lyon MF. 1984. Further studies on the effect of radiation during the storage of frozen 8-cell mouse embryos at -196 degrees C. *J Reprod Fertil*, 70:229-234.

Gomis J, Cuello C, Sanchez-Osorio J, Gil MA, Parrilla I, Algel MA, Maside C, Del Olmo D, Vazquez JM, Roca J, Martinez EA. 2012. Non-surgical deep intrauterine transfer of superfine open pulled Straw (SOPS)-vitrified porcine embryos: evaluation of critical steps of the procedure. *Theriogenology*, 78:1339-1349.

Green RE, Santos BF, Sicherle CC, Landim-Alvarenga FC, Bicudo SD. 2009. Viability of OPS vitrified sheep embryos after direct transfer. *Reprod Domest Anim*, 44:406-410.

Guignot F, Bouttier A, Baril G, Salvetti P, Pignon P, Beckers JF, Touzé JL, Cognié J, Traldi AS, Cognié Y, Mermillod P. 2006. Improved vitrification method allowing direct transfer of goat embryos. *Theriogenology*, 66:1004-1011.

Hasler JF. 2010. Synthetic media for culture, freezing and vitrification of bovine embryos. *Reprod Fertil Dev*, 22:119-125.

Hasler JF. 2014. Forty years of embryo transfer in cattle: a review focusing on the journal Theriogenology, the growth of the industry in North America, and personal reminisces. *Theriogenology*, 81:152-69.

Hinrichs K. 2012. Assisted reproduction techniques in

the horse. *Reprod Fertil Dev*, 25:80-93.

Hosseini SM, Forouzanfar M, Hajian M, Asgari V, Abedi P, Hosseini L, Ostadhosseini S, Moulavi F, Safahani Langrroodi M, Sadeghi H, Bahramian H, Eghbalsaied Sh, Nasr-Esfahani MH. 2009. Antioxidant supplementation of culture medium during embryo development and/or after vitrification-warming; which is the most important? *J Assist Reprod Genet*, 26:355-364.

Inaba Y, Aikawa Y, Hirai T, Hashiyada Y, Yamanouchi T, Misumi K, Ohtake M, Somfai T, Kobayashi S, Saito N, Matoba S, Konishi K, Imai K. 2011. In-straw cryoprotectant dilution for bovine embryos vitrified using cryotop. *J Reprod Dev*, 57:437-443.

International Embryo Transfer Society (IETS). 2014. 2013 statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. Available on: http://www.iets.org/pdf/comm_data/December2014.pdf.

Ishimori H, Takahashi Y, Kanagawa H. 1992. Viability of vitrified mouse embryos using various cryoprotectant mixture. *Theriogenology*, 37:481-487.

Jin B, Kawai Y, Hara T, Takeda S, Seki S, Nakata Y, Matsukawa K, Koshimoto C, Kasai M, Edashige K. 2011. Pathway for the movement of water and cryoprotectants in bovine oocytes and embryos. *Biol Reprod*, 85:834-847.

Kader A, Agarwal A, Abdelrazik H, Sharma RK, Ahmady A, Falcone T. 2009. Evaluation of post-thaw DNA integrity of mouse blastocysts after ultrarapid and slow freezing. *Fertil Steril*, 91:2087-2094.

Kasai M, Zhu SE, Pedro PB, Nakamura K, Sakurai T, Edashige K. 1996. Fracture damage of embryos and its prevention during vitrification and warming. *Cryobiology*, 33:459-464.

Kasai M, Mukaida T. 2004. Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. *Reprod BioMed Online*, 9:164-170.

Kim YM, Uhma SJ, Gupta MK, Yanga JS, Limd JG, Dasb ZC, Heod YT, Chunge HJ, Kongf IK, Kimd NH, Leeb HT, Koa DH. 2012. Successful vitrification of bovine blastocysts on paper container. *Theriogenology*, 78:1085–1093.

Kingma SE, Thibault ME, Betteridge KJ, Schlaf M, Gartley CJ, Chenier TS. 2011. Permeability of the equine embryonic capsule to ethylene glycol and glycerol *in vitro*. *Theriogenology*, 76:1540-1551.

Kuzmany A, Havlicek V, Wrenzycki C, Wilkening S, Brem G, Besenfelder U. 2011. Expression of mRNA, before and after freezing, in bovine blastocysts cultured under different conditions. *Theriogenology*, 75:482-494.

Lane M, Maybach JM, Gardner DK. 2002. Addition of ascorbate during cryopreservation stimulates subsequent embryo development. *Hum Reprod*, 17:2686-2693.

Leibo SP. 1984. A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*, 21:767-790.

Leibo SP, Songsasen N. 2002. Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. *Theriogenology*, 57:303-326.

Liebermann J, Nawroth F, Isachenko V, Isachenko E, Rahimi G, Tucker MJ. 2002. Potential importance of vitrification in reproductive medicine. *Biol Reprod*, 67:1671-1680.

Liu J, Phy E, Yeomans E. 2012. Theoric considerations regarding slow cooling and vitrification during cryopreservation. *Theriogenology*, 78:1641-1652.

Mamo S, Bodo S, Kobolak J, Polgar Z, Tolgyesi G, Dinnyes A. 2006. Gene expression profiles of vitrified *in vivo* derived 8-cell stage mouse embryos detected by high density oligonucleotide microarrays. *Mol Reprod Dev*, 73:1380-1392.

Martinez EA, Martinez CA, Nohalez A, Sanchez-Osorio J, Vazquez JM, Roca J, Parrilla I, Gil MA, Cuello C. 2015. Nonsurgical deep uterine transfer of vitrified, *in vivo*-derived, porcine embryos is as effective as the default surgical approach. *Scient Rep*, 5:10587.

Matsunari H, Maehara M, Nakano K, Ikezawa Y, Hagiwara Y, Sasayama N, Shirasu A, Ohta H, Takahashi M, Nagashima H. 2012. Hollow fiber vitrification: a novel method for vitrifying multiple embryos in a single device. *J Reprod Dev*, 58:599-608.

Mazur P. 2004. Principles of cryobiology. *In*: Fuller BJ, Lane N, Benson EE (Ed.). *Life in the Frozen State*. Boca Raton, FL: CRC Press. pp. 3-65.

Men H, Agca Y, Riley LK, Critser JK. 2006. Improved survival of vitrified porcine embryos after partial delipation through chemically stimulated lipolysis and inhibition of apoptosis. *Theriogenology*, 66:2008-2016.

Moragianni VA, Cohen JD, Smith SE, Schinfeld JS, Somkuti SG, Lee A, Barmat LI. 2010. Outcomes of day-1, day-3, and blastocyst cryopreserved embryo transfers. *Fertil Steril*, 93:1353-1355.

Nagai S, Mabuchi T, Hirata S, Shoda T, Kasai T, Yokota S, Shitara H, Yonekawa H, Hoshi K. 2006. Correlation of abnormal mitochondrial distribution in mouse oocytes with reduced developmental competence. *Tohoku J Exp Med*, 210:137-144.

Nagashima H, Kashiwazaki N, Ashman RJ, Grupen CG, Seamark RF, Nottle MB. 1994. Removal of cytoplasmic lipid enhances the tolerance of porcine embryos to chilling. *Biol Reprod*, 51:618-622.

Nagashima H, Kashiwazaki N, Ashman RJ, Grupen CG, Nottle MB. 1995. Cryopreservation of porcine embryos. *Nature*, 30;374(6521):416.

Palasz AT, Mapletoft RJ. 1996. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnol Adv*, 14:127-149.

Papadopoulos S, Rizos D, Duffy P, Wade M, Quinn K, Boland MP, Lonergan P. 2002. Embryo survival and recipient pregnancy rates after transfer of fresh or vitrified, *in vivo* or *in vitro* produced ovine blastocysts. *Anim Reprod Sci*, 74:35-44

Petrussa L, Van de Velde H, De Rycke M. 2014.

Dynamic regulation of DNA methyltransferases in human oocytes and preimplantation embryos after assisted reproductive technologies. *Mol Hum Reprod*, 20:861-874.

Polge C, Willadsen SM. 1978. Freezing eggs and embryos of farm animals. *Cryobiology*, 15:370-373.

Pyne DG, Liu J, Abdelgawad M, Sun Y. 2014. Digital microfluidic processing of mammalian embryos for vitrification. *PLoS One*, 9:e108128.

Rall WF, Fahy GM. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature*, 313(6003):573-575.

Riggs R, Mayer J, Dowling-Lacey D, Chi TF, Jones E, Oehninger S. 2010. Does storage time influence postthaw survival and pregnancy outcome? An analysis of 11,768 cryopreserved human embryos. *Fertil Steril*, 93:109-115.

Rizos D, Clemente M, Bermejo-Alvarez P, De La Fuente J, Lonergan P, Gutiérrez-Adán A. 2008. Consequences of *in vitro* culture conditions on embryo development and quality. *Reprod Domest Anim*, 43:44-50.

Romek M, Gajda B, Krzysztofowicz E, Smorag Z. 2009. Lipid content of non-cultured and cultured pig embryo. *Reprod Domest Anim*, 44:24-32.

Saenz-de-Juanjo MD, Marco-Jimenez F, Schmaltz-Panneau B, Jimenez-Trigos E, Viudes-de-Castro MP, Peñaranda DS, Jouneau L, Lecardonnel J, Lavara R, Naturil-Alfonso C, Duranthon V, Vicente JS. 2014. Vitrification alters rabbit foetal placenta at transcriptomic and proteomic level. *Reproduction*, 147:789-801.

Saha S, Otoi T, Takagi M, Boediono A, Sumantri C, Suzuki T. 1996. Normal calves obtained after direct transfer of vitrified bovine embryos using ethylene glycol, trehalose, and polyvinylpyrrolidone. *Cryobiology*, 33:291-299.

Salumets A, Tuuri T, Mäkinen S, Vilska S, Husu L, Tainio R, Suikkari AM. 2003. Effect of developmental stage of embryo at freezing on pregnancy outcome of frozen-thawedembryo transfer. *Hum Reprod*, 18:1890-1895.

Sanchez-Osorio J, Cuello C, Gil MA, Almiñana C, Parrilla I, Caballero I, Garcia EM, Vazquez JM, Roca J, Martinez EA. 2008. Factors affecting the success rate of porcine embryo vitrification by the Open Pulled Straw method. *Anim Reprod Sci*, 108:334-344.

Sanchez-Osorio J, Cuello C, Gil MA, Parrilla I, Maside C, Almiñana C, Lucas X, Roca J, Vazquez JM, Martinez EA. 2010. Vitrification and warming of *in vivo*-derived porcine embryos in a chemically defined medium. *Theriogenology*, 73:300-308.

Saragusty J, Arav A. 2011. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction* 141:1-19.

Scherzer J, Davis C, Hurley DJ. 2011. Laser-assisted vitrification of large equine embryos. *Reprod Domest Anim*, 46:1104-1106.

Shaw L, Sneddon SF, Brison DR, Kimber SJ. 2012. Comparison of gene expression in fresh and frozen-thawed human preimplantation embryos. *Reproduction*, 144:569-582.

Stinshoff H, Wilkening S, Hanstedt A, Brüning K, Wrenzycki C. 2011. Cryopreservation affects the quality of *in vitro* produced bovine embryos at the molecular level. *Theriogenology*, 76:1433-1441.

Stokes PJ, Hawkhead JA, Fawthrop RK, Picton HM, Sharma V, Leese HJ, Houghton FD. 2007. Metabolism of human embryos following cryopreservation: implications for the safety and selection of embryos for transfer in clinical IVF. *Hum Reprod*, 22:829-835.

Stout TA. 2012. Cryopreservation of equine embryos: current state-of-the-art. *Reprod Domest Anim*, 47:84-89.

Takahashi T, Inaba Y, Somfai T, Kaneda M, Geshi M, Nagai T, Manabe N. 2013. Supplementation of culture medium with L-carnitine improves development and cryotolerance of bovine embryos produced *in vitro*. *Reprod Fertil Dev*, 25:589-599.

Tharasanit T, Colenbrander B, Stout TA. 2005. Effect of cryopreservation on the cellular integrity of equine embryos. *Reproduction*, 129:789-798.

Thompson JG, Mitchell M, Kind KL. 2007. Embryo culture and long-term consequences. *Reprod Fertil Dev*, 19:43-52.

Vajta G, Hyttel P, Callesen H. 1997. Morphological changes of in-vitro-produced bovine blastocysts after vitrification, in-straw direct rehydration, and culture. *Mol Reprod Dev*, 48:9-17.

Vajta G. 2000. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim Reprod Sci*, 60/61:357-364.

Vajta G. 2013. Vitrification in human and domestic animal embryology: work in progress. *Reprod Fertil Dev*, 25:719-27.

Van Wagtendonk-de Leeuw AM, Den Daas JH, Rall WF. 1997. Field trial to compare pregnancy rates of bovine embryo cryopreservation methods: vitrification and one-step dilution versus slow freezing and three-step dilution. *Theriogenology*, 48:1071-1084.

Varghese AC, Nagy ZP, Agarwal A. 2009. Current trends, biological foundations and future prospects of oocyte and embryo cryopreservation. *Reprod Biomed Online*, 19:126-140.

Vicente JS, Garcia-Ximenez F. 1994. Osmotic and cryoprotective effects of a mixture of DMSO and ethylene glycol on rabbit morulae. *Theriogenology*, 42:1205-1215.

Wang Z, Xu L, He F. 2010. Embryo vitrification affects the methylation of the H19/Igf2 differentially methylated domain and the expression of H19 and Igf2. *Fertil Steril*, 93:2729-2733.

Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C. *Science*, 27(178): 411-414.

Yao YC, Qi MY, Lu MH, Wang SM, Li W, Han HB. 2012. Long-term cryopreservation had no adverse effect on viability of embryos and their offspring insheep. *Anim Reprod Sci*, 136:42-46.

Youngs CR, Leibo SP, Godke RA. 2011. Embryo

cryopreservation in domestic mammalian livestock species. *In*: Hemming D (Ed). *Animal Science Review*. Oxfordshire, UK: CABI. pp. 245-256.

Zander-Fox D,Cashman KS, Lane M. 2013. The presence of 1 mM glycine in vitrification solutions protects oocyte mitochondrial homeostasis and improves blastocyst development. *J Assist Reprod Genet*, 30:107-116.

Zhao XM, Du WH, Hao HS, Wang D, Qin T, Liu Y, Zhu HB. 2012. Effect of vitrification on promoter methylation and the expression of pluripotency and differentiation genes in mouse blastocysts. *Mol Reprod Dev*, 79:445-50.

Programação fetal durante o período pré-implantacional: podemos explorar este evento para melhorar a função pós-natal em bovinos?

P.J. Hansen[1]

Department of Animal Sciences, D.H. Barron Reproductive and Perinatal Biology Research Program, and Genetics Institute, University of Florida, Gainesville, FL, USA.

Resumo

O conceito de programação do feto determina que a função de um animal adulto depende das condições ambientais as quais este foi exposto antes do nascimento. A programação do desenvolvimento pode ocorrer durante o período pré-implantação. Por conseguinte, certos sinais ambientais, agindo sobre a mãe (em gestações estabelecidas *in vivo*) ou diretamente sobre o embrião (em embriões cultivados), podem programar o desenvolvimento do embrião pré-implantacional, gerando efeitos sobre a vida pós-natal. Propõe-se que a investigação sobre a programação do desenvolvimento em bovinos poderia conduzir não só à eliminação de resultados adversos associados com a produção *in vitro* de embriões, mas também à descoberta de abordagens para produzir um animal vivo com perspectivas superiores para alcançar uma produção ótima em períodos subsequentes da vida.

Palavras chave: programação de desenvolvimento, ambiente, produção animal, embrião pré-implantacional.

Introdução

Programação do embrião no período pré-implantação - uma fronteira raramente visitada pelo cientista

Tem sido um objetivo de longa data dos pesquisadores planejar meios para melhorar a eficiência com que os animais, que são importantes do ponto de vista da pecuária, gerem produtos úteis para o homem. Mais comumente, o aumento da produção tem sido conseguido através de uma combinação de seleção de genes que são ótimos para a produção, e pelo fornecimento de um ambiente que maximiza a oportunidade para aqueles genes sejam expressos. Assim, por exemplo, o aumento da produção de leite em raças leiteiras como a Holandesa e a Jersey depende da seleção intensiva e acurada de genes que conferem às fêmeas a capacidade de produzir grandes quantidades de leite, bem como o fornecimento de nutrientes, habitação e outras condições ambientais que otimizam a produção de leite.

As funções de um animal adulto dependem não só do ambiente ao qual ele foi exposto após o nascimento, mas também das condições ambientais as quais ele foi exposto antes do nascimento. Este conceito, que tem sido denominado programação de desenvolvimento, programação fetal ou origens desenvolvimentais da saúde e da doença, tem sido documentado não apenas em mamíferos (Roseboom *et al.*, 2001; Ganu *et al.*, 2012; Walker e Ho, 2012; Fleming *et al.*, 2015), mas também em anfíbios (Berg *et al.*, 2009), répteis (Schwanz*et al.*, 2013) e peixes (Meier *et al.*, 2010; Celeghin *et al.*, 2011). Em mamíferos, o ambiente do concepto é estabelecido pela mãe e mudanças no ambiente materno pode alterar o fenótipo pós-natal do organismo em desenvolvimento.

A função pós-natal pode ser programada por alterações no ambiente materno durante toda a duração da gestação, tão cedo quanto o período pré-implantação (Kwong *et al.*, 2000; Calle *et al.*, 2012) e tão tarde quanto os estágios finais da gestação (Li *et al.*, 2013;Tao *et al.*, 2014; Master *et al.*, 2015). De fato, há evidências experimentais de que alterações na função parental afetando gametas masculinos (Lane *et al.*, 2014; Master *et al.*, 2015) podem influenciar o fenótipo pós-natal da prole.

Aqueles que trabalham com o embriões produzidos *in vitro* (PIV) são bem conscientes de que um ambiente inadequado durante o período pré-implantação pode alterar negativamente o resultado de desenvolvimento do embrião. Algumas das consequências específicas de exposição do embrião a um ambiente de cultivo inadequado serão detalhadas em uma seção posterior. Nem todos os eventos de programação durante o período pré-implantação são prejudiciais, no entanto. Apesar da evidência ser incompleta, hipotetiza-se que certos sinais ambientais, agindo sobre a mãe (em gestações estabelecidos *in vivo*) ou diretamente sobre o embrião (para gestações *estabelecidas in vitro*), podem programar o desenvolvimento do embrião pré-implantação, gerando efeitos benéficos na vida pós-natal. O objetivo deste artigo é incentivar a investigação dirigida para esta hipótese, porque, se for verdade, tanto o manejo ao qual o animal é submetido quanto a produção do embrião terão novas ferramentas para otimizar a produção animal.

Lições do camundongo sobre a programação do desenvolvimento no período pré-implantação

O camundongo tem sido a espécie dominantemente usada para provar a idéia de que

[1]Autor correspondente: Hansen@animal.ufl.edu

mudanças no ambiente materno durante o período pré-implantação podem alterar o desenvolvimento do embrião de uma maneira que altera o fenótipo pós-natal. O melhor exemplo é estudado para crias nascidas de mães que foram alimentadas com uma dieta de baixa proteína durante os primeiros 3,5 dias de gestação (ou seja, durante o período de formação dos blastocistos). Um exemplo dos resultados representativos encontrados é mostrado na Fig. 1. Como para muitos outros casos de programação do desenvolvimento, as consequências da gestação em uma mãe alimentada com uma dieta de baixa proteína durante o período de pré-implantação dependem do sexo do embrião. Crias fêmeas de fêmeas alimentados com uma dieta baixa em proteínas tiveram um aumento de peso corporal (Watkins *et al.*, 2008, 2011), diminuição da razão entre o peso do coração para o peso corporal (Watkins *et al.*, 2008), expressão mais elevada *INSR* e de *IGF1R* na gordura retroperitoneal (Watkins *et al.*, 2011), e respostas comportamentais alteradas (Watkins *et al.*, 2008). A prole masculina exibiu resposta vasodilatadora atenuada nas artérias mesentéricas (Watkins *et al.*, 2010). Para ambos os sexos, a gestação em mães alimentadas com uma dieta baixa em proteínas durante o período de pré-implantação resultou num aumento da pressão sanguínea sistólica (Watkins *et al.*, 2008, 2011), valores elevados de enzima conversora de angiotensina no pulmão (Watkins *et al.*, 2010), e menor expressão de *UCP1* na gordura retroperitoneal (Watkins *et al.*, 2011).

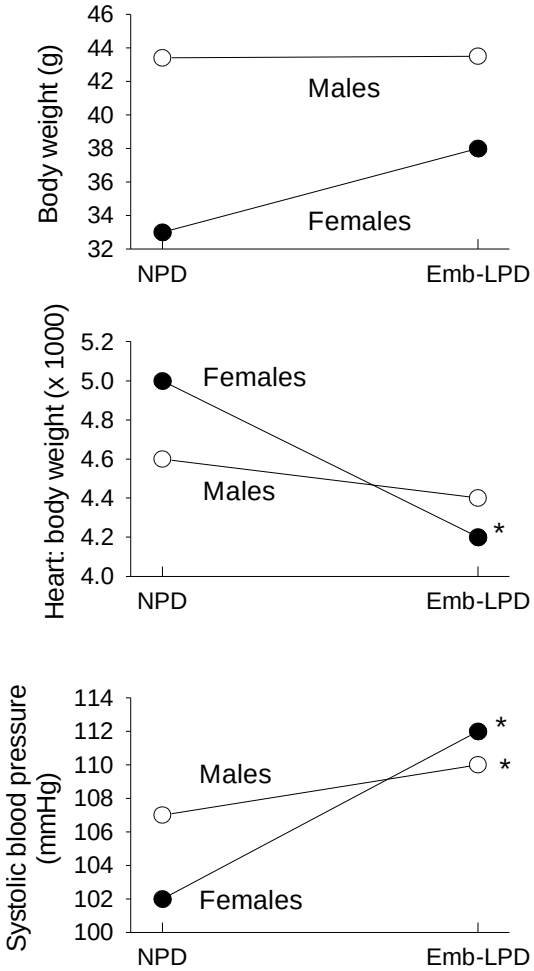

Figura 1. Programação fetal em camundongos, causada pela nutrição materna de proteína no período pré-implantação. Camundongas foram alimentadas com uma dieta contendo 18% de caseína durante a gestação (dieta da proteína normal; NPD) ou com uma dieta contendo 9% de caseína, do período do acasalamento até dia 3,5 da gestação e, em seguida, alimentadas com uma dieta de caseína 18% (embrião dieta de baixa proteína; Emb-LPD). Na figura são apresentados os dados sobre a progênie, machos (círculos abertos) e de fêmeas (círculos fechados) aos 21 dias de vida. Os asteriscos representam efeitos significativos de Emb-LPD (P <0,05). Nota-se que, enquanto os efeitos sobre o peso corporal aos 21 dias não foram significativos, fêmeas Emb-LPD eram significativamente mais pesadas do que as fêmeas NPD em outros momentos examinados (resultados não mostrados). Dados de Watkins *et al.* (2008).

Outros eventos maternos durante o período pré-implantação que foram relatados por afetar o fenótipo pós-natal em camundongos são o desafio a lipopolissacarídeo (LPS - Williams *et al.*, 2011) e o

acasalamento da fêmea com machos dos quais as vesículas seminais foram removidas cirurgicamente (Bromfield *et al.*, 2014). Para esses estímulos, também, as alterações na função pós-natal dependeram do sexo. Por exemplo, os machos nascidos de fêmeas acasaladas com machos submetidos à remoção das vesículas seminais eram mais gordos do que os machos de controle, porém não houve efeito sobre a adiposidade para o sexo feminino (Bromfield *et al.*, 2014).

É possível que os eventos maternos durante o período pré-implantação não reflitam em alterações da função embrionária diretamente, mas sim em alterações na fisiologia materna que afetam o concepto mais tarde na gestação. Este não é o caso para a alimentação com baixa proteína ou para o cruzamento com machos sem vesícula seminal porque as alterações no fenótipo pós-natal permanecem quando embriões são recuperados a partir de fêmeas afectadas e transferidos para receptoras controle (Watkins *et al.*, 2008; Bromfield *et al.*, 2014). Pelo menos algumas das alterações no desenvolvimento do concepto causadas por alimentação com baixa proteína ou acasalamento com machos sem vesícula seminal provavelmente são causadas pela função alterada da placenta porque ambos os tratamentos alteraram o crescimento placentário (Bromfield *et al.*, 2014; Watkins *et al.*, 2015) e, para alimentação com baixa proteína, a função do trofectoderma (Sun *et al.*, 2014) e do endoderma primitivo (Watkins *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2015). Alterações adicionais na função da placenta são mudanças na expressão gênica e metilação do DNA de *GATA6* em corpos embrióides tipo endoderme primitivo derivadas de embriões coletados de mães alimentadas com dietas de baixa proteína (Sun *et al.*, 2015).

Conjuntamente, a lição a partir do camundongo é que as alterações no ambiente materno durante o período de pré-implantação podem alterar o desenvolvimento subsequente de uma forma dependente do sexo, que resulta numa alteração no fenótipo na vida adulta.

O embrião produzido *in vitro* – uma ocasional vítima da programação fetal

Há muitas alterações na função embrionária associada à PIV. Estas incluem modificações na morfologia (Crosier *et al.*, 2001; Rizos *et al.*, 2002a), expressão gênica (Driver *et al.*, 2012, criotolerância (Enright *et al.*, 2000; Al-Katanani *et al.*, 2002) e competência para estabelecer a gestação após a transferência para fêmeas (Pontes *et al.*, 2009; Siqueira *et al.*, 2009). Pelo menos alguns destes defeitos são causadas pelo ambiente de cultivo durante o período pré-implantação, e não por problemas derivados do oócito ou induzidos no processo de fertilização. A transferência de embriões PIV para a tuba uterina de ovelhas melhorou a sobrevivência após a criopreservação (Rizos *et al.*, 2002c) e resultou em expressão gênica mais semelhante à dos embriões produzidos *in vivo* (Rizos *et al.*, 2002b).

O embrião PIV bovino também pode detectar alterações no desenvolvimento em um periodo mais tarde na gestação, como indicado pela ocorrência de alteração de crescimento fetal (Farin *et al.*, 2006), perda de *imprinting* (Chen *et al.*, 2015), e um aumento da mortalidade neonatal (Bonilla et al ., 2014). Claramente, então, o embrião produzido *in vitro* pode experimentar programação anormal do desenvolvimento.

O que não está claro em bovinos é se as consequências da PIV se estendem até o período pós-natal. Em um único estudo que examinou esta questão, usando um pequeno número de animais, não havia nenhuma diferença entre bezerras produzidas por PIV com bezerras produzidas por meio de inseminação artificial em termos de crescimento, idade ao primeiro serviço, porcentagem de novilhas gestantes no primeiro serviço, ou produção de leite ou composição de leite nos primeiros 120 dias da primeira lactação (Bonilla *et al.*, 2014). No entanto, os resultados de embriões produzidos *in vitro* em camundongos e humanos são indicativos de que a questão deve ser examinada mais de perto. Assim, em camundongos, a alteração das condições de cultivo pode causar alterações dependentes do sexo no fenótipo adulto (Fernández-Gonzalez *et al.*, 2004; Sjöblom *et al.*, 2005; Serrano *et al.*, 2014.). Resultados em humanos são mais difíceis de interpretar por causa da alta quantidade de casais mais velhos e mais inférteis como pais de crianças derivadas de fertilização in vitro (FIV), em comparação com as crianças de concepções naturais. Com esta ressalva em mente, é importante notar que há relatos de um grupo de crianças holandesas provenientes de gestação única com idades entre 8-18 anos que derivaram de FIV que foram associadas com aumento de gordura corporal (Ceelen *et al.*, 2007), de pressão arterial sistólica e diastólica (Ceelen *et al.*, 2008), e de concentrações de glicose em jejum (Ceelen *et al.*, 2008). Em outro estudo com crianças suíças produzidas por gestacão de único concepto, Scherrer *et al.* (2012) encontraram evidências de disfunção vascular para as crianças nascidas depois de IVF ou injeção intracitoplasmática de espermatozóide (idade média de 11 anos), em comparação com aqueles que nasceram após a concepção natural (idade média de 13 anos). Não foram observadas diferenças no peso corporal ou gordura, concentrações de lípido, de glicose ou de insulina, tolerância à glicose ou resistência à glicose em circulação (Scherrer *et al.*, 2012).

Infelizmente, poucos experimentos com embriões PIV em bovinos monitoraram a gestação a termo ou verificaram a função resultante da progênie durante períodos mais tardios da vida. Esta omissão deveria ser corrigida sempre que possível, pois é possível que haja consequências negativas da PIV sobre a saúde pós-natal, crescimento, reprodução ou lactação. Pode até ser que existam condições específicas de cultivo utilizados para PIV que têm efeitos benéficos sobre as funções fisiológicas específicas importantes

para a produção otimizada.

Alterações no ambiente materno durante o período periconcepcional podem mudar fenótipo adulto em ruminantes - lições das ovelhas

O fato de que o desenvolvimento do feto na vaca pode ser prejudicado em função da PIV (Farin *et al.*, 2006; Bonilla *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2015) é indicativo de que a programação do desenvolvimento pré-implantação pode ocorrer em bovinos. Até o momento, no entanto, não há relatos em bovinos abordando se a alteração de ambiente materno durante o período pré-implantação também pode modificar as características no período pós-natal da prole. Os resultados de outro ruminante, a ovelha, indicam que tal fenômeno pode ocorrer.

O primeiro estudo em ovinos indicando a importância do ambiente periconceptional da mãe para as características da progênie na idade adulta utilizou um modelo no qual ovelhas doadoras de embriões foram alimentados com uma dieta deficiente em cobalto e enxofre formulada para reduzir a capacidade de metilação de DNA (Sinclair *et al.*, 2007). A dieta experimental foi fornecida a partir de 8 semanas antes da inseminação até seis dias após a mesma. Os embriões foram então coletados do útero e transferidos para fêmeas controle para garantir que o efeito da dieta materna se refletisse no embrião. No dia 90 de gestação, houve diferenças associadas à dieta com relação ao estado de metilação de 4% de 1000 ilhas CpG examinadas no fígado fetal. Além disso, os animais que foram provenientes de fêmeas alimentadas com a dieta experimental apresentaram várias características fisiológicas alteradas na idade adulta. Para ambos os sexos, peso corporal foi maior no grupo tratado. Machos, filhos de mães alimentadas com a dieta experimental, estavam mais gordos, apresentaram maior resposta de haptoglobina à imunização com ovalbumina, aumento da resistência à insulina e pressão arterial diastólica elevada.

O delineamento do experimento de Sinclair *et al.* (2007) não tornou possível determinar se as ações de alimentação materna foram no próprio embrião ou no oócito que o derivou. No entanto, o potencial para a manipulação de função pós-natal de animais, modificando a dieta materna no período periconcepcional ficou claro. Além disso, existem outros relatos de que uma alteração no ambiente materno ou no período pré-ovulatório e gestação inicial ou no início da gestação sozinho alteradou características pós-natais na prole. Os resultados estão resumidos na Tabela 1. Alterações no ambiente materno que causam alterações no fenótipo pós-natal das crias são subnutrição (Gardner *et al.*, 2004, 2006; Poore *et al.*, 2007, Hernandez *et al.*, 2010) e injeção de hormônio de crescimento (GH) de libertação lenta por cerca de 3 dias antes do estro (Costine *et al.*, 2005; Koch *et al.*, 2010). O fenótipo causado por estas manipulações do sistema materno são menos intensas do que as do estudo de Sinclair *et al.* (2007), provavelmente porque a estratégia de limitar a metilação do DNA utilizada neste último estudo causou uma mudança maior no epigenoma fetal do que a provocada por subnutrição ou ativação do eixo GH-IGF-1.

Fator Estimulador de Colônia 2 - Um sinal materno que modifica o programa de desenvolvimento do embrião pré-implantacional

Ações da mãe que alteram o programa de desenvolvimento do embrião pré-implantação são provavelmente mediadas, em parte, por moléculas reguladoras de embriões, produzidas na tuba uterina ou endométrio. Essas moléculas, que na vaca incluem ativina, Fator Estimulador de Colônia 2 (CSF2), DKK1, EGF, FGF2, IGF1, IL1B, LIF eTGFB (Hansen *et al.*, 2014a), foram denominados embriocinas por causa de sua capacidade de regular o crescimento e diferenciação do embrião (Hansen et al., 2014a, b). Uma dessas moléculas, CSF2, pode exercer ações sobre o embrião pré-implantacional que alteram o desenvolvimento mais tarde na gestação e na vida pós-natal.

Os primeiros indícios de que o CSF2 pode regular o programa de desenvolvimento do embrião pré-implantação foi a constatação de Sjöblom et al. (2005), em camundongos, onde a adição de CSF2 no meio de cultivo previniu os efeitos prejudiciais do cultivo embrionário no fenótipo pós-natal. A adição de CSF2 ao meio de cultivo desde o estágio de duas células até o estádio de blastocisto reduziu ou evitou os efeitos do cultivo sobre: o crescimento pós-natal em fêmeas e machos, a massa cerebral relativa em machos, e peso da placenta de progênie fêmea quando estas se tornaram gestantes. Não houve alívio do efeito do cultivo na adiposidade dos machos.

O tratamento de embriões de bovinos a partir do dia 5 a 7 de desenvolvimento com CSF2 também afeta o desenvolvimento posterior de forma que varia entre os embriões femininos e masculinos (Dobbs *et al.*, 2014). Após o cultivo, os embriões foram transferidos para vacas e recuperados do trato reprodutivo 8 dias mais tarde, no dia 15 de gestação. O dia 15 foi escolhido porque é o momento em que o embrião bovino passa pelo alongamento rápido do trofoblasto e a secreção da molécula antiluteolítica IFNT (Spencer *et al.*, 2007). Houve interação entre sexo e tratamento no comprimento do concepto e nas concentrações de IFNT no lúmen uterino (uma medida indireta da produção embrionária de IFNT). O CSF2 levou à redução do comprimento do embrião e do acúmulo intrauterino de IFNT nas fêmeas, mas aumentou comprimento e IFNT nos machos (Fig. 2). Além disso, efeitos do IFNT sobre a expressão gênica e a metilação do DNA nos trofoblastos também variaram entre embriões machos e fêmeas.

Tabela 1. Alterações no fenótipo pós-natal em ovinos causadas por alterações no ambiente materno durante o período pré-ovulatório e/ou gestação inicial.

Tratamento materno	Idade examinada	Fenótipo pós-natal alterado			Notas	Referência
		Ambos os sexos	Apenas fêmeas	Apenas machos		
Consumo de alimento restrito a partir do dia 1 a 30 de gestação	1 ano	• aumento da pressão de pulso • duplo produto reduzido • ausência de taquicardia após infusão de angiotensina II • redução da sensibilidade ao baroreflexo durante a infusão de angiotensina II			Diferenças de sexo não determinadas	Gardner *et al.*, 2004
Consumo de alimento restrito a partir do dia 1 a 30 de gestação	1 ano		• aumento do cortisol em descanso • redução da resposta de ACTH e cortisol ao CRH e à vasopressina	• aumento da resposta de ACTH e cortisol ao CRH e à vasopressina		Gardner *et al.*, 2006
Consumo de alimento restrito a partir do dia 1 a 31 de gestação	1,5 e 2,5 anos			• aumento da resistência à insulina (apenas com 1,5 anos)	Maioria dos efeitos não significativos	Poore *et al.*, 2007
Consumo de alimento reduzido do dia -2 a 30 após a monta	4 meses			• aumento da resposta de cortisol ao isolamento • aumento de tentativas de escape, teste de comportamento		Hernandez *et al.*, 2010
Liberação constante de GH, ~dia 3 antes do cruzamento	30-75 dias		• aumento do peso corporal	Não examinado	Apenas fêmeas examinadas	Costine *et al.*, 2005
Liberação constante de GH, ~dia 3 antes do cruzamento	100 dias		• aumento do peso corporal Diminuição da resposta de IGF1 ao desafio com GHRH	Não examinado	Apenas fêmeas examinadas	Koch *et al.*, 2010

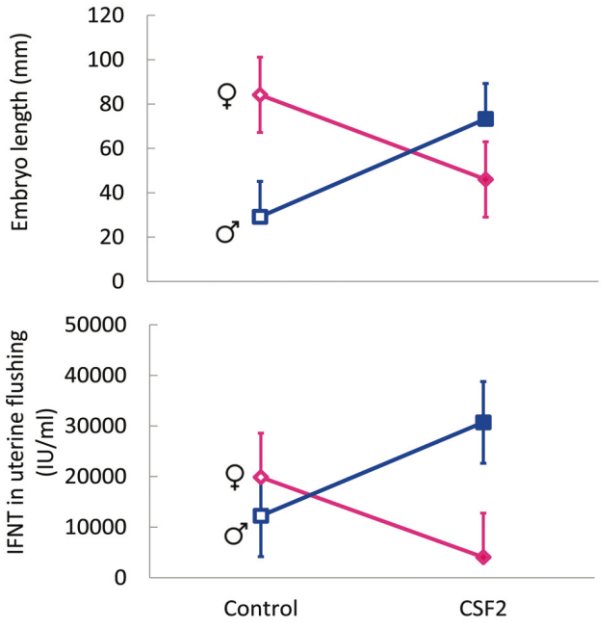

Figura 2. O sexo dos embriões afeta as ações do tratamento com CSF2 durante os dias 5 a 7 do desenvolvimento com relação ao comprimento do concepto e concentração de IFNT a partir de lavagem uterina no dia 15 de gestação. Figura reproduzida a partir da Biology of Reproduction (Dobbs *et al.*, 2014).

Para onde vamos a partir daqui?

O foco deste artifgo foi o período de pré-implantação. Esta não é o único momento da gestação em que alterações no ambiente materno podem alterar as características do desenvolvimento que afetam a função pós-natal da progênie. Em bovinos, por exemplo, a dieta no segundo ou terceiro trimestre pode afetar a fertilidade (Martin *et al.*, 2007) e características de carcaça (Micke *et al.*, 2010a, b, 2011). O fato de que os eventos maternos podem afetar o programa de desenvolvimento do concepto significa que existe oportunidade para moldar a função pós-natal dos animais através da manipulação de ambiente materno durante a gestação. Mesmo que já tenha havido interesse em explorar perspectivas de regulação de características da prole de espécies de animais de produção pela manipulação de eventos durante a gestação (ver Everett, 1964 para um exemplo antigo), o campo ainda é pequeno em relação ao potencial de ganho de produtividade animal. Ainda há muito por fazer.

Em comparação com outros momentos durante a gestação, o período de pré-implantação oferece vantagens únicas. Não é somente possível modificar a função materna durante este período de gestaçao, mas, em casos de PIV, o embrião passa parte do período de pré-implantação fora da mãe. Experiências com CSF2 (Sjöblom *et al.*, 2005; Dobbs *et al.*, 2014) mostram que é possível alterar o ambiente do embrião em cultivo para alterar a sua trajetória de desenvolvimento. Infelizmente, a exposição do embrião em condições de cultivo muitas vezes faz com que a programação de desenvolvimento se torne desregulada (Farin *et al.*, 2006). Com mais pesquisas focadas em resultados de PIV que abordam além do estabelecimento da gestação ou até mesmo parto, pode ser possível não somente eliminar os resultados adversos associados com a PIV mas também para produzir um animal neonatal com perspectivas superiores para atingir uma produção ótima mais tarde na vida.

Agradecimentos

As pesquisas recentes do autor sobre este tema foram financiadas pelo projeto No. 2011-67015-30688 do USDA NIFA.

Referências

Al-Katanani YM, Drost M, Monson RL, Rutledge JJ, Krininger III CE, Block J, Thatcher WW, Hansen PJ. 2002. Pregnancy rates following timed embryo transfer with fresh or vitrified in vitro produced embryos in lactating dairy cows under heat stress conditions. *Theriogenology*, 58:171-182.

Berg C, Gyllenhammar I, Kvarnryd M. 2009. Xenopus tropicalis as a test system for developmental and reproductive toxicity. *J Toxicol Environ Health A*, 72:3-4.

Bonilla L, Block J, Denicol AC, Hansen PJ. 2014. Consequences of transfer of an in vitro-produced embryo for the dam and resultant calf. *J Dairy Sci*, 97:229-239.

Bromfield JJ, Schjenken JE, Chin PY, Care AS, Jasper MJ, Robertson SA. 2014. Maternal tract factors contribute to paternal seminal fluid impact on metabolic phenotype in offspring. *Proc Natl Acad Sci USA*,

111:2200-2205.

Calle A, Miranda A, Fernandez-Gonzalez R, Pericuesta E, Laguna R, Gutierrez-Adan A. 2012. Male mice produced by in vitro culture have reduced fertility and transmit organomegaly and glucose intolerance to their male offspring. *Biol Reprod*, 87:34. doi: 10.1095/biolreprod.112.100743.

Ceelen M, van Weissenbruch MM, Roos JC, Vermeiden JP, van LeeuwenFE, Delemarre-van de Waal HA. 2007. Body composition in children and adolescents born afterin vitro fertilization or spontaneous conception. *J Clin Endocrinol Metab*, 92:3417-3423.

Ceelen M, van Weissenbruch MM, Vermeiden JP, van Leeuwen FE, Delemarre-van de Waal HA. 2008. Cardiometabolic differences in children born after in vitro fertilization: follow-up study. *J Clin Endocrinol Metab*, 93:1682-1688.

Celeghin A, Benato F, Pikulkaew S, Rabbane MG, Colombo L, Dalla Valle L. 2011. The knockdown of the maternal estrogen receptor 2a(esr2a) mRNA affects embryo transcript contents and larval development in zebrafish. *Gen Comp Endocrinol*, 172:120-129.

Chen Z, Hagen DE, Elsik CG, Ji T, Morris CJ, Moon LE, Rivera RM. 2015. Characterization of global loss of imprinting in fetal overgrowth syndrome induced by assisted reproduction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 112:4618-4623.

Costine BA, Inskeep EK, Wilson ME. 2005. Growth hormone at breeding modifiesconceptus development and postnatal growth in sheep. *J Anim Sci*, 83:810-815.

Crosier A, Farin PW, Dykstra MJ, Alexander JE, Farin CE. 2001. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or in vitro. *Biol Reprod*, 64, 1375-1385.

Dobbs KB, Gagné D, Fournier E, Dufort I, Robert C, Block J, Sirard MA, Bonilla L, Ealy AD, Loureiro B, Hansen PJ. 2014. Sexual dimorphism in developmental programming of the bovine preimplantation embryo caused by colony-stimulating factor 2. *Biol Reprod*, 91:80. doi: 10.1095/biolreprod.114.121087.

Driver AM, Peñagaricano F, Huang W, Ahmad KR, Hackbart KS, Wiltbank MC, KhatibH. 2012. RNA-Seq analysis uncovers transcriptomic variations between morphologicallysimilar in vivo- and in vitro-derived bovine blastocysts. *BMC Genomics*, 13:118. doi:10.1186/1471-2164-13-118.

Enright BP, Lonergan P, Dinnyes A, Fair T, Ward FA, Yang X, Boland MP. 2000. Cultureof in vitro produced bovine zygotes in vitro vs in vivo: implications for early embryo development and quality. *Theriogenology*, 54:659-673.

Everitt GC. 1964. Maternal undernutrition and retarded fetal development in Merinosheep. *Nature*, 201:1341-1342.

Farin PW, Piedrahita JA, Farin CE. 2006. Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology*, 65:178-191.

Fernández-Gonzalez R, Moreira P, Bilbao A, Jiménez A, Pérez-Crespo M, Ramírez MA, Rodríguez De Fonseca F, Pintado B, Gutiérrez-Adán A. 2004. Long-term effect of in vitro culture of mouse embryos with serum on mRNA expression of imprinting genes, development, and behavior. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101:5880-5885.

Fleming TP, Velazquez MA, Eckert JJ. 2015. Embryos, DOHaD and David Barker. *J Dev Orig Health Dis*, 8:1-7.

Ganu RS, Harris RA, Collins K, Aagaard KM. 2012. Early origins of adult disease: approaches for investigating the programmable epigenome in humans, nonhuman primates, and rodents. *ILAR J*, 53:306-321.

Gardner DS, Pearce S, Dandrea J, Walker R, Ramsay MM, Stephenson T, Symonds ME. 2004. Peri-implantation undernutrition programs blunted angiotensin II evokedbaroreflex responses in young adult sheep. *Hypertension*, 43:1290-1296.

Gardner DS, Van Bon BW, Dandrea J, Goddard PJ, May SF, Wilson V, Stephenson T, Symonds ME. 2006. Effect of periconceptional undernutrition and gender onhypothalamic-pituitary-adrenal axis function in young adult sheep. *J Endocrinol*, 190:203-212.

Hansen PJ, Denicol AC, Dobbs KB. 2014a. Maternal embryokines that regulate development of the bovine preimplantation embryo. *Turkish J Anim Vet Sci*, 38:589-598.

Hansen PJ, Dobbs KD, Denicol AC. 2014b. Programming of the preimplantation embryo by the embryokine colony stimulating factor 2. *Anim Reprod Sci*, 149:59-66.

Hernandez CE, Matthews LR, Oliver MH, Bloomfield FH, Harding JE. 2010. Effects of sex, litter size and periconceptional ewe nutrition on offspring behavioural and physiological response to isolation. *Physiol Behav*, 101:588-594.

Koch JM, Wilmoth TA, Wilson ME. 2010. Periconceptional growth hormone treatmentalters fetal growth and development in lambs. *J Anim Sci*, 88:1619-1625.

Kwong WY, Wild AE, Roberts P, Willis AC, Fleming TP. 2000. Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension. *Development*, 127:4195-4202.

Lane M, McPherson NO, Fullston T, Spillane M, Sandeman L, Kang WX, Zander-Fox DL. 2014. Oxidative stress in mouse sperm impairs embryo development, fetal growth and alters adiposity and glucose regulation in female offspring. *PLoS One*, 9:e100832.

Li S, Sloboda DM, Moss TJ, Nitsos I, Polglase GR, Doherty DA, Newnham JP, Challis JR, Braun T. 2013. Effects of glucocorticoid treatment given in early or late gestation on growth and development in sheep. *J Dev Orig Health Dis*, 4:146-156.

Martin JL, Vonnahme KA, Adams DC, Lardy GP, Funston RN. 2007. Effects of dam nutrition on growth and reproductive performance of heifer calves. *J Anim*

Sci, 85:841-847.

Master JS, Thouas GA, Harvey AJ, Sheedy JR, Hannan NJ, Gardner DK, Wlodek ME. 2015.Fathers that are born small program alterations in the next-generation preimplantation rat embryos. *J Nutr*, 145:876-883.

Meier S, Craig Morton H, Nyhammer G, Grøsvik BE, Makhotin V, Geffen A, Boitsov S, Kvestad KA, Bohne-Kjersem A, Goksøyr A, Folkvord A, Klungsøyr J, Svardal A. 2010. Development of Atlantic cod (*Gadus morhua*) exposed to produced water during early life stages: effects on embryos, larvae, and juvenile fish. *Mar Environ Res*, 70:383-394.

Micke GC, Sullivan TM, Gatford KL, Owens JA, Perry VE. 2010a. Nutrient intake in the bovine during early and mid-gestation causes sex-specific changes in progeny plasma IGF-I, liveweight, height and carcass traits. *Anim Reprod Sci*, 121:208-217.

Micke GC, Sullivan TM, SoaresMagalhaes RJ, Rolls PJ, Norman ST, Perry VE. 2010b. Heifer nutrition during early- and mid-pregnancy alters fetal growth trajectory and birth weight. *Anim Reprod Sci*, 117:1-10.

Micke GC, Sullivan TM, McMillen IC, Gentili S, Perry VE. 2011. Protein intake during gestation affects postnatal bovine skeletal muscle growth and relative expression of IGF1, IGF1R, IGF2 and IGF2R. *Mol Cell Endocrinol*, 332:234-241.

Pontes JH, Nonato-Junior I, Sanches BV, Ereno-Junior JC, Uvo S, Barreiros TR, Oliveira JA, Hasler JF, Seneda MM. 2009. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology*, 71:690-697.

Poore KR, Cleal JK, Newman JP, Boullin JP, Noakes DE, Hanson MA, Green LR. 2007. Nutritional challenges during development induce sex-specific changes in glucose homeostasis in the adult sheep. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 292:E32-E39.

Rizos D, Fair T, Papadopoulos S, Boland MP, Lonergan P. 2002a. Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced in vivo or in vitro. *Mol Reprod Dev*, 62:320-327.

R**izos D, Lonergan P, Boland MP, Arroyo-García R, Pintado B, de la Fuente J, Gutiérrez-Adán A**. 2002b. Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. *Biol Reprod*, 66:589-595.

Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P. 2002c. Consequences of bovine oocytematuration, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev*, 61:234-248.

Roseboom TJ, van der Meulen JH, Ravelli AC, Osmond C, Barker DJ, Bleker OP. 2001. Effects of prenatal exposure to the Dutch famine on adult disease in later life: an overview. *Mol Cell Endocrinol*, 185:93-98.

Scherrer U, Rimoldi SF, Rexhaj E, Stuber T, Duplain H, Garcin S, de Marchi SF, Nicod P, Germond M, Allemann Y, Sartori C. 2012. Systemic and pulmonary vascular dysfunction in children conceived by assisted reproductive technologies. *Circulation*, 125:1890-1896.

Schwanz LE, Ezaz T, Gruber B, Georges A. 2013. Novel evolutionary pathways of sex-determining mechanisms. *J Evol Biol*, 26:2544-2557.

Serrano A, Decara JM, Fernández-González R, López-Cardona AP, Pavón FJ, Orio L, Alen F, Gutiérrez-Adán A, de Fonseca FR. 2014. Hyperplastic obesity and liver steatosis as long-term consequences of suboptimal in vitro culture of mouse embryos. *Biol Reprod*, 91:30. doi: 10.1095/biolreprod.114.117879.

Sinclair KD, Allegrucci C, Singh R, Gardner DS, Sebastian S, Bispham J,Thurston A, Huntley JF, Rees WD, Maloney CA, Lea RG, Craigon J, McEvoy TG, Young LE. 2007. DNA methylation, insulin resistance, and blood pressure in offspringdetermined by maternal periconceptional B vitamin and methionine status. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104:19351-19356.

Siqueira LG, Torres CA, Souza ED, Monteiro PL Jr, Arashiro EK, Camargo LS, Fernandes CA, Viana JH. 2009. Pregnancy rates and corpus luteum-related factors affecting pregnancy establishment in bovine recipients synchronized for fixed-time embryo transfer. *Theriogenology*, 72:949-958.

Sjöblom C, Roberts CT, Wikland M, Robertson SA. 2005. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor alleviates adverse consequences of embryo culture on fetal growth trajectory and placental morphogenesis. *Endocrinology*, 146:2142-2153.

Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW, Burghardt RC, Palmarini M. 2007. Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. *Reprod Fertil Dev*, 19:65-78.

Sun C, Velazquez MA, Marfy-Smith S, Sheth B, Cox A, Johnston DA, Smyth N, Fleming TP. 2014. Mouse early extra-embryonic lineages activate compensatory endocytosis in response to poor maternal nutrition. *Development*, 141:1140-1150.

Sun C, Denisenko O, Sheth B, Cox A, Lucas ES, Smyth NR, Fleming TP. 2015. Epigenetic regulation of histone modifications and Gata6 gene expression induced by maternal diet in mouse embryoid bodies in a model of developmental programming. *BMC Dev Biol*, 15:3. doi: 10.1186/s12861-015-0053-1.

Tao S, Monteiro AP, Hayen MJ, Dahl GE. 2014. Short communication: Maternal heat stress during the dry period alters postnatal whole-body insulin response of calves. *J Dairy Sci*, 97:897-901.

Walker CL, Ho SM. 2012. Developmental reprogramming of cancer susceptibility. *Nat Rev Cancer*, 12:479-486.

Watkins AJ, Ursell E, Panton R, Papenbrock T, Hollis L, Cunningham C, Wilkins A, Perry VH,

Sheth B, Kwong WY, Eckert JJ, Wild AE, Hanson MA, Osmond C, Fleming TP. 2008. Adaptive responses by mouse early embryos to maternal diet protect fetal growth but predispose to adult onset disease. *Biol Reprod*, 78:299-306.

Watkins AJ, Lucas ES, Torrens C, Cleal JK, Green L, Osmond C, Eckert JJ, Gray WP, Hanson MA, Fleming TP. 2010. Maternal low-protein diet during mouse pre-implantation development induces vascular dysfunction and altered renin-angiotensin-system homeostasis in the offspring. *Br J Nutr*, 103:1762-1770.

Watkins AJ, Lucas ES, Wilkins A, Cagampang FR, Fleming TP. 2011. Maternal periconceptional and gestational low protein diet affects mouse offspring growth, cardiovascular and adipose phenotype at 1 year of age. *PLOS One*, 6:e28745.

Watkins AJ, Lucas ES, Marfy-Smith S, Bates N, Kimber SJ, Fleming TP. 2015. Maternal nutrition modifies trophoblast giant cell phenotype and fetal growth in mice. *Reproduction*, 149:563-575.

Williams CL, Teeling JL, Perry VH, Fleming TP. 2011. Mouse maternal systemic inflammation at the zygote stage causes blunted cytokine responsiveness in lipopolysaccharide-challenged adult offspring. *BMC Biol*, 9:49. doi: 10.1186/1741-7007-9-49.

Metaboloepigenética: fornecendo hipóteses alternativas para a regulação da expressão gênica em embriões iniciais

H.M. Brown[1], T.C.Y. Tan, J.G. Thompson

Robinson Research Institute, Centre for NanoscaleBioPhotonics, School of Paediatrics and Reproductive Health, University of Adelaide, Adelaide, Australia.

Resumo

Os perfis metabólicos e epigenéticos do período embrionário pré-implantacional alteram-se rapidamente à medida que o embrião se desloca pelo trato reprodutivo. Os genomas paterno e materno se interagem, intensa divisão celular se inicia, totipotência é reestabelecida e, eventualmente, diferenciação celular se inicia, tudo isso na ausência de um fornecimento vascular de oxigênio e nutrientes e de um sistema excretor funcional. Nos últimos anos, tornou-se claro que efeitos ambientais durante o desenvolvimento embrionário, incluindo dieta materna, stress e inflamação, alteram a saúde do indivíduo ao longo da vida. No entanto, as sinalizações moleculares específicas que são reconhecidas pelo embrião, e suas consequências, permanecem ainda desconhecidas. Recentemente, tornou-se claro que as vias relacionadas ao metabolismo energético interagem com fatores epigenéticos importantes da estrutura da cromatina, regulando a expressão gênica. Assim, a interação entre estes dois sistemas celulares chave a metaboloepigenética - é um provável mecanismo pelo qual as interações genética-ambientais ocorrem, determinando a trajetória do embrião. Esta revisão explora a plasticidade metabólica e epigenética do embrião inicial, e como estes dois sistemas se interconectam para a próxima geração.

Palavras chave: embrião, epigenética, metaboloepigenética, metabolismo, transcrição.

Metabolismo: alimentando o desenvolvimento embrionário pre-implantacional

O metabolismo embrionário durante o período pré-implantacional é coordenado pelo consumo, produção e uso da energia, permitindo ao embrião manter um intenso processo de divisão celular em um ambiente avascular único, necessário à perpetuação da espécie. Em células animais, as mitocôndrias são as organelas que evoluíram de forma eficiente para produzir energia, e a sua atividade tem sido muito estudada em embriões pré-implantacionais em muitas espécies. A demanda do embrião por fontes energéticas muda rapidamente ao longo do desenvolvimento favorecendo a fosforilação oxidativa nas fases iniciais e a glicólise próxima à implantação.

A capacidade do embrião em completar os eventos de formação pronuclear, singamia, ativação do genoma embrionário, mitoses sucessivas, compactação, diferenciação celular e desenvolvimento da blastocele baseia-se na capacidade intrínseca do embrião de regular a distribuição e consumo temporal e espacial de energia. Décadas de estudos tem abordado os requerimentos energéticos de embriões iniciais produzidos in vivo e em diferentes condições in vitro em várias espécies. As primeiras clivagens são quase totalmente dependentes da oxidação de substratos, incluindo piruvato (Gardner e Leese, 1988; Butcher *et al.*, 1998), lactato (Lane e Gardner, 2000) e aminoácidos (Gardner e Lane, 1993; Van Winkle, 2001) para manter a produção de ATP. Uma função primária da conversão de piruvato alactato é a recuperação do NAD^+ para sua utilização subsequente na glicólise, o que normalmente ocorre sob condições anaeróbias, mas que no trato reprodutivo, ocorre na presença de oxigênio (Krisher e Prather, 2012). Durante este período de divisão mitótica, foi proposto que o embrião tenha um metabolismo "lento" (Leese, 2002; Baumann *et al.*, 2007), parcialmente porque, embora esteja ocorrendo replicação de DNA e divisão celular, o volume celular diminui a cada divisão (Turner *et al.*, 1994), mantendo um moderado requerimento energético, e, por sua vez, de oxigênio. Por outro lado, dados com embriões humanos mostraram que embriões que resultaram em gestação apresentaram um maior consumo de glicose (Gardner *et al.*, 2011). Talvez, isto seja o balanço "fino" entre o consumo e a utilização de energia, o qual determina a viabilidade do embrião a longo prazo.

Com uma maior demanda por transcrição e síntese proteica e a necessidade de formação da blastocele, ocorre uma mudança do estado de metabolismo "lento" para um nível aumentado, o qual está associado a uma mudança da fosforilação oxidativa para glicólise (Leese, 1995), com o embrião demonstrando uma grande capacidade para a glicólise aeróbica (Gardner e Leese, 1988). Os mecanismos pelos quais esta mudança ocorre permanecem pouco esclarecidos, mas parecem ser regulados pela presença de glicose, aumentando a expressão de transportadores de glicose (revisado em Purcell e Moley, 2009). Este aumento significativo na capacidade metabólica do embrião é provavelmente necessário para alimentar a atividade Na-K-ATPase, que inicialmente bombeia fluido para dentro do espaço intracelular e posteriormente para os espaços extracelulares, formando

Autor correspondente: hannah.brown@adelaide.edu.au

a blastocele (Biggers *et al.*,1977; Borland *et al.*,1977a, b). Os sistemas de transporte de íons para Na^+, Cl^-, K^+, Ca^{2+} e Mg^{2+} concentram íons dentro da blastocele, criando condições para o movimento de água, necessário para a formação da cavidade cheia de fluido (Borland *et al.*, 1977a, b).

Propõe-se que esta mudança da fosforilação oxidativa para a glicólise prepara o embrião para a hipóxia que este irá enfrentar a partir do momento da implantação até a remodelação das arteríolas espirais da placenta humana no final do primeiro trimestre (Burton *et al.*, 2010; Cartwright *et al.*, 2010), talvez explicando a escolha pela ineficiente produção de energia. Além disso, a glicose fornece as pentoses para a síntese de ácido nucleico, e é requerida tanto para a biossíntese de fosfolipídio quanto para aminoácidos não essenciais, os quais mantém a rápida divisão celular (O'Fallon e Wright, 1986; Wales e Du, 1993; Cairns *et al.*, 2011; Gutnisky *et al.*, 2014). Embora seja um meio ineficiente para gerar ATP, talvez essa adaptação metabólica seja importante na produção de biomassa e regulação redox, e tem sido relacionada ao "Efeito Warburg", uma característica marcante de células altamente proliferativas, particularmente células cancerosas (Krisher e Prather, 2012).

A plasticidade metabólica permite a adaptação ao estresse induzido pelo cultivo *in vitro*, dieta e outros fatores ambientais. Antes da ativação do genoma embrionário (que ocorre até após a 4ª divisão mitótica em algumas espécies), os níveis de transcrição são muito baixos ou inexistentes e o metabolismo fornece um mecanismo pelo qual o embrião ainda pode responder às alterações do meio. No entanto, seria possível que esta plasticidade metabólica que promove a sobrevivência do embrião na ausência de transcrição, também tenha efeitos prejudiciais? O metabolismo alterado estaria mudando a abundância de transcritos estocados, ou alterando o perfil epigenético, e dessa forma, mudando a trajetória do embrião para sempre? Seria a conversão aeróbica do piruvato em lactato no embrião necessária para a manutenção de NAD^+, o qual está envolvido na regulação de enzimas modificadoras de cromatina?

Epigenética: um cenário em transição durante o desenvolvimento embrionário pré-implantacional

Não deveria ser nenhuma surpresa o fato de que o epigenoma do embrião inicial é um cenário em rápida mudança. O espermatozóide e o ovócito, dois tipos de células altamente especializadas, encontram-se, passam por rearranjos cromossomais para fundir os genomas materno e paterno, e, em seguida, começam a se dividir como uma entidade única, não mais altamente especializada, mas com o potencial máximo para formar todos os diferentes tipos celulares. A epigenética, ou o estudo de características celulares e fenótipos mitoticamente herdáveis, é o mecanismo pelo qual estas características altamente especializadas são apagadas, e a totipotência reestabelecida (Santos *et al.*, 2005; Goldberg *et al.*, 2007; Shi e Wu, 2009). Esta totipotência vai diminuindo a cada divisão celular, reduzindo progressivamente o leque de possibilidades de diferenciação. Embora o conceito pareça simples, a epigenética do desenvolvimento embrionário inicial é complexa, controversa e desafiante. Concomitante com o avanço tecnológico, o campo da epigenética se desenvolveu e não inclui apenas metilação do DNA, a modificação epigenética mais conhecida no embrião pré-implantacional, mas também as modificações de histonas e os RNA não-codantes, apenas para citar alguns exemplos.

Os primeiros estudos que descrevem os padrões de desmetilação do DNA no embrião inicial mostraram duas fases distintas: uma onda de desmetilação global ativa (não-dependente de replicação) do genoma paterno, seguida por uma perda progressiva epassiva de metilação do genoma materno ao longo das sucessivas divisões celulares (Mayer *et al.*, 2000;. Morgan *et al.*, 2005). Esta perda ativa de metilação do genoma paterno foi comprovada por estudos que confirmaram que um membro da família *Ten-Eleven Translocase*, TET3, era a responsável pela conversão da citosina metilada em citosina hidroximetilada e sua subsequente remoção por oxidação (Gu *et al.*, 2011; Wossidlo *et al.*, 2011).

Mais recentemente, análises de metilação de DNA por sequenciamento mostraram que durante o desenvolvimento embrionário pré-implantacional, a maioria das regiões genômicas funcionais sofrem desmetilação significativa, com exceção da ilhas CpG (ICGs) e regiões 5' não traduzidas (UTRs)', nas quais os níveis de metilação já são muito baixos em gametas (Wang *et al.*, 2014). Além disso, demonstrou-se que o metiloma paterno e, pelo menos, uma proporção significativa do metiloma materno sofrem uma desmetilação ativa durante o desenvolvimento embrionário, com base na presença das methyl-citosinas oxidadas (5hmC, 5fC; Wang *et al.*, 2014). Com as possibilidades de análises de metilação global por sequenciamento em células individuais, um melhor entendimento será alcançado, não somente do papel da metilação de DNA na genômica funcional e estrutural – incluindo formação de heterocromatina, inativação do cromossomo X e *imprinting* genômico – mas também da heterogeneidade epigenética durante o desenvolvimento inicial e os mecanismos pelos quais alterações de metilação em *loci* específicos ocorrem.

É importante reconhecer, no entanto, que enquanto a metilação do DNA é o mecanismo epigenético mais amplamente estudado no embrião inicial, muitos outros mecanismos participam da regulaçãoda estrutura da cromatina, da transcrição e da divisão celular. Modificações de histonas têm sido estudadas em diversas espécies e em todas as fases do desenvolvimento embrionário pré-implantacional (revisado por Beaujean, 2014a, b). Muitas modificações nas histonas H2, H3 e H4 foram descritas, embora as

tecnologias empregadas até o momento têm sido predominantemente por imunohistoquímica (IHC), que permite a análise global de apenas uma única modificação de cada vez. Tecnologias atuais para avaliar várias modificações de histonas em *loci* específicos em células individuais não estão ainda disponíveis, e, consequentemente, muito pouco se sabe sobre as alterações em *loci* específicos durante o desenvolvimento. O que está claro é que quando o genoma paterno entra no ovócito no momento da fecundação, as protaminas são removidas e substituídas por histonas oriundas do ovócito (McLay e Clarke, 2003). Embora as histonas sejam derivadas do ovócito, os DNAs materno e paterno apresentam uma grande assimetria em relação às modificações de histonas (Reik *et al.*,2003; Van der Heijden *et al.*, 2005), o que é detectável até o estágio de quatro células para algumas modificações.

O momento mais ativo para a remodelação epigenética corresponde ao período de maior sensibilidade do embrião à saúde do ambiente materno e paterno, através do ambiente criado no interior do trato reprodutivo, o qual pode apresentar tanto desafios metabólicos quanto imunológicos. A questão que permanece mal respondida é "como"? Aqui descrevemos as evidências de como o metabolismo se conecta com os mecanismos de estabilidade epigenética, permitindo a plasticidade necessária para o desenvolvimento, bem como a adaptação a longo prazo para o ambiente peri-concepção.

Metaboloepigenética: o metabolismo pode alterar o perfil epigenético do embrião pré-implantacional?

Nos últimos anos, várias hipóteses surgiram propondo uma interação entre o epigenoma e o metabolismo celular, resultando em alterações no fenótipo celular. Neste caso, estímulos ou mudanças ambientais, que alteram o metabolismo durante um período em que o perfil epigenético do embrião ainda é simples, poderiam alterar o futuro do embrião. A epigenética envolve alterações do DNA e da cromatina por uma gama de enzimas as quais adicionam e removem várias modificações químicas, incluindo grupos metil, acetil e fosfato (Bannister e Kouzarides, 2011). A grande variação nos tipos de modificação, bem como o grande número de potenciais sítios alvo no DNA e nas histonas aumentam as possibilidades de que pelo menos algumas destas modificações podem ser influenciadas por alterações em metabólitos ou seus subprodutos. Reforçando esta hipótese, relações diretas entre enzimas e processos responsáveis por alterações na estrutura da cromatina e o metabolismo foram identificadas. Por exemplo, tanto as enzimas DNA methyltransferases (que metilam ativamente o DNA), quanto as enzimas histonas methyltransferases, requerem S-adenosil metionina (SAM), um produto do metabolismo do ciclo de um carbono (1C), para realizar suas funções. O dinucleotídeo flavina adenosina (FAD) e o alfa-cetoglutarato (α-KG) são cofatores essenciais para reverter a reação, removendo grupamentos metil (Iyer *et al.*, 2009). O FAD em seu estado reduzido (FADH2) transporta energia; quando oxidado, é utilizado em reações de oxidação dentro do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), também conhecido como ciclo de Krebs ou ciclo do ácido cítrico, que constitui uma parte fundamental da respiração aeróbica. Da mesma forma, α-KG é um intermediário no ciclo do TCA, e é derivado da glutamina. Juntamente com o Fe^{2+}, ele age como um cofactor necessário para a família de enzimas TET, as quais ativamente removem grupos methyl do DNA (Wossidlo *et al.*, 2011). Está bem documentado que certos fatores de estresse, tais como o cultivo *in vitro*, durante o desenvolvimento inicial, alteram o metabolismo do embrião. Conforme discutido acima, que ambos os genomas, materno e paterno, são alvos de desmetilação ativa do DNA pela família de enzimas TET no início do desenvolvimento, é possível que haja alterações no *status* de metilação de DNA seguida de exposição a fatores estressantes que alteram o metabolismo (por exemplo, o cultivo *in vitro* - Stojanov e O'Neill, 2001; Morgan *et al.*, 2008).

Essa interação entre o metabolismo e a epigenética não é exclusiva para a modificação de metilação. A acetilação, recentemente demostrada ser tão abundante quanto a fosforilação no proteoma, resulta da adição covalente de uma molécula de acetilCoA a um resíduo de lisina. Quando essa modificação ocorre nas caudas das histonas, a acetilação altera a estrutura da cromatina, e também serve como um encaixe para “proteínas leitoras” do código de histonas (Choudhary *et al.*, 2009). Nas mitocôndrias, o acetilCoA é derivado do citrato, que é por sua vez sintetizado a partir da glicose no TCA. No entanto, o acetilCoA, não pode atravessar a membrana mitocondrial, sendo assim, para haver acetilCoA no núcleo, o citrato se difunde através da membrana mitocondrial, entra no núcleo através dos poros nucleares, e pode, então, ser convertido a acetilCoA através de trifosfato de adenosina (ATP) -citrato liase (ACL), promovendo então a acetilação das histonas através do aumento da disponibilidade de substrato (Reytor *et al.*, 2009; Wellen *et al.*, 2009). Curiosamente, há uma redução de acetilação próxima a genes críticos para a regulação da glicólise, resultando numa diminuição da sua transcrição e uma inibição da glicólise, corroborando as interações metaboloepigenéticas intrínsecas (Wellen *et al.*, 2009; Martinez-Pastor *et al.*, 2013). Este mecanismo é um exemplo de como vias metabólicas relacionadas à energia envolvidas no metabolismo da glicose podem regular a cromatina, e, por sua vez, a transcrição.

Há também uma influência bem descrita do metabolismo na remoção de grupos acetil pelas enzimas histona desacetilases (HDACs), que incluem uma família/classe de enzimas dependentes de NAD^+, as Sirtuinas (North e Verdin, 2004). O NAD^+ aceita elétrons de outras moléculas e é reduzido a NADH. Esta

mudança no estado redox é importante para a função mitocondrial, conectando o ciclo TCA à cadeia transportadora de elétrons, com o NADH doando o primeiro elétron para a produção de ATP. As enzimas da família Sirtuina (HDAC Classe III) são reguladas por NAD^+/NADH e por sua vez regulam fortemente o metabolismo da glicose, de tal forma que camundongos que não expressam *Sirt6* apresentam intensa atividade de glicólise, o que desencadeia hipoglicemia fatal em uma idade precoce (Zhong *et al.*, 2010). Curiosamente, o lactato, um produto do metabolismo do embrião pós-compactação, também é conhecido por inibir HDACs (Latham *et al.*, 2012). Com a forte dependência da disponibilidade de acetilCoA e NAD^+, presume-se que pequenas alterações na função mitocondrial, e/ou alterações do estado redox poderiam alterar dramaticamente o *status* de acetilação de histonas no embrião inicial. A acetilação remove a carga positiva das histonas, alterando a interação das suas caudas com o DNA carregado negativamente, relaxando a estrutura da cromatina, promovendo a transição de heterocromatina para eucromatina, e posteriormente, a transcrição (Verdone *et al.*, 2005). Dada a importância da ativação do genoma embrionário e o início da transcrição pelo genoma do embrião durante o desenvolvimento pré-implantacional, é concebível que pequenas perturbações no metabolismo, como as observadas nas técnicas de reprodução assistida, como o cultivo *in vitro* e a superestimulação hormonal, podem alterar a dinâmica de desenvolvimento, assim como a ativação do genoma embrionário.

Talvez a modificação epigenética descrita mais recentemente e menos caracterizada seja a O-glicosilação. A O-glicosilação é uma modificação pós-traducional sensível à disponibilidade de nutrientes e que envolve a adição enzimática de O-N-acetilglucosamina (O-GlcNAc) em serinas e treoninas, de uma maneira semelhante à fosforilação, nas caudas de histona, bem como em várias outras proteínas modificadoras da cromatina (Zhang *et al.*, 2011). Esta modificação é adicionada às caudas das histonas pelas enzimas modificadoras de DNA da família TET, as quais são também relacionadas ao metabolismo (descrito acima; Chen *et al.*, 2013.). Apesar desta modificação não estar ainda bem caracterizada, sabe-se que ela está envolvida com outros reguladores da transcrição como a RNA polimerase II, competindo com a fosforilação para modificar o domínio C-terminal (DCT) da enzima, bem como a complexos de histonas-metiltransferases, histonas-desacetilases e o complexo repressivo Polycomb (revisado em Hanover *et al.*, 2012). A adição desta molécula através da enzima O N-acetilglucosamina transferase (OGT) é regulada pela via de biossíntese da hexosamina, que converte glicose em hexoses, e que é sensível à concentração de nutriente ou de glicose (Obici *et al.*, 2002). Este tipo de modificação fornece um mecanismo direto pelo qual a disponibilidade de nutrientes e metabólitos pode alterar diretamente a estrutura e organização da cromatina. Deste modo, alterações na disponibilidade de nutrientes, e pequenas mudanças no metabolismo no embrião inicial podem alterar drasticamente o perfil epigenético, e assim, a trajetória do embrião.

Além das modificações covalentes que ocorrem na cromatina, alterações não-covalentes, reguladas por outros complexos remodeladores de cromatina, são capazes de mover, retirar ou reestruturar os nucleossomos. Eles usam ATPases dependentes de DNA, e portanto, necessitam de ATP como um co-fator para regular a transcrição (Varga-Weisz, 2001). Com as fontes de ATP alterando-se da fosforilação oxidativa no início do desenvolvimento, para a glicólise posteriormente, ainda não está claro como esses processos são regulados no embrião inicial, mas sem dúvida isto será o foco das pesquisas daqui em diante.

O interactoma: o metabolismo está alterando o estoque e a estabilidade do RNA no embrião pré-implantacional?

O estresse no embrião inicial pode gerar vários problemas, incluindo perda embrionária, deformidades e um conjunto de desordens na vida adulta. No entanto, os mecanismos pelos quais o estresse impacta negativamente o embrião a longo prazo permanecem em sua maioria desconhecidos. Transcrição *de novo* não ocorre durante a maturação do ovócito ou no primeiro ciclo celular em camundongo. É provável que as proteínas necessárias para a reprogramação global do embrião inicial são traduzidas a partir de RNAm produzidos e armazenados durante a ovogênese. Especificamente, o zigoto precisa mudar da divisão meiótica para a mitótica e reprogramar o genoma haplóide especializado, de gameta, para um genoma diplóide totipotente (Messerschmidt *et al.*, 2014). Além disso, o zigoto deve retomar o ciclo celular mitótico, remodelar as cromatinas materna e paterna (incluindo a troca de protamina para histona no genoma paterno), ativar a transcrição e iniciar o programa de desenvolvimento embrionário. Há evidências de que os RNAm maternos são armazenados durante a ovogênese num estado inativo até que sejam recrutados para a tradução (Oh *et al.*, 2000). Um mecanismo proposto pelo qual isto podeocorrer é através do alongamento da cauda poli(A) (Piko e Clegg, 1982; Latham *et al.*, 1991). É muito provável que existam outros mecanismos, que podem incluir proteínas ligantes de RNA, modificação de RNA e outras interações complexas de ácido nucleico (por exemplo, lncRNAs).

Apesar da importância destes eventos iniciais, há muito pouca informação detalhada sobre eles no embrião inicial, provavelmente relacionado às dificuldades em trabalhar com uma célula individual e transcricionalmente inativa. Está claro que uma rede de regulação fina controlando a quantidade espacial e temporal de RNAs, bem como prevenindo a perda de RNA ou tradução prematura, deve estar presente no embrião inicial para garantir o sucesso reprodutivo. Em

adição à vulnerabilidade de inatividade transcricional, o embrião pré-implantação encontra-se numa janela temporal de simplicidade epigenética, com remoção ativa e passiva da programação específica de célula germinativa, objetivando reesstabelecer a totipotência (Smith *et al.*, 2014). O embrião, incapaz de gerar uma resposta envolvendo a transcrição de novas vias durante situações "estressantes", provavelmente é exigido a dar ao máximo do seu atual estado metabólico e do seu reservatório de mRNA, para se adequar a situações hostís (por exemplo, infecção, estresse hiperglicemiante, estresse oxidativo). Esta idéia é suportada pela "hipótese do embrião lento", a qaul propõe que o embrião mais competente para se desenvolver é o que possui uma atividade metabólica eficiente, mas não elevada (Leese, 2002). Um exemplo disto é o cultivo *in vitro*; embriões produzidos *in vitro* são mais metabolicamente ativos, e como tal, mais "estressados" do que os embriões produzidos *in vivo.*

Várias enzimas que já foram caracterizadas apenas como enzimas metabólicas passaram a ser descritas como moléculas ligantes de RNA. Enzimas envolvidas na glicólise e na via da pentose fosfato incluindo gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), aldolase, lactato desidrogenase (LDH), fosfoglicerato-quinase (PGK) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) são agora conhecidas por se ligarem a transcritos que incluem, mas não se limitam a, transportadores de glicose (McGowan e Pekala, 1996), reguladores imunológicos (GMCSF; Pioli *et al.*, 2002), IFNα e IL2 (Nagy e Rigby, 1995) e tRNA e rRNA (Ryazanov, 1985; Singh e Green, 1993; revisado em Ciesla, 2006). Um trabalho científico de referência na área de RNA desenvolveu e utilizou "interactoma de captura", um processo de ligação/associação de todos os RNAs de uma célula num dado momento, aos seus parceiros proteicos. Utilizando esta tecnologia, foram categorizadas famílias de proteínas ligantes de RNA, as quais tinham sido até recentemente, apenas caracterizadas como enzimas metabólicas funcionais (Castello *et al.*, 2012). Além de enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos, aminoácidos, lipídeos e nucleotídeos, dezoito das enzimas ligantes de RNA utilizam NAD^+, $NADP^+$, NADH, NADPH, FAD ou $FADH_2$ como co-fatores, e dez destas compartilharam a capacidade de se ligar a ATP e a um substrato aniônico como succinato, L-aspartato ou piruvato (Castello *et al.*, 2012). Uma hipótese de uma rede envolvendo RNA, enzimas e metabolitos propõe que se estas interações são funcionalmente relevantes, então estas proteínas poderiam conectar amplamente o metabolismo, a biologia do RNA e a regulação gênica pós-transcricional.

Isto levanta a possibilidade de que em situações de um estado metabólico alterado, quer por manipulação farmacêutica ou em resposta a fatores de estresse, o embrião pode lançar mão de enzimas metabólicas em suas funções de proteínas ligantes de RNA para responder metabolicamente ao estresse. Isto pode resultar na perda do estoque de RNA ou em tradução imatura. Este novo conceito oferece um mecanismo pelo qual um insulto metabólico agudo poderia influenciar negativamente a trajetória do desenvolvimento embrionário, tanto a curto quanto a longo prazo, por alterar o controle da estabilidade do RNA e a tradução.

Conclusão

Estamos num momento fascinante para a pesquisa com embriões pré-implantação, evidenciando vários campos da biologia conectando metabolismo e epigenética. Com os avanços tecnológicos permitindo análises do epigenoma e do metaboloma em uma célula individual, o campo da metabologenômica de embriões provavelmente florescerá nos próximos anos. A compreensão dos mecanismos pelos quais estes dois sistemas se interconectam possivelmente revelará os meios pelos quais as interações gene-ambiente regulam a herança transgeracional de saúde e doença, estabelecida durante os primeiros dias de vida.

Referências

Bannister AJ,Kouzarides T. 2011. Regulation of chromatin by histone modifications.*Cell Res*, 21:381-395.

Baumann CG, Morris DG, Sreenan JM,Leese HJ. 2007. The quiet embryo hypothesis: molecular characteristics favoring viability.*Mol Reprod Dev*, 74:1345-1353.

Beaujean N. 2014a. Epigenetics, embryo quality and developmental potential.*Reprod Fertil Dev*, 27:53-62.

Beaujean N. 2014b. Histone post-translational modifications in preimplantation mouse embryos and their role in nuclear architecture.*Mol Reprod Dev*, 81:100-112.

Biggers JD, Borland RM, Powers RD. 1977. Transport mechanisms in the preimplantation mammalian embryo.*Ciba Found Symp*, (52):129-153.

Borland RM, Biggers JD,Lechene CP. 1977a. Fluid transport by rabbit preimplantation blastocysts in vitro. J Reprod Fertil, 51:131-135.

Borland RM, Biggers JD, Lechene CP. 1977b. Studies on the composition and formation of mouse blastocoele fluid using electron probe microanalysis.*Dev Biol*, 55:1-8.

Burton GJ, Jauniaux E,Charnock-Jones DS. 2010. The influence of the intrauterine environment on human placental development.*Int J Dev Biol*, 54:303-312.

Butcher L, Coates A, Martin KL, Rutherford AJ,Leese HJ. 1998. Metabolism of pyruvate by the early human embryo.*Biol Reprod*, 58:1054-1056.

Cairns RA, Harris IS, Mak TW. 2011. Regulation of cancer cell metabolism.*Nat Rev Cancer*, 11:85-95.

Cartwright JE, Fraser R, Leslie K, Wallace AE,James JL. 2010. Remodelling at the maternal-fetal interface: relevance to human pregnancy disorders.*Reproduction*, 140:803-813.

Castello A, Fischer B, Eichelbaum K, Horos R, Beckmann BM, Strein C, Davey NE, Humphreys DT, Preiss T, Steinmetz LM, Krijgsveld J,Hentze MW. 2012. Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins.*Cell*, 149:1393-1406.

Chen Q, Chen Y, Bian C, Fujiki R,Yu X. 2013. TET2 promotes histone O-GlcNAcylation during gene transcription.*Nature*, 493(7433):561-564.

Choudhary C, Kumar C,Gnad F, Nielsen ML, Rehman M, Walther TC, Olsen JV, Mann M. 2009. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions.*Science*, 325(5942):834-840.

Ciesla J. 2006. Metabolic enzymes that bind RNA: yet another level of cellular regulatory network?*Acta Biochim Pol*, 53:11-32.

Gardner DK, Leese HJ. 1988. The role of glucose and pyruvate transport in regulating nutrient utilization by preimplantation mouse embryos. *Development*, 104:423-429.

Gardner DK,Lane M. 1993. Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture.*Biol Reprod*, 48:377-385.

Gardner DK, Wale PL, Collins R,Lane M. 2011. Glucose consumption of single post-compaction human embryos is predictive of embryo sex and live birth outcome.*Hum Reprod*, 26:1981-1986.

Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. 2007. Epigenetics: a landscape takes shape.*Cell*, 128:635-638.

Gu TP, Guo F, Yang H, Wu HP, Xu GF, Liu W, Xie ZG, Shi L, He X, Jin SG., Iqbal K, Shi YG, Deng Z,Szabo PE, Pfeifer GP, Li J,Xu GL. 2011. The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes.*Nature*, 477(7366):606-610.

Gutnisky C, Dalvit GC, Thompson JG,Cetica PD. 2014. Pentose phosphate pathway activity: effect on in vitro maturation and oxidative status of bovine oocytes.*Reprod Fertil Dev*, 26:931-942.

Hanover JA, Krause MW, Love DC. 2012. Bittersweet memories: linking metabolism to epigenetics through O-GlcNAcylation.*Nat Rev Mol Cell Biol*, 13:312-321.

Iyer LM, Tahiliani M, Rao A, Aravind L. 2009. Prediction of novel families of enzymes involved in oxidative and other complex modifications of bases in nucleic acids.*Cell Cycle*, 8:1698-1710.

Krisher RL,Prather RS. 2012. A role for the Warburg effect in preimplantation embryo development: metabolic modification to support rapid cell proliferation.*Mol Reprod Dev*, 79:311-320.

Lane M, Gardner DK. 2000. Lactate regulates pyruvate uptake and metabolism in the preimplantation mouse embryo.*Biol Reprod*, 62:16-22.

Latham KE, Solter D, Schultz RM. 1991. Activation of a two-cell stage-specific gene following transfer of heterologous nuclei into enucleated mouse embryos.*Mol Reprod Dev*, 30:182-186.

Latham T, Mackay L, Sproul D, Karim M, Culley J, Harrison DJ, Hayward L, Langridge-Smith P, Gilbert N, Ramsahoye BH. 2012. Lactate, a product of glycolytic metabolism, inhibits histone deacetylase activity and promotes changes in gene expression.*Nucleic Acids Res*, 40:4794-4803.

Leese HJ. 1995. Metabolic control during preimplantation mammalian development.*Hum Reprod Update*, 1:63-72.

Leese HJ. 2002. Quiet please, do not disturb: a hypothesis of embryo metabolism and viability.*Bioessays*, 24:845-849.

Martinez-Pastor B, Cosentino C,Mostoslavsky R. 2013. A tale of metabolites: the cross-talk between chromatin and energy metabolism.*Cancer Discov*, 3:497-501.

Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele R,Haaf T. 2000. Demethylation of the zygotic paternal genome.*Nature*, 403(6769):501-502.

McGowan K, Pekala PH. 1996. Dehydrogenase binding to the 3'-untranslated region of GLUT1 mRNA.*Biochem Biophys Res Commun*, 221:42-45.

McLay DW,Clarke HJ. 2003. Remodelling the paternal chromatin at fertilization in mammals.*Reproduction*, 125:625-633.

Messerschmidt DM, Knowles BB, Solter D. 2014. DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos.*Genes Dev*, 28:812-828.

Morgan HD, Santos F, Green K, Dean W, Reik W. 2005. Epigenetic reprogramming in mammals.*Hum Mol Genet*, 14(spec no.1):R47-58.

Morgan HD, Jin XL, Li A, Whitelaw E, O'Neill C. 2008. The culture of zygotes to the blastocyst stage changes the postnatal expression of an epigentically labile allele, agouti viable yellow, in mice. *Biol Reprod*, 794:618-623.

Nagy E,Rigby WF. 1995. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase selectively binds AU-rich RNA in the NAD(+)-binding region (Rossmann fold).*J Biol Chem*, 270:2755-2763.

North BJ,Verdin E. 2004. Sirtuins: Sir2-related NAD-dependent protein deacetylases.*Genome Biol*, 5:224.

O'Fallon JV, Wright RW Jr. 1986. Quantitative determination of the pentose phosphate pathway inpreimplantation mouse embryos.*Biol Reprod*, 34:58-64.

Obici S, Wang J, Chowdury R, Feng Z, Siddhanta U, Morgan K,Rossetti L. 2002. Identification of a biochemical link between energy intake and energy expenditure.*J Clin Invest*, 109:1599-1605.

Oh B, Hwang S, McLaughlin J, Solter D,Knowles BB. 2000. Timely translation during the mouse oocyte-to-embryo transition.*Development*, 127:3795-3803.

Piko L,Clegg KB. 1982. Quantitative changes in total RNA, total poly(A), and ribosomes in early mouse embryos.*Dev Biol*, 89:362-378.

Pioli PA, Hamilton BJ, Connolly JE, Brewer G,Rigby WF. 2002. Lactate dehydrogenase is an AU-rich element-binding protein that directly interacts with

AUF1.*J Biol Chem*, 277:35738-35745.

Purcell SH, Moley KH. 2009. Glucose transporters in gametes and preimplantation embryos.*Trends Endocrinol Metab*, 20:483-489.

Reik W, Santos F, Mitsuya K,Morgan H,Dean W. 2003. Epigenetic asymmetry in the mammalian zygote and early embryo: relationship to lineage commitment?*Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 358(1436):1403-1409; discussion 1409.

Reytor E, Perez-Miguelsanz J, Alvarez L, Perez-Sala D,Pajares MA. 2009. Conformational signals in the C-terminal domain of methionine adenosyltransferase I/III determine its nucleocytoplasmic distribution.*FASEB J*, 23:3347-3360.

Ryazanov AG. 1985. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is one of the three major RNA-binding proteins of rabbit reticulocytes.*FEBS Lett*, 192:131-134.

Santos F, Peters AH, Otte AP, Reik W, Dean W. 2005. Dynamic chromatin modifications characterise the first cell cycle in mouse embryos.*Dev Biol*, 280:225-236.

Shi L, Wu J. 2009. Epigenetic regulation in mammalian preimplantation embryo development.*Reprod Biol Endocrinol*, 7:59.

Singh R,Green MR. 1993. Sequence-specific binding of transfer RNA by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.*Science*, 259(5093):365-368.

Smith ZD, Chan MM, Humm KC, Karnik R, Mekhoubad S, Regev A, Eggan K, Meissner A. 2014. DNA methylation dynamics of the human preimplantation embryo.*Nature*, 511(7511):611-615.

Stojanov T,O'Neill C. 2001. In vitro fertilization causes epigenetic modifications to the onset of gene expression from the zygotic genome in mice.*Biol Reprod*, 64:696-705.

Turner K, Martin KL, Woodward BJ, Lenton EA, Leese HJ. 1994. Comparison of pyruvate uptake by embryos derived from conception and non-conception natural cycles.*Hum Reprod*, 9:2362-2366.

van der Heijden GW, Dieker JW, Derijck AA, Muller S, Berden JH, Braat DD, van der Vlag J,de Boer P. 2005. Asymmetry in histone H3 variants and lysine methylation between paternal and maternal chromatin of the early mouse zygote.*Mech Dev*, 122:1008-1022.

Van Winkle LJ. 2001. Amino acid transport regulation and early embryo development.*Biol Reprod*, 64:1-12.

Varga-Weisz P. 2001. ATP-dependent chromatin remodeling factors: nucleosome shufflers with many missions.*Oncogene*, 20:3076-3085.

Verdone L, Caserta M,Di Mauro E. 2005. Role of histone acetylation in the control of gene expression.*Biochem Cell Biol*, 83:344-353.

Wales RG,Du ZF. 1993. Contribution of the pentose phosphate pathway to glucose utilization by preimplantation sheep embryos.*Reprod Fertil Dev*, 5:329-340.

Wang L, Zhang J, Duan J, Gao X, Zhu W, Lu X, Yang L, Zhang J, Li G, Ci W, Li W, Zhou Q, Aluru N, Tang F, He C, Huang X,Liu J. 2014. Programming and inheritance of parental DNA methylomes in mammals.*Cell*, 157:979-991.

Wellen KE, Hatzivassiliou G,Sachdeva UM, Bui TV, Cross JR, Thompson CB. 2009. ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation.*Science*, 324(5930):1076-1080.

Wossidlo M, Nakamura T, Lepikhov K, Marques CJ, Zakhartchenko V, Boiani M, Arand J, Nakano T,Reik W,Walter J. 2011. 5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming.*Nat Commun*, 2:241.

Zhang S, Roche K, Nasheuer HP,Lowndes NF. 2011. Modification of histones by sugar beta-N-acetylglucosamine (GlcNAc) occurs on multiple residues, including histone H3 serine 10, and is cell cycle-regulated.*J Biol Chem*, 286:37483-37495.

Zhong L, D'Urso A, Toiber D, Sebastian C, Henry RE, Vadysirisack DD, Guimaraes A, Marinelli B, Wikstrom JD, Nir T, Clish CB, Vaitheesvaran B, Iliopoulos O, Kurland I, Dor Y, Weissleder R, Shirihai OS, Ellisen LW, Espinosa JM,Mostoslavsky R. 2010. The histone deacetylase Sirt6 regulates glucose homeostasis via Hif1alpha.*Cell*, 140:280-293.

Desafios da pesquisa envolvendo interações embrião-patógenos

J.A. Gard[1]

[1]Auburn University College of Veterinary Medicine, Department of Clinical Science, Auburn, AL, USA.

Resumo

No final dos anos 1970, foi iniciada a pesquisa de agentes patogênicos de embriões. A princípio, era grande o *montante disponibilizado* para *financiamento* dos grupos envolvidos na pesquisa destes agentes. No entanto, após anos de pesquisa e desenvolvimento em procedimentos para processamento de embriões competentes, aprovados pela International Embryo Transfer Society (IETS), desenvolveu-se uma crescente crença de que a transferência de embriões (TE) seria intrinsecamente segura e assim o financiamento da investigação de patógenos de embriões diminuiu significantemente. Mesmo com o crescimento contínuo da indústria de TE e, especificamente, com grandes mudanças que envolvem as tecnologias *in vitro* e surtos recentes envolvendo patógenos de interesse, o financiamento da pesquisa de TE não tem sido uma prioridade e/ou uma área de foco para as agências de fomento nos últimos anos. As questões de financiamento não são o único desafio na pesquisa de agentes patogênicos de embriões, mas são primordiais, uma vez que nenhuma pesquisa pode ser realizada sem isto. Alguns destes desafios adicionais incluem um grande número e variedade de patógenos que necessitam ser sistematicamente investigados, incluse patógenos novos e reemergentes, a utilização de produtos de origem animal que tenham o potencial de abrigar e transmitir patógenos, a capacidade de agentes patogênicos para se adaptar e mudar os seus hospedeiros e ambiente, resultando na variação de afinidade e virulência; testes confiáveis para a detecção destes patógenos e necessidade de pessoal treinado para realizar estudos, coletar e interpretar dados e que tenham habilidades de trabalhar com patógenos zoonóticos. Este trabalho revisa estes atuais desafios enfrentados na pesquisa de patógenos de embriões.

Palavras chave: patógenos de embriões, embriões produzidos *in vitro*, embriões produzidos *in vivo*.

Introdução

As técnicas utilizadas para a obtenção não-cirúrgica de embriões; incluindo a coleta, a criopreservação e a transferência não cirúrgica de embriões bovinos produzidos *in vivo*, rapidamente evoluiram para um processo comercial bastante utilizado. Posteriormente, embriões foram também disponibilizados para o comércio internacional. Isto criou preocupações com relação às doenças, que poderiam ser inadvertidamente transmitidas através da transferência de embriões (TE). Foi incentivado então o estabelecimento de protocolos para assegurar a remoção e a prevenção da adesão destes agentes patogênicos nos embriões. Adicionalmente, foram elaboradas regulamentações padronizadas para a circulação de embriões, visando minimizar o potencial de transmissão de patógenos; além de ser concluída uma grande quantidade de estudos para testar estes protocolos e procedimentos. Criou-se assim uma boa dose de confiança nos procedimentos para o processamento padrão que tem, em alguns casos, resultado na complacência na pesquisa sobre agentes patogênicos de embriões. No entanto, mais investigações são essenciais para garantir a segurança da transferência de embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* (PIV), bem como de embiões clonados. Portanto, o objetivo deste artigo é discutir os atuais desafios que envolvem a pesquisa de agentes patogênicos de embriões.

Desenvolvimento de pesquisas, regulamentações e financiamento

Desde o final dos anos 1970, a preocupação com a inadvertida transmissão de doenças através dos embriões e os consequentes surtos de doenças infecciosas, envolvendo a interação destes com patógenos, gerou a necessidade de pesquisas de tais agentes. Especificamente, considerou-se que o intercâmbio internacional de embriões precisaria ser regulado para a prevenção de doenças animais exóticos, em países livres destas. Da década de 1970 até meados dos anos 1990 houve uma quantidade significativa de financiamento disponível para a pesquisa de agentes patogênicos em embriões, viabilizado por entidades governamentais, como o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos e por outros órgãos reguladores, em outros países.

Inicialmente, havia uma ausência de requisitos uniformizados para a importação deste material, o que levou países importadores a desenvolver, muitas vezes, procedimentos de certificação de saúde embrionária caros, burocráticos e até arbitrários. Regulamentos internacionais exigiam, por exemplo, que rebanhos e/ou países nos quais as doadoras residiam, fossem livres de todas as doenças de preocupação potencial para os países importadores (Waters, 1981). Outros regulamentos determinavam que as doadoras de embriões deveriam ser alojadas em instalações isoladas por um determinado período depois de serem testadas e certificadas como livres de uma variedade de doenças infecciosas. Além disso, era exigido que os rebanhos de receptoras de embriões fossem isolados durante toda a gestação no país destino e que, após o nascimento, estas e sua crias fossem testadas de maneira semelhante para

[1]Autor correspondente: waldrja@auburn.edu

confirmar a ausência de várias doenças. Assim, havia uma grande necessidade de se desenvolver procedimentos sanitários para coleta e processamento, que poderiam funcionar como formas de certificação de saúde "de amplo espectro". No entanto, pouca pesquisa e dados estavam disponíveis para determinar o que era necessário e havia poucas evidências experimentais para confirmar as crenças (Atwell, 1987). Esta situação estava produzindo um ambiente gravemente prejudicial ao trânsito internacional de embriões e acabou gerando o estímulo necessário para o financiamento de pesquisas essenciais nesta área. Especificamente, foi necessária pesquisa para testar a crença de que embriões de bovinos produzidos *in vivo*, com a zona pelúcida intacta (ZP-I) não eram passíveis de transmitir doenças infecciosas, se devidamente tratados e processados, mesmo se originados de doadoras de "países infectados".

Abordagens experimentais

As hipóteses experimentais iniciais eram que, se o embrião possuisse a zona pelúcida intacta e se fosse adequadamente manipulado, isto iria proteger o concepto inicial dos agentes infecciosos e a transmissão de doenças pelos embriões seria mínima (Stringfellow *et al.*, 2004; Givens *et al.*, 2007). A hipótese nula era de que as doenças poderiam ser transmitidas por transferência de embriões. Ela foi determinada a fim de proporcionar consistência nos estudos, permitindo que os dados pudessem ser comparáveis e quatro abordagens principais foram delineadas e utilizadas (Bowen *et al.*, 1978; Archbald *et al.*, 1979; Hare, 1990). Na primeira abordagem, embriões ZP-I recuperados a partir de dadoras livres de organismos patogênicos foram artificialmente expostos *in vitro* a uma variedade de agentes patogênicos, que eram de interesse nacional ou internacional. Os embriões foram submetidos a protocolos de limpeza e, em seguida, subsequentemente testados *in vitro* para o agente patogênico em questão. A segunda abordagem foi muito semelhante com a exceção de que após a exposição experimental do embrião ao patógeno ou patógenos, os embriões foram transferidos para receptoras (sentinelas) livres de doenças. As receptoras foram subsequentemente observadas e testadas juntamente com as suas crias para a presença do agente. A terceira abordagem era coletar embriões ZP-I de doadoras infectadas, lavá-los e, posteriormente, testar os embriões para patógenos. A quarta abordagem foi a de coletar novamente os embriões ZP-I de doadoras infectadas e, em seguida, transferir os embriões lavados para receptoras (sentinelas) livres de doença, que junto com as crias, foram então observadas e testadas para os agentes de doenças. O objetivo era que cada agente patogênico de interesse passaria por esta ampla série de experimentos, utilizando cada uma das quatro abordagens. Assim, a análise dos dados coletados a partir destes estudos, envolvendo os agentes patogênicos específicos, poderia ser essencialmente conclusiva e a probabilidade de transmissão do agente patogênico através da TE, seria conhecida.

Embora este plano parecesse ser abrangente, havia lacunas relacionadas à confiabilidade dos testes disponíveis. Além disso, o correto controle das variáveis e a interpretação das provas apresentadas na população testada era sempre motivo de preocupação. Embora tenha havido uma diminuição no número de novos estudos que envolvam embriões ao longo da última década, houve um grande aumento do número e tipo de tecnologias disponíveis para a determinação da presença de um ou vários patogénos em sistemas de cultivo. Além disso, a sensibilidade dos ensaios disponíveis também aumentou dramaticamente. O RT-qPCR que foi utilizado nos estudos acima mencionados é representativo da capacidade que os ensaios atuais possuem para determinar a presença de agentes patogênicos específicos ao ponto em que as concentrações detectadas podem estar abaixo do que seria, na verdade, uma dose infectante. O desenvolvimento de numerosos ensaios utilizados para o rastreamento, a detecção e a quantificação de agentes patogênicos específicos tem sido prolífico. Os ensaios têm sido desenvolvidos por uma série de razões, incluindo a sua aplicação em programas de erradicação e/ou para serem utilizados como uma ferramenta de investigação para os agentes patogênicos de maior preocupação, tal como BVDV, e BHV-19 (Marley *et al.*, 2008; Gard *et al.*, 2009; Gregg *et al.*, 2009). No entanto, estas técnicas exigem que os indivíduos tenham treinamento adequado e que sejam atentos a detalhes, a fim de evitar resultados falso negativo ou falso positivo, que levam à conclusões errôneas.

Patógenos avaliados

Uma variedade de agentes patogênicos tem sido estudada, embora ainda exista vários outros que ainda não e que necessitam de mais informação. A maior ênfase para estudo foi colocada sobre patógenos de interesse regulatório para o comércio doméstico ou internacional, incluindo vírus da língua azul, encefalopatia espongiforme bovina, *Brucella abortus*, vírus da leucose bovina enzoótica, vírus da febre aftosa e vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (herpesvirus bovino-1). Doença de *Aujeszky* em suínos e o agente do *scrapie* em ovinos foram também objetos de estudos aprofundados. Os procedimentos de lavagem de embriões originalmente desenvolvidos e validados em numerosos estudos serviram de base para os processos de manipulação de embriões comumente aceitos (também conhecidos como lavagem de embriões e tratamento com tripsina), que são recomendados hoje para a certificação sanitária de embriões produzidos in vivo (Bowen *et al.*, 1979; Singh *et al.*, 1987; Thibier e Nibart, 1987; Stringfellow e Wright, 1989; Wrathall, *et al.*, 1995; Stringfellow, 2010).

Além disso, muitos dos agentes patogênicos

que foram avaliados no início originaram-se de cepas de laboratório, que podem ser muito diferentes das cepas selvagens. Certos agentes patogênicos sofrem, regularmente, mutações durante a replicação, tal como o vírus da diarreia viral bovina (BVDV), que se transforma cada vez que se replica. Assim, os primeiros experimentos que utilizaram cepas laboratoriais não avaliaram um espectro suficiente de cepas de BVDV. Relatos de Lindberg e Drew (Lindberg et al, 2000; Drew et al, 2002) estimularam novas investigações para a possibilidade de transmissão do BVDV através da TE devido à soroconversão de novilhas, após transferência de embriões e o nascimento de um bezerro PI após a TE, respectivamente. Propôs-se que o Soro Fetal Bovino (SFB) contaminado foi a causa destas infecções. Assim, estudos adicionais foram necessários para determinar se diferentes cepas de BVDV iriam permanecer associadas com o BVDV após os procedimentos padrão IETS para embriões produzidos *in vivo* e se estes vírus associados poderiam ser transmitidos através da TE. Foram realizados estudos que destacaram a variação na afinidade entre diferentes cepas de BVDV e a afinidade destas cepas pelos embriões (Waldrop *et al.*, 2004a, b). Algumas cepas mantiveram a associação com embriões após procedimentos da IETS, incluindo-se quando o tratamento com tripsina foi adicionado ao processamento (Waldrop *et al.*, 2004a,b). Estas cepas de elevada afinidade tornaram-se uma maior preocupação quando foi determinado que os vírus associados ao embrião foram realmente infectantes, tanto nos estudos *in vitro* como em estudos *in vivo* (Waldrop *et al.*, 2004b, 2005). Em estudo recente de Gard *et al.* (2009) foi relatado que 27% dos embriões produzidos *in vivo* e 42% dos embriões PIV apresentaram virus associados ao embrião (VAE), após a exposição artificial para uma cepa de elevada afinidade de BVDV (SD-1, tipo 1a) seguindo os procedimentos de lavagem, de acordo com a IETS (sem tripsina). Verificou-se ainda que, a quantidade de VAE foi 100 a 450 vezes a doses infectante para 50% das células em cultivo (CCID50)/embrião (Gard *et al.*, 2009). Em estudos anteriores, VAE também foram determinados como sendo infecciosos num sistema de cultivo *in vitro* e num *modelo in vivo*, através de uma inoculação intravenosa de embriões e, em seguida, em uma inoculação intrauterina de embriões e 898 (CCID50) de BVDV (SD-1, tipo 1a) em receptoras negativas para o virus e para o anticorpo viral (Waldrop *et al.*, 2004b, 2005; Gard *et al.*, 2009, 2010). Verificou-se que todas as receptoras de embriões/vírus apresentaram viremia, e, em seguida, sofreram soroconversão (Waldrop *et al.*, 2005; Gard *et al.*, 2009, 2010).

A constatação, nestes estudos, de que nenhuma prole positiva para BVDV foi produzida, é semelhante aos resultados encontrados por Bielanski *et al.* (1998). Neste estudo, embriões produzidos *in vitro* foram expostos a biotipos não citopáticos de BVDV sendo a cepa tipo 2 (P-131) ou tipo 1 (NY-1), durante 1 h, e, em seguida, foram lavados em conformidade com as diretrizes IETS (sem tratamento com tripsina) e, em seguida, transferidos para receptoras negativas (virus e anticorpos) para BVDV. No entanto, nenhuma das receptoras sofreram soroconversão após a transferência intrauterina de embriões expostos à cepa tipo 1 mas, das 35 receptoras que receberam embriões expostos à cepa tipo 2, 18 sofreram soroconversão (51%) e houve 11 gestações confirmadas em 30 dias após a transferência, mas destas, apenas duas resultaram em prole viva. Estas duas crias foram determinadas como sendo BVDV negativas e soronegativas. Assim, a infecção pareceu não ser reconhecida pelo feto e/ou o vírus foi destruído antes do desenvolvimento da competência imunológica, ou então, anticorpos não foram produzidos pelo feto. Os resultados de soroconversão não detectável a partir da cepa tipo 1 e os abortos devido ao BVDV tipo 2 podem ser o resultado de mutações no vírus ou o teste aplicado poderia ter produzido falsos negativos. Em um estudo realizado por Meyers *et al.* (2007), a redução na produção de interferon, o aborto e a presença de vírus em tecidos fetais não ocorreram quando fêmeas bovinas gestantes foram injetadas com duas cepas diferentes de vírus mutantes. Cada uma destas cepas mutantes tinham mutações que afetam especificamente tanto a protease do terminal N (N (Pro)) quanto a deleção do codon 349, o que anula a atividade de RNAase da glicoproteina estrutural (E(rns); Meyers *et al.*, 2007). No entanto, a diminuição da produção de interferon, o aborto e a presença de vírus em tecidos fetais não ocorreram com o vírus do tipo selvagem e em vírus em que apenas uma mutação ou de N (pro) ou de E (rns) ocorreu (Meyers *et al.*, 2007). Portanto, o estabelecimento de infecções persistentes requer ambos N (pro) e E (rns). É lógico se pensar que a cepa tipo 1 utilizada no estudo de Bielanski poderia ter tido mutações nestas áreas, resultando na produção de interferon adequada e nenhuma infecção fetal. Cada cepa específica pode afetar a produção de interferon de modo diferente e, portanto, pode ou não resultar em infecção do feto e a infecção fetal pode ou não ser fatal. Uma avaliação completa é importante, uma vez que a capacidade de transmitir BVDV através de um embrião iria gerar a necessidade de reavaliação dos procedimentos de certificação sanitária de embriões, juntamente com a implementação de regulamentações adicionais sobre embriões exportados de países que tem BVDV para aqueles onde esta doença foi erradicada. Assim, a BVDV é um bom exemplo dos desafios enfrentados pela pesquisa de patógenos em embriões, como são as mutações e variações intra-patógeno.

A Scrapie Clássica e a Atípica representam outro exemplo de variações intra-patógenos, que podem confundir os resultados de pesquisa quando eles são tratados como iguais. Estudos têm demonstrado que Scrapie Clássica pode ser transmitida dentro e entre os rebanhos por várias vias e que a transmissão, pode ocorrer quando se utiliza a TE (Detwiler e Baylis, 2003 Andreoletti *et al.*, 2011). No entanto, casos secundários envolvendo Scrapie Atípica são raros (Fediaevsky *et al.*,

2009, 2010; Garza *et al.*, 2011) e baixa transmissividade foi observada entre ovelhas em estudos de caso controlados (Fediaevsky *et al.*, 2009, 2010; Garza *et al.*, 2011), mas pesquisas posteriores estão sendo realizadas (Hopp *et al.*, 2006). Além disso, Scrapie Atípica só é detectável no tecido cerebral e não no sistema linfo-reticular por isso, assume-se que ela possui um risco diminuído de transmissão através da TE, quando comparada com a Scrapie Clássica (Wrathall *et al.*, 2008; Garza *et al.*, 2011; Ligios *et al.*, 2011). Scrapie Classica foi detectada em fetos de ovelhas afetadas pelo Scrapie (Nicholson *et al.*, 2008; Garza *et al.*, 2011) e sêmen de carneiros também infectados por este patógeno (Rubenstein *et al.*, 2012), o que torna a infecção de embriões uma possibilidade significativa se esses embriões não são processados de acordo com as diretrizes da IETS para embriões produzidos *in vivo* (Stringfellow *et al.*, 2010). No entanto, se os embriões são tratados em conformidade com as normas da IETS para embriões produzidos *in vivo*, haveria uma chance insignificante para a transmissão da Scrapie Classica em ovinos, uma vez que esta é uma doença de categoria 1 de acordo com a OIE (Organização Mundial de Saúde Animal. Stringfellow *et al.*, 2010). O capítulo 4.7.14 do código da OIE (OIE et al, 2014A, b) não inclui a Scrapie Atípica porque ela é conhecida por ser diferente da Scrapie Clássica. Por isso, foi sugerido à OIE pelo subcomitê HASAC, que a Scrapie Atípica deve ser descrita como uma doença de categoria 3, já que mais pesquisas são necessárias para se determinar completamente o risco de transmissão, mesmo que esta apareça nas avaliações como tendo menos potencial para a transmissão via embriões.

Embriões produzidos *in vitro*

Além disso, ao se avaliar embriões produzidos *in vitro* (PIV) em comparação a embriões produzidos *in vivo* existem diferenças claras, tais como diferenças na zona pelúcida, nos materiais potencialmente contaminados de origem de matadouro regularmente utilizados na fecundação *in vitro* e as várias etapas que podem resultar em contaminação inadvertida (Stringfellow e Wrathall, 1995). Por conseguinte, o potencial de introduzir contaminantes bacterianos e virais durante o processo de produção de embriões PIV foi enfatizado em diversos estudos (Stringfellow Wrathall, 1995; Bielański e Jordan, 1996; Givens *et al.*, 1999, 2001, 2002; Gard *et al.*, 2009). A natureza mais porosa da zona pelúcida de embriões bovinos PIV foi evidente pelos resultados de grupos que estudam uma série de vírus, tais como: vírus da língua azul, vírus da diarréia bovina a vírus e febre aftosa. Verificou-se em embriões bovinos que os vírus aderidam à ZP dos embriões PIV e não aderiram à ZP dos embriões produzidos *in vivo* (Marquant- Le Guienne *et al.*, 1998; Stringfellow *et al.*, 2004). Continua claro que a lavagem de embriões, ainda que benéfica para a redução da carga de patógenos do meio ambiente, não é tão universalmente confiável para garantir a saúde dos embriões PIV, podendo confundir os estudos devido à contaminação. Assim, é necessário que sejam tomadas medidas adicionais ao se analisarem patógenos de embriões PIV, tais como: (1) estabelecer normas mínimas para o saneamento no laboratório e manipulação de oócitos; (2) submeter animais utilizados para OPU e materiais de origem animal a um pré-teste para patógenos e contaminantes específicos; (3) usar criteriosamente agentes antimicrobianos; (4) testar continuamente de forma a acompanhar os contaminantes de amostras de culturas MIV, FIV e CIV; (5) lavar oócitos e embriões produzidos usando as técnicas aplicadas aos embriões produzidos *in vivo* como forma de controle complementar e para reduzir a carga de patógenos do meio ambiente e; (6) quando possível, utilizar meios sintéticos para minimizar os contaminantes no sistema. Detalhes do processamento de embriões PIV e dos micromanipulados para remover e prevenir a contaminação são descritos pela OIE, capítulo 4.8 e 4.9. (OIE, 2014c, d).

Transferência nuclear de células somáticas

O método mais recente para a produção *in vitro* de embriões bovinos, conhecido como transferência nuclear de células somáticas (TNCS) compartilha as mesmas preocupações que os embriões PIV (Stringfellow *et al.*, 2004), exceto que existem algumas advertências adicionais. A primeira grande preocupação seria a supressão ou, pelo menos, a fratura da zona pelúcida. Existem ainda vias adicionais para contaminação, como a longa duração do cultivo de células, de semanas a meses, o que gera possibilidades exponenciais de agentes patogênicos estranhos interferirem no sistema. Assim, estratégias para a certificação sanitária dos embriões produzidos não têm incidido sobre nenhum método específico para lavar os embriões, mas sim, elas têm-se centrado nos riscos para a introdução de agentes infecciosos e em testar protocolos se para certificar que os embriões ou materiais de origem animal utilizados na sua produção são livres de agentes patogênicos específicos, antes da transferência dos embriões ou de seu trânsito comercial (Stringfellow *et al.*, 2004). Isto é imperativo quando se utiliza embriões TNCS em estudos para que as variáveis possam ser geridas no âmbito do estudo.

No entanto, existe uma contínua falsa sensação de segurança com embriões produzidos *in vivo*, embriões PIV, bem como com embriões clonados. Argumenta-se que, uma vez que grandes surtos de doenças relacionadas a TE não foram rastreados, isto não representaria um problema factível. Assim, esta segurança resultou em complacência de agências de fomento e consequentemente, a pesquisa sobre patógenos de embriões não está em uma área de foco, mesmo em face de recentes surtos e estudos que colocam em evidência a necessidade de uma investigação adicional de patógenos em embriões.

Alguns acreditam que pesquisa suficiente já foi realizada e que, mesmo com o aumento da circulação internacional de embriões, especialmente de embriões PIV, não há necessidade de medidas para estimular o financiamento de estudos adicionais. Esta parece ser uma abordagem de curta visão, uma vez que embriões PIV são particularmente preocupantes, porque os procedimentos para processamento padrão não são tão afetivos na remoção de patógenos. Além disso, a evolução dos patógenos é um processo constante, resultando em patógenos reemergentes e formação de novos agentes patogênicos, que não foram totalmente testados. Para que a indústria de TE continue a ter um crescimento contínuo, a investigação adicional é necessária. Há uma importantíssima necessidade em se aumentar os estudos de agentes patogênicos de embriões para fornecer informações atualizadas sobre doenças relevantes e para se elevar o comércio e a eficiência dos sistemas de produção de embriões.

Patógenos zoonóticos

Além disso, problemas de saúde pública podem ser aumentados com alguns patógenos, especialmente aqueles que são zoonóticos. Um bom exemplo disto é visto com a *Coxiella burnetti*, que foi detectada em meios de coleta de embrião de amostras de tecido uterino de cabras (Alsaleha *et al.*, 2013). Em estudos recentes por *Alsaleh et al.* (2013, 2014), relatou-se que a *C. burnetti* não foi removida quando embriões caprinos produzidos *in vivo* e/ou embriões PIV bovinos foram expostos *in vitro* e posteriormente submetidos a procedimentos padrão de lavagem. O patógeno *C. burnetti* é zoonótico. Assim, manusear material biológico contaminado da doadora e da potencial receptora, pode resultar na infecção humana. Portanto, o tratamento adequado da doadora, da receptora e dos embriões se faz necessário até para não transmitir doenças aos próprios pesquisadores.

Resumo

Há muitas áreas que são um desafio para a pesquisa de agentes patogênicos de embriões. O principal deles é a falta de financiamento. Uma vez que a pesquisa exige financiamento, tais estudos não podem ser realizados sem este. Atualmente, as agências de financiamento não listam a pesquisa em patógeno de embriões como uma área de foco, mesmo frente aos recentes surtos e estudos, que colocam em evidência a necessidade de uma investigação adicional do tema. O trânsito comercial de embriões será prejudicado se mais estudos não forem realizados. A pesquisa é a chave para aumentar a segurança e a eficácia da indústria de transferência de embriões. Desafios adicionais incluem o grande número e variedade de patógenos, inclusive de patógenos novos e reemergentes, a utilização de produtos de origem animal, que muitas vezes abrigam e transmitem patógenos; a adaptação dos patógenos aos seus hospedeiros e ao meio ambiente, resultando em variação de afinidade e virulência, testes confiáveis para estes patógenos e ainda a necessidade de pessoal treinado para realizar estudos, coletar e interpretar dados, normas internacionais e o potencial zoonótico de alguns patógenos.

Referências

Alsaleh A, Fieni F, Rodolakis A, Bruyas J, Roux C, Larrat M, Chatagnon G, Pellerin J. 2013. Can *Coxiella burnetii* be transmitted by embryo transfer in goats? *Theriogenology*, 80:571-575.

Alsaleh A, Fieni F, Moreno D, Rousset E, Tainturier D, Bruyas JF, Pellerin JL. 2014. Risk of *Coxiella bumetii* transmission via embryo transfer using in vitro early bovine embryos. *Theriogenology*, 81:849-853.

Andréoletti O, Orge L, Benestad SL, Beringue V, Litaise C, Simon S, Le DA, Laude H, Simmons H, Lugan S, Corbière F, Costes P, Morel N, Schelcher, F, Lacroux C. 2011. Atypical/Nor98 scrapie infectivity in sheep peripheral tissues. *PLoS Pathog*, 7(2), e1001285.

Archbald LF, Fulton RW, Seager CL, Al-Bagdadi F, Godke RA. 1979. Effect of bovine viral diarrhea (BVD) virus on preimplantation bovine embryos: a preliminary study. *Theriogenology*, 11:81-89.

Atwell JK. 1987. The international movement of embryos and disease control: a regulatory perspective. *Theriogenology*, 27:5-8.

Bielanski A, Jordan L. 1996. Washing or washing with trypsin treatment is ineffective for removal of noncytopathic bovine viral diarrhea virus from bovine oocytes or embryos after experimental viral contamination of an in vitro fertilization system. *Theriogenology*, 46:1467-1476.

Bielanski A, Sapp T, Lutze-Wallace C. 1998. Association of bovine embryos produced by in vitro fertilization with a noncytopathic strain of BVDV type II. *Theriogenology*, 49:1231-1238.

Bowen RA, Storz J, Leary J. 1978. Interaction of viral pathogens with preimplantation embryos. *Theriogenology*, 9:88. (abstract).

Bowen RA. 1979. Viral infections of mammalian preimplantation embryos. *Theriogenology*, 11:5-15.

Detwiler LA, Baylis M. 2003. The epidemiology of scrapie. *Rev Sci Tech*, (1):121-143.

Drew TW, Sandvik T, Wakeley P, Jones T, Howard P. 2002. BVD virus genotype 2 detected in British cattle. *Vet Rec*, 51:551.

Fediaevsky A, Morigna, E, Ducrot C, Calavas D. 2009. A case-control study on the origin of atypical scrapie in sheep, France. *Emer Infect Dis*, 15:710-718.

Fediaevsky A, Gasqui P, Calavas D, Ducrot C. 2010. Discrepant epidemiological patterns between classical and atypical scrapie in sheep flocks under French TSE control measures. *Vet J*, 185:338-340.

Gard JA, Givens MD, Marley MS, Galik PK, Riddell KP, Stringfellow DA, Zhang Y, Edmonson MA.

2009. Bovine viral diarrhea virus (BVDV) associated with single in vivo-derived and in vitro-produced preimplantation bovine embryos following artificial exposure. *Theriogenology*, 71:1238-1244.

Gard J, Givens M, Marley M, Galik P, Riddell K, Edmondson M, Rodning S. 2010. Intrauterine inoculation of seronegative heifers with bovine viral diarrhea virus simultaneous to transfer of in vivo-derived bovine embryos. *Theriogenology*, 73:1009-1017.

Garza MC, Fernández-Borges N, Bolea R, Badiola JJ, Castilla J, Monleón E. 2011. Detection of PrPres in genetically susceptible fetuses from sheep with natural scrapie. *PLoS One*, 6:e27525.

Givens MD, Galik PK, Riddell KP, Brock KV, Stringfellow DA. 1999. Quantity and infectivity of embryo-associated bovine viral diarrhea virus and antiviral influence of a blastocyst impede in vitro infection of uterine tubal cells. *Theriogenology*, 52:887-900.

Givens MD, Galik PK, Riddell KP, Stringfellow DA, Brock KV, Bishop MD, Eilertsen KJ, Loskutoff NM. 2001. Validation of a reverse transcription nested polymerase chain reaction (RT- nPCR) to detect bovine viral diarrhea virus (BVDV) associated with in vitro-derived bovine embryos and co-cultured cells. *Theriogenology*, 56:787-799.

Givens MD, Riddell KP, Galik PK, Stringfellow DA, Brock KV, Loskutoff NM. 2002. Diagnostic dilemma encountered when detecting bovine viral diarrhea virus in IVF embryo production. *Theriogenology*, 58:1399-1407.

Givens MD, Gard JG, Stringfellow DA. 2007. Relative risks and approaches to biosecurity in the use of embryo technologies in livestock. *Theriogenology*, 68:298-307.

Gregg K, Chen S, Guerra T, Sadegheih S, Xiang T, Meredith J. Polejaeva I. 2009. A sensitive and efficient detection method for bovine viral diarrhea virus (BVD) in single reimplantation bovine embryos. *Theriogenology*, 71:966-974.

Hare WCD. 1990. Design and analysis of research on infectious disease transmission by embryos. *Theriogenology*, 33:51-57.

Hopp P, Omer MK, Heier BT. 2006. A case-control study of scrapie Nor98 in Norwegian sheep flocks. *J Gen Virol*, 87:3729-3736.

Ligios C, Cancedda MG, Carta A, Santucciu C, Maestrale C, Demontis F, Saba M, Patta C, DeMartini JC, Aguzzi A, Sigurdson CJ. 2011. Sheep with scrapie and mastitis transmit infectious prions through the milk. *J Virol*, 85:1136-1139.

Lindberg A, Ortman K, Alenius S. 2000. Seroconversion to bovine viral diarrhea virus (BVDV) in dairy heifers after embryo transfer. *In*: Abstract of the 14th International Congress on Animal Reproduction, 2000, Stockholm, Sweden. Stockholm: ICAR. pp. 250.

Marley MSD, Givens MD, Galik PK, Riddell KP, Stringfellow DA. 2008. Development of a duplex quantitative polymerase chain reaction assay for detection of bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhea virus in bovine follicular fluid. *Theriogenology*, 70:153-160.

Marquant-Le Guienne B, Remond M, Cosquer R, Humblot P, Kaiser C, Lebreton F, Cruciere C, Guerin B, LaPorte J, Thibier M. 1998. Exposure of in vitro-produced embryos to foot-and-mouth disease virus. *Theriogenology*, 50:109-116.

Meyers G, Ege A, Fetzer C. von Freyburg M, Elbers K, Carr V, Prentice H, Charleston B, Schurmann EM. 2007. Bovine viral diarrhea virus: prevention of persistent fetal infection by a combination of two mutations affecting Erns RNase and Npro protease. *Virology*, 81:3327-3338.

Nicholson EM, Brunelle BW, Richt JA, Kehrli ME Jr, Greenlee JJ. 2008. Identification of a heritable polymorphism in bovine PRNP associated with genetic transmissible spongiform encephalopathy: evidence of heritable BSE. *PLoS One*, 3:e2912.

Rubenstein R, Bulgin MS, Chang B, Sorensen-Melson S, Petersen RB, LaFauci G. 2012. PrPSc detection and infectivity in semen from scrapie-infected sheep. *J Gen Virol*, 93:1375-1383.

Singh EL. 1987. The disease control potential of embryos. *Theriogenology*, 27:9-20.

Stringfellow DA, Wright JC. 1989. A review of the epidemiologic aspects of embryo transfer from *Brucella abortus*-infected cows. *Theriogenology*, 31:997-1006.

Stringfellow DA, Wrathall AE. 1995. Epidemiological implications of the production and transfer of IVF embryos. *Theriogenology*, 43:89-96.

Stringfellow DA, Givens MD, Waldrop JG. 2004. Biosecurity issues associated with current and emerging embryo technologies. *Reprod Fertil Dev*, 16:93-102.

Stringfellow DA. 2010. Recommendations for the sanitary handling of in vivo-derived embryos. *In*: Stringfellow DA, Givens MD (Ed.). *Manual of the International Embryo Transfer Society*. 4th ed. Champaign, IL: IETS. pp. 65-68.

Thibier M, Nibart M. 1987. Disease control and embryo importations. *Theriogenology*, 27:37-47.

Waldrop JG, Stringfellow DA, Galik PK, Riddell KP, Riddell MG, Givens MD, Carson RL. 2004a. Infectivity of bovine viral diarrhea virus associated with in vivo-derived bovine embryos. *Theriogenology*, 62:387-397.

Waldrop JG, Stringfellow DA, Riddell KP, Galik PK, Riddell MG, Givens MD, Carson RL, Brock KV. 2004b. Different strains of noncytopathic bovine viral diarrhea virus (BVDV) vary in their affinity for in vivo-derived bovine embryos. *Theriogenology*, 62:45-55.

Waldrop J, Stringfellow D, Galik P, Givens M, Riddell K, Riddell M, Carson R. 2005. Seroconversion of calves following intravenous injection with embryos exposed to bovine viral diarrhea virus (BVDV) in vitro. *Theriogenology*, 65:594-605.

Waters HA. 1981. Health certification for livestock embryo transfer. *Theriogenology*, 15:57-66.

World Organisation for Animal Health. 2014a. OIE Terrestrial Animal Health Code. Chapter 4.7.14. Available on: http://www.oie.int/index.php?id=169&L=0&htmfile=chapitre_coll_embryo_equid.htm#article_coll_embryo_equid.14).

World Organisation for Animal Health. 2014b. OIE Terrestrial Animal Health Code. Chapter 4.7.5. Available on: http://www.oie.int/index.php?id=169&L=0&htmfile=chapitre_coll_embryo_equid.htm#chapitre_coll_embryo_equid_0.

World Organisation for Animal Health. 2014c. OIE Terrestrial Animal Health Code, Chapter 4.8. Available on: http://www.oie.int/index.php?id=169&L=0&htmfile=chapitre_coll_embryo_invitro.htm.

World Organisation for Animal Health. 2014d. OIE Terrestrial Animal Health Code, Chapter 4.9. Available on: (http://www.oie.int/index.php?id=169&L=0&htmfile=chapitre_coll_embryo_micro.htm.

Wrathall AE, Holyoak GR, Parsonson IM, Simmons HA. 2008. Risks of transmitting ruminant spongiform encephalopathies (prion diseases) by semen and embryo transfer techniques. *Theriogenology*, 70:725-745.

Wrathall AE. 1995. Embryo transfer and disease control in livestock: a review of recent research. *Theriogenology*, 43:81-88.

O triângulo epidemiológico infeccioso das doenças uterinas de bovinos

V.S. Machado, R.C. Bicalho[1]

Department of Population Medicine and Diagnostic Sciences, College of Veterinary Medicine,
Cornell University, Ithaca, NY, USA.

Resumo

As doenças uterinas do pós-parto são importantes do ponto de vista do bem-estar animal e por razões econômicas, causando desconforto, descarte e prejuízo ao desempenho reprodutivo de vacas. A metrite é caracterizada por útero anormalmente aumentado e uma secreção uterina fétida, aquosa, de coloração vermelho-amarronzada, que ocorre dentro de 21 dias após o parto. A endometrite é definida como a inflamação do endométrio após 21 dias do pós-parto, sem sinais de doença sistêmica, e que pode ser considerada como o estágio de inflamação crônica uterina. Tem sido relatado que a metrite afeta 10 a 20% das vacas e a endometrite e afeta 5,3-52,6% de vacas. A metrite afeta a vaca sistemicamente, e tem um impacto negativo sobre a produção de leite e desempenho reprodutivo. Vacas acometidas com endometrite não são sistemicamente doentes, e não têm a sua produção de leite alterada; no entanto, seu desempenho reprodutivo é prejudicado. Metrite e endometrite são doenças multifatoriais complexas, e uma ampla gama de fatores contribui para a sua ocorrência. Elas são frequentemente associadas com infecção bacteriana mista do útero, e os principais patógenos associados às doenças uterinas são *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes* e *Fusobacterium necrophorum*. Eventos que ocorrem durante o período de transição relacionados ao balanço energético negativo, desequilíbrio metabólico e deficiências minerais, e que levam a imunossupressão, são de grande importância durante o estabelecimento de infecções bacterianas intrauterinas. Estes fatores, combinados com eventos traumáticos ao endométrio durante o parto (tais problemas relacionados como parto), e fatores ambientais (má higiene no parto, tipo de alojamento e época de nascimento), aumentam o risco de metrite e endometrite.

Palavras chave: vacas leiteiras, endometrite, metrite, reprodução, doenças uterinas.

Introdução

O triângulo epidemiológico da doença infecciosa ilustra a interação de fatores epidemiológicos que contribuem para o surto de uma doença infecciosa: o hospedeiro, o patógeno causador da doença ou organismo, e o ambiente (Merrill, 2013). Metrite e endometrite são doenças multifatoriais complexas causadas por infecção bacteriana mista. Durante as últimas décadas, diversos estudos contribuiram para uma melhor compreensão dos fatores associados ao hospedeiro, aos agentes patogênicos, e ao ambiente, sobre a forma como esses fatores influenciam o risco de doenças uterinas. O objetivo desta revisão é enumerar e discutir os dados publicados relacionados aos diversos fatores que predispõem ao desenvolvimento de doenças uterinas em vacas leiteiras.

Introdução a doenças uterinas em vacas leiteiras

A eficiência reprodutiva é uma característica de grande importância para os sistemas modernos de produção leiteira, afetando o resultado econômico global da cadeia de lácteos. Um trato reprodutivo saudável após o parto é essencial para um desempenho reprodutivo satisfatório. Doenças uterinas do pós-parto são importantes para o bem-estar animal e por razões econômicas, causando desconforto, descarte e prejuízo ao desempenho reprodutivo das vacas. Na América do Norte, a metrite puerperal afeta 10 a 20% de vacas (LeBlanc *et al.*, 2011), enquanto que a incidência de endometrite é de aproximadamente 28%, variando 5,3-52,6% (Dubuc *et al.*, 2010a; Cheong *et al.*, 2012).

A metrite é caracterizada por útero anormalmente aumentado e secreção uterina fétida, aquosa, de coloração vermelho-amarronzada, que ocorre dentro de 21 dias após o parto, no entanto, o pico de incidência de metrite ocorre dentro da primeira semana pós-parto. Quando a metrite está associada com sinais de doença sistêmica (diminuição da produção de leite, apatia, ou outros sinais de toxemia) e temperatura> 39,5 ° C, o termo apropriado é metrite puerperal. Aproximadamente metade das vacas com metrite não são diagnosticadas com febre (Benzaquen *et al.*, 2007; Martinez *et al.*, 2012; Lima *et al.*, 2014).

Os efeitos da metrite na produtividade são impressionantes. A metrite tem um efeito negativo sobre a produção de leite durante a lactação inicial (Rajala e Grohn, 1998; Huzzey *et al.*, 2007; Giuliodori *et al.*, 2013), especialmente em vacas multíparas (Dubuc *et al.*, 2011; Wittrock *et al.*, 2011). A metrite também contribui para falhas reprodutivas, uma vez que vacas diagnosticadas com metrite apresentam diminuição na taxa de concepção (Overton e Fetrow, 2008; Giuliodori *et al.*, 2013). Os dados referentes ao efeito da metrite na capacidade de sobrevivência são inconsistentes; estudos têm relatado nenhum efeito da metrite na taxa de descarte (Rajala e Grohn, 1998; Dubuc *et al.*, 2011), enquanto outros observaram que as vacas diagnosticadas com metrite são mais propensas a sairem do rebanho de vacas sadias (Linden *et al.*, 2009; Wittrock *et al.*, 2011). Wittrock *et al.*, (2011) sugeriram que as vacas multíparas acometidas por metrite teriam

[1]Autor correspondente: rcb28@cornell.edu

maior risco de serem descartadas, principalmente por causa do efeito prejudicial da doença na produção de leite, em vez de falha reprodutiva. A metrite é frequentemente tratada com antibioticoterapia sistêmica. Os antibióticos de escolha para o tratamento de metrite são ceftiofur ou penicilina (Smith *et al.*, 1998; Drillich *et al.*, 2001); no entanto, o tratamento alternativo com ampicilina apresentou uma eficácia semelhante ao ceftiofur (Drillich *et al.*, 2003; Lima *et al.*, 2014). As perdas econômicas causadas por cada caso de metrite foram calculadas em cerca de US $ 329 a 386, devido ao tratamento com antibióticos e aos efeitos prejudiciais da metrite no desempenho reprodutivo, produção de leite, e capacidade de sobrevivência (Drillich *et al.*, 2001; Overton e Fetrow, 2008).

A endometrite é definida como a inflamação do endométrio após 21 dias do pós-parto, sem sinais de doença sistêmica, e pode ser considerada o estágio de inflamação crônica uterina. A endometrite é classificada como clínica ou subclínica. Endometrite clínica é caracterizada pela presença de exsudatos uterinos purulentos ou mucopurulentos detectáveis na vagina após 21 dias do pós-parto (Sheldon *et al.*, 2006). A endometrite subclínica é definida como a inflamação do endométrio determinada por citologia de amostras colhidas por lavagem de lúmen uterino ou por *cytobrush* endometrial, na ausência da descarga purulenta na vagina (Gilbert *et al.*, 2005). Embora a definição de endometrite clínica é amplamente aceita e utilizada por clínicos e pesquisadores, um estudo recente desafiou os pressupostos deste método de diagnóstico, mostrando que vacas com corrimento vaginal purulento (*purulent vaginal discharge* - PVD) nem sempre apresentam inflamação endometrial; e a nomenclatura PVD foi proposta para representar adequadamente o que foi diagnosticado em casos de endometrite clínica (Dubuc *et al.*, 2010a). No entanto, nesta revisão da literatura, adotaremos a terminologia endometrite clínica. Para definir endometrite subclínica, vários pontos de corte de neutrófilos na citologia uterina têm sido utilizados, dependendo do estágio de lactação que as amostras foram colhidas. Elevados pontos de corte foram utilizados para definir a inflamação do útero nos estádios anteriores do aleitamento. Por exemplo, endometrite subclínica foi definida como a presença de neutrófilos em citologia uterina superiores a 18% e 10% em relação à contagem total de células, para amostras colhidas, respectivamente, 20 a 33 dias e 34 e 47 dias após o parto (Kasimanickam *et al.*, 2004). Outros usaram 5% de neutrófilos na citologia uterina como ponto de corte utilizado para definir endometrite subclínica (Gilbert *et al.*, 2005; Lima *et al.*, 2013). Estudos recentes têm utilizado a terminologia endometrite citológica em vez de endometrite subclínica, sendo endometrite citológica definida como a inflamação do endométrio determinada pela citologia, independentemente da presença de endometrite clínica (Dubuc *et al.*, 2010a; Cheong *et al.*, 2012; Yasui *et al.*, 2014). Vários métodos de diagnóstico têm sido usados para avaliar a infecção do trato reprodutivo e inflamação em vacas leiteiras, tais como vaginoscopia (Studer e Morrow, 1978; Barlund *et al.*, 2008; Westermann *et al.*, 2010), o dispositivo *metrickeck* (McDougall et ai ., 2007; Brick *et al.*, 2012; Machado *et al.*, 2015), a ultrassonografia do útero e da cérvix (Senosy *et al.*, 2009; Brick *et al.*, 2012; Polat *et al.*, 2015), cultura bacteriana intrauterina (Studer e Morrow, 1978; Westermann *et al.*, 2010), a biópsia uterina (Bonnett *et al.*, 1991; Meira Jr. *et al.*, 2012), as tiras de reagente utilizado para medir esterase de leucócitos, proteína e pH de amostras de lavados uterinos (Cheong *et al.*, 2012), densidade ótica de amostras de lavagem uterinos (Machado *et al.*, 2012b) e a citologia (Gilbert *et al.*, 2005; Dubuc *et al.*, 2010a; Lima *et al.*, 2013). Analisar e avaliar a validação de cada método de diagnóstico está além dos objetivos desta revisão, porém estes aspectos foram intensamente revisados (de Boer *et al.*, 2014).

Diferentemente da metrite, a endometrite não é acompanhada por sintomas sistêmicos, sendo uma doença que é contida no útero. Embora tenha sido relatado que a endometrite não tenha um impacto diretamente na produção de leite (Erb *et al.*, 1985; Dubuc *et al.*, 2011), outros têm mostrado que as vacas primíparas que produziram mais leite, e vacas multíparas que produzem menos leite no primeiro mês da lactação foram mais propensas a desenvolver endometrite subclínica (Cheong *et al.*, 2011; Galvão *et al.*, 2010). No entanto, a endometrite prejudica a reprodução (Gilbert *et al.*, 2005; Dubuc *et al.*, 2010a; Machado *et al.*, 2015), e como consequência gera um impacto econômico negativo nos sistemas leiteiros modernos (Lee e Kim, 2007). Tem sido relatado que a endometrite clínica e a subclínica reduzem a taxa de concepção (Galvão *et al.*, 2009; Dubuc *et al.*, 2010a; Machado *et al.*, 2015.), aumentam o intervalo parto-concepção (Barlund *et al.*, 2008; Dubuc *et al.*, 2010a; Machado *et al.*, 2015), e aumentam a mortalidade embrionária (Lima *et al.*, 2013; Machado *et al.*, 2015). Até a presente data, muitas estratégias de terapia para endometrite foram avaliadas com eficácia controversa, tais como administração intrauterina de clorexidina (Gilbert e Schwark, 1992), enzimas (Drillich *et al.*, 2005), dextrose hipertonica (Brick *et al.*, 2012; Machado *et al.*, 2015), e administração sistemica de PGF2 α (LeBlanc *et al.*, 2002; Kasimanickam *et al.*, 2005; Lima *et al.*, 2013). Embora a infusão intrauterina de cefalosporina tem sido relatada como sendo eficaz para tratar a endometrite clínica (Runciman *et al.*, 2008; McDougall *et al.*, 2013), a utilização de antibióticos administrados por via intrauterina atualmente não é aprovada nos EUA.

O hospedeiro

Período de transição, desequilíbrio metabólico, deficiência mineral e imunossupressão

O período de transição (definido como o

período de 3 semanas antes a 3 semanas após o parto) é extremamente desafiador para a vaca leiteira (Drackley, 1999). À medida que o parto se aproxima, os requerimentos nutricionais para o crescimento fetal aumentam para valores máximos, enquanto o consumo de matéria seca (CMS) diminui aproximadamente 20% (Bell, 1995). Próximo ao parto, as vacas têm que lidar com alterações nutricionais, porque a dieta muda abruptamente, passa de, baseada em forragem para rica em concentrado. As vacas também apresentam metabolismo drasticamente alterado para suprir a glândula mamária com os nutrientes necessários para síntese de leite (Bell, 1995; Goff *et al.*, 2002). No entanto, as necessidades de nutrientes para a síntese de leite durante as primeiras semanas de lactação superam a ingestão de nutrientes. Para dar suporte à produção de leite, a vaca tem que mobilizar suas reservas corporais, levando a uma condição de balanço energético negativo (BEN; Roche *et al.*, 2009). Vacas leiteiras passam por um estado de resistência à insulina durante a lactação inicial, reduzindo a captação de glicose pelos tecidos do corpo, ajudando a atender as demandas de nutrientes para a produção de leite durante as primeiras semanas de lactação (Bell, 1995). Combinada com a resistência à insulina, uma redução dos receptores do hormônio de crescimento (GH) no fígado também têm sido relatada, o que leva a uma redução no fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) em circulação e ao aumento de GH na circulação, resultando em aumento da lipólise (Lucy *et al.*, 2001; Wathes *et al.*, 2009). No parto, a concentração de progesterona no sangue é drasticamente reduzida, o que é seguida por um aumento temporário da concentração sanguínes de estrógeno e glicocorticóides, contribuindo para a diminuição da IMS e mobilização das reservas de gordura corporal (Drackley *et al.*, 2005; Ingvartsen, 2006).

As mudanças complexas durante o período de transição promovem um estado de desequilíbrio metabólico, o que resulta na mobilização de gordura e perda exacerbada de escore de condição corporal durante o início da lactação (Roche *et al.*, 2007). Isto reflete na elevada concentração circulante de ácidos graxos não esterificados (AGNEs; Kunz *et al.*, 1985; Busato *et al.*, 2002). Os AGNEs são uma excelente fonte de energia para diversos tecidos do corpo e também são utilizados para a síntese de gordura do leite. No entanto, quando o fígado tem suas necessidades de ATP atendidas, a captação de AGNE para completar a β-oxidação é desviada para β-hidroxibutirato (BHBA) e outros corpos cetônicos (Drackley, 1999). Além disso, quando em alta concentração, AGNEs podem ser re-esterificados em triglicéridos e acumularem-se no fígado causando uma condição conhecida como fígado gorduroso (Strang *et al.*, 1998).

Os mecanismos através dos quais todos estes fatores associados com o BEN e o desequilíbrio metabólico irão contribuir para um estado de imunossupressão, durante o período de peri-parto, não são completamente compreendidos. Durante este período, o comprometimento da função de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) e diminuição da concentração no sangue de imunoglobulinas são observados (Kehrli *et al.*, 1989; Hoeben *et al.*, 2000; Colitti e Stefanon, 2006; Sordillo *et al.*, 2007; Van Knegsel *et al.*, 2007; Herr *et al.*, 2011). A redução da IMS e elevadas concentrações de AGNEs e BHBA estão associadas à imunossupressão durante o período de transição (Rukkwamsuk *et al.*, 1999; Hammon *et al.*, 2006; Graugnard *et al.*, 2012). Estudos *in vitro* têm mostrado que os PMNs bovinos incubados com elevada concentração de AGNEs apresentam função e viabilidade diminuídas (Lacetera *et al.*, 2004; Scalia *et al.*, 2006). A alta concentração de BHBA reduziu a capacidade de PMN bovinos de realizarem quimiotaxia, *burst* oxidativo e fagocitose (Klucinski *et al.*, 1988; Hoeben *et al.*, 1997; Suriyasathaporn *et al.*, 1999). Recentemente, foi demonstrado que uma hipercetonemia induzida em vacas perturbou a resposta imune da glândula mamária ao desafio com lipopolissacáridos (LPS; Zarrin *et al.*, 2014). Vacas que passaram por BEN grave apresentaram concentração circulante reduzida de IGF-1 durante o período pós-parto (Lucy *et al.*, 2001; Wathes *et al.*, 2009). O endométrio bovino expressa os genes do sistema de IGF (Llewellyn *et al.*, 2008), que desempenham um papel na reparação de tecidos, promovendo a proliferação e a cura durante a involução uterina (Wathes *et al.*, 2011), e altera a expressão gênica no endométrio relacionada com respostas imunológicas (Wathes *et al.*, 2009). Além disso, tem sido relatado que os anticorpos naturais (NAb), componentes importantes do ramo humoral do sistema imune inato (Avrameas, 1991), possuem uma associação negativa com as concentrações séricas elevadas de AGNE (van Knegsel *et al.*, 2007, 2012) .

A relação entre BEN, seguido por desequilíbrio metabólico durante o período peri-parto, e as doenças uterinas está bem estabelecida na literatura atual. Por exemplo, o comportamento alimentar e IMS têm sido associados com metrite e endometrite. Em comparação com animais saudáveis, vacas diagnosticadas com metrite ou endometrite apresentaram menos tempo de alimentação e IMS reduzida durante o período de transição (Urton *et al.*, 2005; Hammon *et al.*, 2006; Huzzey *et al.*, 2007), e tiveram maior perda de ECC durante o período seco (Markusfeld *et al.*, 1997; Kim e Suh, 2003). A incidência de endometrite foi aumentada para vacas com baixos ECC ao parto (Hoedemaker *et al.*, 2009; Dubuc *et al.*, 2010b), enquanto vacas com altos ECC apresentaram maior risco de desenvolver metrite (Kaneene e Miller, 1995).

Embora existam algumas pequenas discrepâncias na literatura, em geral, as vacas que se desenvolvem metrite ou endometrite têm elevada concentração circulante de AGNEs na semana anterior ao parto, e elevadas concentrações séricas de AGNEs e BHBA na primeira semana de lactação (Hammon *et al.*, 2006; Dubuc *et al.*, 2010b; Galvão *et al.*, 2010; Ospina *et al.*, 2010). Estes parâmetros têm sido explorados

como ferramentas de diagnóstico para identificar as vacas em risco elevado de desenvolver doenças uterinas, com precisão satisfatória (Dubuc *et al.*, 2010b; Ospina *et al.*, 2010; Giuliodori *et al.*, 2013). Recentemente, foi relatado que a alta concentração de IGF-1 no pré-parto foi associada à redução do risco de desenvolvimento de metrite ou outras doenças no pós-parto (Piechotta *et al.*, 2012; Giuliodori *et al.*, 2013).

Assume-se que este desequilíbrio metabólico vivenciado por vacas no período de transição aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Em combinação com a reduzida capacidade anti-oxidante durante o período peri-parto, as vacas sofrem uma condição chamada de estresse oxidativo (Castillo *et al.*, 2005; Sordillo, 2005; Abuelo *et al.*, 2013). Além disso, as concentrações sanguíneas de alguns minerais, tais como Ca, P, Zn e Cu são afetadas com o aparecimento da lactação, como os minerais de sangue são utilizados pela glândula mamária para a produção de leite (Goff e Stabel, 1990; Xin *et al.*, 1993; Meglia *et al.*, 2001; Goff *et al.*, 2002). O sistema imunológico também é suprimido pela deficiência transitória de minerais observada em vacas nas semanas em torno do parto, especialmente a hipocalcemia (Ducusin *et al.*, 2003; Martinez *et al.*, 2012, 2014). Foram relatadas associações entre baixa concentração de Ca no sangue em torno do parto e o comprometimento das atividades de fagocitose de neutrófilos e *burst* oxidativo (Kimura *et al.*, 2006; Martinez *et al.*, 2012). Propôs-se que a limitação das atividades de fagocitose e *burst* oxidativo em vacas submetidas a hipocalcemia podem ser explicadas pelo declínio rápido de iCa^{2+} citosólico (Martinez *et al.*, 2014). Além disso, a baixa concentração de Se no sangue tem sido associada com a diminuição da adesão de neutrófilos, migração e capacidade de combater (Ndiweni e Finch, 1995; Cebra *et al.*, 2003). A deficiência de Cu e Zn também está ligada à imunidade reduzida (Shankar e Prasad, 1998; Spears e Weiss, 2008).

A diminuição das concentrações sanguíneas de sais minerais no pós-parto está associada com doenças uterinas (Martinez *et al.*, 2012; Bicalho *et al.*, 2014A.). A hipocalcemia após o parto foi associada ao aumento da incidência de metrite e endometrite clínica (Martinez *et al.*, 2012; Bicalho *et al.*, 2014a); e a diminuição das concentrações séricas no pós-parto de P, Zn, Cu, Mo e Se foi reportada como sendo relacionada com metrite e endometrite clínica (Bicalho et al., 2014a). A suplementação com um produto injetável contendo Cu, Se, Zn, e Mn, durante o período seco diminuiu a incidência de endometrite clínica e da presença de agentes patogênicos intrauterinos conhecidos, o que sugere que alguns destes minerais pode ter um papel protetor no ambiente intrauterino no pós-parto (Machado *et al.*, 2012c, 2013).

Durante a gestação, a função imune do útero é suprimida para evitar respostas maternas contra o concepto alogênico. Esta imunossupressão uterina é parcialmente regulada pela concentração elevada de progesterona durante a gestação (Pádua *et al.*, 2005). A tolerância materna ao feto também é possível por causa da inibição das respostas inflamatórias mediadas por células T reguladoras (Lee *et al.*, 1992; Aluvihare *et al.*, 2004). Isto, combinado com a imunossupressão sistêmica enfrentada por vacas leiteiras no período de transição, discutida anteriormente, faz com que o útero fique muito suscetível a doenças no período pós-parto inicial. Associações entre metrite e endometrite, e o sistema imunológico imunissuprimido da periparturiente têm sido relatadas em vários estudos. Embora os dados sobre a associação entre a atividade fagocítica de PMN e doenças de uterinas sejam inconsistentes (Mateus *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2005; Machado *et al.*, 2013), as associações entre a capacidade de combate de neutrófilos são mais plausíveis. Observou-se que as vacas que desenvolveram metrite possuíam maior quantidade de neutrófilos apresentando menor atividade de superóxido antes do parto (Cai *et al.*, 1994), e que a atividade de *burst* oxidativo de PMN sanguíneos está associada com risco aumentado de desenvolver endometrite (Mateus *et al.*, 2002). A capacidade de matar dos PMN periféricos, determinada pela atividade da mieloperoxidase e atividade de redução do citocromo C, foi reduzida no dia do parto em vacas que desenvolveram metrite e endometrite subclínica (Hammon *et al.*, 2006). O estado energético de PMN sanguíneos, medido por concentração de glicogênio nos PMN, também foi associado com doença uterina; vacas que desenvolveram metrite ou endometrite subclínica têm menor concentração de glicogênio nos PMN sanguíneos do que as vacas saudáveis (Galvão *et al.*, 2010). Recentemente, foi sugerido que a diminuição da concentração circulante de NAb é outro fator que pode contribuir para o comprometimento do sistema imune inato em torno de parto, aumentando o risco de doenças uterinas (Machado *et al.*, 2014a).

Fatores físicos e parâmetros genéticos

Existem vários fatores de risco que contribuem para a contaminação uterina pós-parto ou danos físicos do tecido uterino, como retenção de placenta (RP), anormalidades do parto (distocia, gêmeos, e natimortos), ângulo da vulva, e paridade. Muitos desses fatores, combinados com parâmetros de saúde metabólicos, foram usados para construir um modelo com o objetivo de prever doenças pós-parto, incluindo metrite (Vergara *et al.*, 2014).

Vários estudos têm mostrado que RP é um dos fatores de risco mais importantes para a metrite e endometrite em vacas leiteiras (Erb *et al.*, 1985; Kaneene e Miller, 1995; Bruun *et al.*, 2002; Machado *et al.*, 2012b). A retenção de placenta contribui para o desenvolvimento de doenças uterinas porque as vacas que têm as suas membranas fetais retidas são imunossuprimidas, apresentam mais danos no tecido uterino (Paisley *et al.*, 1986), e são mais propensas ao crescimento de bactérias no lúmen uterino (Paisley *et*

al., 1986; Machado *et al.*, 2012a).

Problemas relacionados parto (distocia, natimorto e parto gemelar) também são conhecidos por aumentar o risco de doenças uterinas (Markusfeld, 1984; Benzaquen *et al.*, 2007; Potter *et al.*, 2010; Cheong *et al.*, 2011), por facilitar o acesso das bactérias à mucosa uterina (Bicalho *et al.*, 2010), e por causar danos no tecido uterino. Vacas que apesentam parto anormal são mais propensas a desenvolver metrite (Benzaquen *et al.*, 2007; Giuliodori *et al.*, 2013) e endometrite clínica (Benzaquen *et al.*, 2007) do que vacas com parto normal. Estes problemas relacionados com partos também são fatores de risco independentes para doenças uterinas. Efeitos independentes da distocia, parto gemelar, e morte fetal sobre a incidência de metrite (Bruun *et al.*, 2002; Bicalho *et al.*, 2010; Dubuc *et al.*, 2010b) e endometrite clínica (Potter *et al.*, 2010; Dubuc *et al.*, 2010b; Prunner *et al.*, 2014) têm sido relatados. Existem estudos com resultados conflitantes sobre a associação entre problemas de parto relacionados e endometrite subclínica. Cheong *et al.*, (2011) relataram que essas anormalidades de partos foram associadas com endometrite subclínica, enquanto outros não observaram as mesmas associações (Dubuc *et al.*, 2010b; Prunner *et al.*, 2014). Aborto e parto induzido também são fatores predisponentes a doenças uterinas (Kaneene e Miller, 1995; Bruun *et al.*, 2002).

As vacas que parem bezerros machos são mais propensas a sofrer contaminação uterina após o parto (Bicalho *et al.*, 2010), a sofrerem distocia (Mee *et al.*, 2011), e terem partos natimortos (Meyer *et al.*, 2001) que vacas com bezerros do sexo feminino. No entanto, com o melhor de nosso conhecimento, não há nenhuma evidência de que ter bezerros machos é um fator de risco direto para a metrite, mas foi relatado para ser um fator de risco para endometrite clínica (Potter *et al.*, 2010). A mesma associação não foi observada para endometrite subclínica (Cheong *et al.*, 2011).

Há uma associação, com padrão em forma de U, entre paridade e metrite; vacas primíparas e vacas a partir do 3º parto são mais propensas a desenvolver metrite do que vacas de 2º parto (Markusfeld, 1984; Saloniemi *et al.*, 1986; Bruun *et al.*, 2002); no entanto, outros não observaram essa associação em forma de U, e simplesmente informaram que vacas primíparas são mais propensas a desenvolverem metrite do que multíparas (Dubuc *et al.*, 2010b; Machado *et al.*, 2012a). Primíparas são mais propensas do que vacas mais velhas a sofrer danos uterinos devido à distocia (Meyer *et al.*, 2001; Uematsu *et al.*, 2013). Da mesma forma da metrite, a paridade é também um fator de risco para endometrite; vacas primíparas são mais propensas a desenvolverem endometrite clínica ou subclínica do que vacas multíparas (Dubuc *et al.*, 2010b; Potter *et al.*, 2010; Cheong *et al.*, 2011).

Foi observado que outro fator relacionado à vaca que aumenta o risco de infecção uterina é o ângulo da vulva (Potter *et al.*, 2010). Um ângulo vulvar <70º em relação ao eixo horizontal aumenta o risco de endometrite clínica; esta conformação pode permitir a contaminação fecal da vagina, permitindo que as bactérias possam acessar mais facilmente o lúmen uterino e causar infecção.

Tem sido sugerido que há um envolvimento de fatores genéticos na incidência de metrite, uma vez que a hereditariedade da doença foi relatada como sendo tão elevada como 0,19 e 0,26 para as vacas primiparas e de segunda lactação, respectivamente (Lin *et al.*, 1989). No entanto, outros estudos reportaram uma redução dos valores de hereditariedade para a metrite, variando entre 0,02 e 0,07 (Lyons *et al.*, 1991; Van Dorp *et al.*, 1998; Zwald *et al.*, 2004a, b). Estudos recentes investigaram a associação entre polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) que ocorrem em genes da imunidade inata das espécies bovina com doenças uterinas (Galvão *et al.*, 2011; Pinedo *et al.*, 2013). Pinedo *et al.*, (2013) relataram associações fracas entre metrite, endometrite, e SNPs que ocorrem em genes que codificam os receptores *toll like* 2, 4, 6 e 9. Galvão et al. (2011) concluíram que a saúde uterina não foi afetada pelo SNP na posição +735 do gene receptor da interleucina-α-8. Polimorfismos no gene do receptor da leptina foram associados com o aumento da incidência de metrite (Oikonomou *et al.*, 2009). Embora a capacidade predita de transmissão do touro para características de produção de leite foi associada com pior desempenho reprodutivo, esta não foi vinculada com o aumento da susceptibilidade à metrite (Bicalho *et al.*, 2014b).

O ambiente

É intuitivo pensar que a falta de higiene na área de maternidade e parto é um fator predisponente para a contaminação intra-uterina no pós-parto e desenvolvimento de doenças uterinas. No entanto, diferentes estudos apresentam dados conflitantes para apoiar a sua importância. O grau de limpeza da região perineal no momento do parto foi associado com metrite (Schuenemann *et al.*, 2011). Rebanhos que usaram palha para a cama das baias de parto tiveram diminuição da incidência de metrite (Kaneene e Miller, 1995) e endometrite subclínica (Cheong *et al.*, 2011) em relação a rebanhos usando um outro material; a palha pode ser considerada um material de cama mais limpo, quando comparado com outros materiais, tais como areia e serragem. Partos realizados no pasto também foram associados com redução na incidência metrite, e a pastagem poderia ser também considerada como um ambiente menos contaminado com bactérias do que um galpão (Kaneene e Miller, 1995). No entanto, outros estudos observaram que a falta de higiene não está relacionada a doenças uterinas; Potter *et al.* (2010) não observaram qualquer associação entre endometrite clínica e marcadores de higiene (escore de consistência fecal, escore de limpeza da vaca, desinfecção de equipamentos parto, e o uso de luvas durante a assistência ao parto). Além disso, a microflora de vacas de duas fazendas higienicamente contrastantes não foi

influenciada pelo estado de higiene ambiental, no entanto, estes resultados devem ser interpretados com cuidado, porque este estudo foi realizado em apenas dois rebanhos e envolveu apenas 26 vacas (Noakes *et al.*, 1991).

Alojamentos individuais na maternidade tem sido associado a um risco aumentado de metrite (Kaneene e Miller, 1995). Além disso, o alojamento foi associado a incidência de endometrite subclínica (Cheong *et al.*, 2011; Prunner *et al.*, 2014). Rebanhos que mantiveram vacas no pós-parto inicial em *freestall* apresentaram diminuição da incidência de endometrite subclínica em relação de rebanhos que abrigavam suas vacas pós-parto em baias com camas (Cheong *et al.*, 2011). Prunner *et al.*, (2014) relataram que os sistemas *tie stall* foram associados com diminuição do risco de endometrite subclínica quando comparados com estábulos com baias de parto; no entanto, o sistema de alojamento não foi associado com endometrite clínica.

A incidência de metrite tem sido associada à estação de parição, mas com pouco consenso sobre qual estação é um fator predisponente para doenças uterinas (Erb e Martin, 1980; Markusfeld, 1984; Gröhn *et al.*, 1990;
Bruun *et al.*, 2002). Markusfeld (1984) relataram que as vacas que pariram durante o verão foram mais susceptíveis a sofrerem metrite, ao passo que a incidência de metrite foi associada com partos durante o verão-outono (Erb e Martin, 1980), outono-inverno (Gröhn *et al.*, 1990), ou inverno-primavera (Bruun *et al.*, 2002). Relatou-se que o estresse por calor também é um fator predisponente para RP e, consequentemente, metrite (DuBois e Williams, 1980). Essas discrepâncias podem ser explicadas pelas diferenças geográficas e temporais entre os estudos. No entanto, a literatura mais recente relatou que a estação do ano não é importante para a metrite (Dubuc *et al.*, 2010b) e endometrite (Dubuc *et al.*, 2010b; Prunner *et al.*, 2014). Talvez os avanços no manejo tenham minimizado os efeitos negativos da estação do ano sobre a saúde uterina no pós-parto (Collier *et al.*, 2006).

Os patógenos

Virtualmente todas as vacas sofrerão contaminação bacteriana nos seus lúmens uterinos após o parto (Foldi *et al.*, 2006; Santos e Bicalho, 2012). *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes* e *Fusobacterium necrophorum* são consideradas as causas bacterianas primárias de doenças uterinas (Miller *et al.*, 2007; Bicalho *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2011), mas outras bactérias patogênicas, tais como, as espécies *Bacteroides spp*, *Ureaplasma spp*, *Staphylococcus spp*, *Helcococcus spp*, *Prevotella melaninogenicus* e *Streptococcus spp* também têm sido associadas com doenças uterinas (Azawi *et al.*, 2008; Machado *et al.*, 2012c; Locatelli *et al.*, 2013). Embora a etiologia das doenças uterinas seja principalmente atribuída a infecção bacteriana, o herpesvírus bovino tipo 4 (BoHV-4) tem sido associado com a má saúde uterina pós-parto, na qualidade de um agente patogênico secundário, seguinte a bactérias (Monge *et al.*, 2006; Donofrio *et al.*, 2009; Chastant-Maillard, 2013).

Escherichia coli

Tradicionalmente, a *E. coli* foi descrita como o principal agente patogênico iniciador da infecção e doença uterina pós-parto (Studer e Morrow, 1978; Bonnett *et al.*, 1991; Bicalho *et al.*, 2010; Sheldon *et al.*, 2010). Tem sido relatado que a *E. coli* uterina é uma bactéria ambiental meramente oportunista, porque nenhum dos fatores de virulência avaliados num estudo estavam associados com a probabilidade de ocorrência de doenças uterinas (Silva *et al.*, 2009). No entanto, estudos recentes caracterizaram fatores de virulência importantes que permitem a *E. coli* se ligar e invadir o endométrio bovino, gerando avanços significativos para se compreender como a *E. coli* tem um papel na patogênese da metrite e endometrite (Bicalho *et al.*, 2010; Sheldon *et al.*, 2010).

Silva *et al.* (2009) caracterizaram o fenótipo e genótipo de 72 *E. coli* isoladas a partir do útero de vacas com e sem metrite, e descobriram que nenhum dos 15 fatores de virulência avaliados foram associados com a metrite. Sheldon *et al.* (2010) investigaram a presença de 17 fatores de virulência de 114 *E. coli* uterinas isoladas de 64 vacas leiteiras no pós-parto e o único fator de virulência associado à doença foi *fyuA*. No entanto, eles descobriram que *E. coli* isoladas a partir de vacas com metrite eram mais capazes de aderir e invadir as células endometriais epiteliais e do estroma. Em um estudo em maior escala, Bicalho *et al.*, (2010) exploraram 32 potenciais fatores de virulência, utilizando 611 *E. coli* isoladas de 374 vacas alojadas em quatro fazendas diferentes no estado americano de Nova Iorque. Verificou-se que seis fatores de virulência comuns a *E. coli* extra-intestinais e entero-agregativas foram associadas com doenças uterinas: *fimH*, *hlyA*, *cdt*, *kpsMII*, *ibeA*, e *astA*. O fator de virulência FimH foi o mais prevalente e a mais importante para a metrite e endometrite. A proteína FimH é um tipo de uma proteína adesiva de pili de tipo 1 de *E. coli* que desempenha um papel importante na adesão a manosídios (Krogfelt *et al.*, 1990) e permite que as bactérias colonizem as superfícies epiteliais (Mooi e De Graaf, 1985). Sabe-se que *E. coli* que expressam o pili de tipo 1 contendo FimH causa infecção do trato urinário em seres humanos (Kaper et al, 2004), e é crítica para a capacidade das *E. coli* para aderir e colonizar o epitélio da bexiga (Mulvey, 2002). Na verdade, foi demonstrado que FimH também media a adesão entre *E. coli* endometrial patogênica e a mucosa uterina de bovino, porque o tratamento de *E. coli* com manose diminuiu a sua capacidade para aderir às células endometriais bovinas *in vitro* (Sheldon *et al.*, 2010). Recentemente, um método alternativo para a prevenção de metrite utilizando manose ultrapura foi testado, mas

a administração intra-uterina de 50 g de manose nos três primeiros dias após o parto, foi ineficaz para reduzir a contaminação bacteriana e prevenir metrite (Machado *et al.*, 2012a).

Foi sugerido que a *E. coli* tem importância relacionada à metrite e a endometrite na primeira semana pós-parto, especialmente durante os primeiros três dias após o parto, induzindo alterações que potencialmente favorecem a infecção subsequente por outros patógenos (Dohmen *et al.*, 2000; Bicalho *et al.*, 2012). No entanto, a sua presença intrauterina após a primeira semana pós-parto não é importante para a doença e desempenho reprodutivo (Bicalho *et al.*, 2012; Machado *et al.*, 2012a, c; Sens e Heuwieser, 2013). Dohmen *et al.*, (2000) sugeriram que a presença de *E. coli* e sua endotoxina de lipopolissacárido (LPS) em lóquio durante os dois primeiros dias pós-parto conduz à subsequente infecção por *T. pyogenes* aos 14 dias após a parição. Da mesma forma, Bicalho *et al.*, (2012) constataram que as vacas que foram positivas para a presença intrauterina do fator de virulência FimH da *E. coli* nos dias 1 a 3 da lactação eram mais propensas a desenvolver contaminação intrauterina com *F. necrophorum* nos dias 8 a 10 da lactação. A presença de *E. coli* no período pós-parto também foi associada com prejuízos no desempenho reprodutivo (Bicalho *et al.*, 2012; Machado *et al.*, 2012a).

Fusobacterium necrophorum

A combinação do metabolismo de microrganismos anaeróbios e o consumo de oxigênio por PMNs que estão combatendo a infecção intrauterina no primeiro dia pós-parto diminui o potencial de oxigénio redutase intrauterino, criando um ambiente anaeróbico (El-Azab *et al.*, 1988). Isso irá favorecer o crescimento de organismos anaeróbios estritos e facultativos, como *F.necrophorum* e *T. pyogenes*, respectivamente. Vários estudos têm identificado o *F. necrophorum* como um importante agente etiológico de doenças uterinas (Ruder *et al.*, 1981; Noakes *et al.*, 1991; Dohmen *et al.*, 2000). Estudos recentes utilizando a caracterização molecular da microbiota intrauterina têm reforçado essa suposição. Foi relatado que o *F. necrophorum* foi a bactéria mais prevalente em amostras colhidas de vacas afetadas com metrite, estando completamente ausente em amostras provenientes de vacas sadias (Santos *et al.*, 2011). De modo semelhante, foi relatado que a presença intrauterina de *F. necrophorum* nos dias 8 a 10 de lactação esta associada com metrite (Bicalho *et al.*, 2012), e aos 35 dias pós-parto com endometrite clínica (Machado *et al.*, 2012c).

Fusobacterium necrophorum é uma bactéria anaeróbia gram-negativa, não-formadora de esporos, em forma de bastonete, que produz ácido butírico como um produto principal da fermentação (Nagaraja et al., 2005). Existem vários fatores de virulência associados com a toxicidade, adesão e agregação, que estão implicados na patogênese de infecções por *F. necrophorum.* No entanto, a leucotoxina (LKT) é considerada o principal fator de virulência associado a infecções em animais (Tan *et al.*, 1994; Narayanan *et al.*, 2002). Sabe-se que a LKT é altamente tóxica para PMNs bovinos (Tan *et al.*, 1994), induzindo morte dos PMNs mediada por apoptose (Narayanan et al., 2002); sendo que esta toxicidade é dependente da dose (Tan *et al.*, 1992). É possível que a LKT atue no útero através do enfraquecimento da defesa intrauterina mediada por PMNs, prejudicando a capacidade do sistema imunológico inato para eliminar infecções bacterianas do útero através de fagocitose. Recentemente, relatou-se que a aderência de *F. necrophorum* a células endoteliais de bovinos é mediada por proteínas de membrana externa (Kumar et al., 2013), especificamente, o fator de virulência FomA (Kumar et al., 2015).

Fusobacterium necrophorum e *T. pyogenes* são conhecidos por serem microorganismos sinérgicos, causando inúmeras infecções em bovinos, como abcessos no fígado, casco, pulmões e mandíbula, podridão dos cascos, mastite de verão e difteria em bezerros (Nagaraja *et al.*, 2005). Esta sinergia é também observada em doenças uterinas (Dohmen *et al.*, 2000; Bicalho *et al.*, 2012; Machado *et al.*, 2012c).

Trueperella pyogenes

Trueperella pyogenes, uma bactéria Gram-positiva, não-móvel, não formadora de esporos, em forma de bastonete curto (Jost e Billington, 2005), é um habitante comum das vias urogenital, gastrointestinal e respiratórias superiores de muitas espécies de animais (Hagan *et al.*, 1988; Narayanan *et al.*, 1998; Carter e Wise, 2004). No entanto, uma agressão física ou microbiana ao hospedeiro pode levar a uma variedade de infecções supurativas por *T. pyogenes*. Este é um agente patogénico oportunista, que atua em sinergia com *F. necrophorum*, e é consistentemente associado com metrite e especialmente endometrite (Studer e Morrow, 1978; Bonnett e Martin, 1995;. Williams *et al.*, 2005; Bicalho *et al.*, 2012;. Machado *et al.*, 2012a, c).

A *Trueperella pyogenes* possui vários fatores de virulência, potenciais ou já conhecidos, que são importantes para o seu potencial patogênico. O seu principal fator de virulência, piolisina (PLO), é uma potente citolisina dependente de colesterol e que está associada com dano tecidual causado pela infecção por *T. pyogenes* (Jost e Billington, 2005; Amos *et al.*, 2014). Sabe-se que a *T. pyogenes* pode provocar uma resposta inflamatória celular no útero, mas o endométrio intacto protege contra o dano do tecido por PLO (Miller *et al.*, 2007; Amos *et al.*, 2014). Demonstrou-se que a camada epitelial do endométrio é protetora contra PLO porque as células epiteliais contêm menos colesterol do que as células do estroma (Amos *et al.*, 2014). Por isso, foi sugerido que a *T. pyogenes* age no útero no pós-parto como um agente patogênico oportunista, causando doença uma vez que a camada epitelial é perdida após o

parto, por causa de infecção intrauterina anterior e/ou por um evento traumático durante o parto, tal como distocia e RP (Dohmen *et al.,* 2000; Bicalho *et al.,* 2012).

Trueperella pyogenes também expressa um número de proteínas expostas à superfície, tal como fímbrias, neuraminidases, e proteínas de ligação da matriz extracelular, que estão envolvidas na adesão e colonização da mucosa (Jost e Billington, 2005; Pietrocola *et al.,* 2007;. Santos *et al.,* 2010; Machado e Bicalho, 2014). Embora não houve associação entre fatores de virulência e doenças uterinas em um estudo (Silva *et al.,* 2008), outros relataram que o fator de virulência codificado pelo gene *fimA* foi associado com metrite (Santos *et al.,* 2010) e endometrite clínica (Bicalho *et al.,* 2012).

Outros patógenos

Uma grande variedade de outras bactérias tem sido associada com a saúde uterina pós-parto de vacas leiteiras. No entanto, não há detalhes sobre seus papéis na patogênese da metrite e endometrite. Foi relatado que as espécies *Bacteroides spp*. contribuem para a endometrite clínica, agindo em sinergia com *T. pyogenes* e F. *necrophorum* (Dohmen *et al.,* 1995; Machado *et al.,* 2012c). *Prevotella melaninogenica* foi consistentemente isolada de útero bovino doente (Olson *et al.,* 1984), e sua abundância intrauterina relativa na sétima semana pós-parto foi aumentada em vacas afetadas com endometrite clínica (Machado *et al.,* 2012c). *Streptococcus spp.* não hemolíticos e *Mannheimia haemolytica* foram associados com o odor fétido de muco, um sinal característico de infecção uterina (Williams *et al.,* 2005). A presença de *Streptococcus uberis* intra uterino no terceiro dia da lactação foi relatada como sendo altamente associada com o risco de endometrite clínica (Wagener *et al.,* 2014). Através da utilização de uma técnica de metagenômica, *Helcococcus spp* foram descritos como associados a endometrite clínica (Machado *et al.,* 2012c); *Helcococcus kunzii* e *Helcococcus ovis* foram isolados a partir de útero de vacas leiteiras apresentando metrite (Locatelli *et al.,* 2013), sugerindo que estas espécies podem desempenhar um papel na patogênese de doenças uterinas. Além disso, *Ureaplasma spp* foi altamente prevalente no útero de vacas afetadas por endometrite clínica (Machado *et al.,* 2012c); *Ureaplasma diversum* tem sido associado com vulvite granular, endometrite e falha reprodutiva (Doig *et al.,* 1980;. Kreplin *et al.,* 1987). *Staphylococcus spp.* é uma outra bactéria que foi previamente associada com prejuízos na saúde uterina e reprodução (Paisley *et al.,* 1986; Machado *et al.,* 2012c).

O BoHV-4 é o único vírus que tem sido consistentemente associado com a infecção uterina em vacas leiteiras (Parques e Kendrick, 1973; Monge *et al.,* 2006; Donofrio *et al.,* 2009, 2010; Chastant-Maillard, 2013; Jacca *et al.,* 2013). Foi descrito que o BoHV-4 pode causar infecção latente em macrófagos bovinos (Donofrio e van Santen, 2001), e que tem tropismo para células epiteliais e do estroma endometrial bovino, replicando e provocando a morte celular não apoptótica (Donofrio *et al.,* 2007 ; Jacca *et al.,* 2013). O endométrio pode responder à presença de BoHV-4 com uma resposta inflamatória e com o aumento de citocinas pró-inflamatórias IL-8 e TNF-α (Donofrio *et al.,* 2010; Jacca *et al.,* 2013.). Tem sido sugerido que o BoHV-4 atua em cooperação com uma infecção bacteriana levando a doenças no útero de vacas leiteiras (Donofrio *et al.,* 2008).

Conclusão

Metrite e endometrite são doenças altamente prevalentes em vacas leiteiras no pós-parto e ambas apresentam um impacto negativo nos sistemas modernos de produção leiteira. Elas são doenças multifatoriais complexas, e uma vasta gama de fatores contribui para a sua ocorrência. Estas doenças são frequentemente associadas com infecção bacteriana mista do útero, e os principais patógenos associados às doenças uterinas são *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes* e *Fusobacterium necrophorum.* Estas infecções são mais propensas a se desenvolverem sob algumas condições relacionadas com o hospedeiro e o ambiente. Os fatores ambientais que podem predispor a metrite e endometrite são a falta de higiene no parto, o tipo de alojamento e a estação de parição. Eventos durante o período de transição relacionados ao balanço energético negativo e desequilíbrio metabólico, deficiências minerais, que levam a imunossupressão, são também de grande importância durante o estabelecimento de infecções bacterianas intra-uterinas. Isto, combinado com eventos de trauma do endométrio durante o parto, decorrentes dos problemas de parto, aumentam o risco de metrite e endometrite. Entender todos esses fatores, e as suas relações e interações, é fundamental para a implementação de práticas de gestão para reduzir o risco de doenças e para desenvolver novas estratégias para tratar e prevenir a metrite e a endometrite. Recentemente, resultados preliminares encorajadores sobre a eficácia das vacinas polivalentes contendo componentes de *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes* e *Fusobacterium necrophorum* foram publicados (Machado et al., 2014b). Foi relatado que estimular o sistema imune do hospedeiro sistemicamente por imunização de novilhas durante o final da gestação contra componentes celulares e fatores de virulência importantes destes patógenos reduziu a incidência de metrite puerperal. No entanto, mais pesquisas são necessárias para avançar o conhecimento sobre a patogênese de doenças uterinas, e para desenvolver melhores estratégias para amenizar a imunossupressão durante o período de transição de vacas leiteiras.

Referências

Abuelo A, Hernandez J, Benedito JL, Castillo C. 2013. Oxidative stress index (OSi) as a new tool to assess redox status in dairy cattle during the transition period. *Animal*, 7:1374-1378.

Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. 2004. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol*, 5:266-271.

Amos MR, Healey GD, Goldstone RJ, Mahan SM, Duvel A, Schuberth HJ, Sandra O, Zieger P, Dieuzy-Labaye I, Smith DG, Sheldon IM. 2014. Differential endometrial cell sensitivity to a cholesterol-dependent cytolysin links *Trueperella pyogenes* to uterine disease in cattle. *Biol Reprod*, 90:54. doi: 10.1095/biolreprod.113.115972.

Avrameas S. 1991. Natural autoantibodies: From 'horror autotoxicus' to 'gnothiseauton'. *Immunol Today*, 12:154-159.

Azawi OI, Rahawy MA, Hadad JJ. 2008. Bacterial isolates associated with dystocia and retained placenta in iraqi buffaloes. *Reprod Domest Anim*, 43:286-292.

Barlund CS, Carruthers TD, Waldner CL, Palmer CW. 2008. A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. *Theriogenology*, 69:714-723.

Bell AW. 1995. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *J Anim Sci*, 73:2804-2819.

Benzaquen ME, Risco CA, Archbald LF, Melendez P, Thatcher MJ, Thatcher WW. 2007. Rectal temperature, calving-related factors, and the incidence of puerperal metritis in postpartum dairy cows. *J Dairy Sci*, 90:2804-2814.

Bicalho ML, Machado VS, Oikonomou G, Gilbert RO, Bicalho RC. 2012. Association between virulence factors of *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum*, and *Arcanobacterium pyogenes* and uterine diseases of dairy cows. *Vet Microbiol*, 157:125-131.

Bicalho ML, Lima FS, Ganda EK, Foditsch C, Meira EB Jr, Machado VS, Teixeira AG, Oikonomou G, Gilbert RO, Bicalho RC. 2014a. Effect of trace mineral supplementation on selected minerals, energy metabolites, oxidative stress, and immune parameters and its association with uterine diseases in dairy cattle. *J Dairy Sci*, 97:4281-4295.

Bicalho RC, Machado VS, Bicalho ML, Gilbert RO, Teixeira AG, Caixeta LS, Pereira RV. 2010. Molecular and epidemiological characterization of bovine intrauterine *Escherichia coli*. *J Dairy Sci*, 93:5818-5830.

Bicalho RC, Foditsch C, Gilbert R, Oikonomou G. 2014b. The effect of sire predicted transmitting ability for production traits on fertility, survivability, and health of Holstein dairy cows. *Theriogenology*, 81:257-265.

Bonnett BN, Martin SW, Gannon VP, Miller RB, Etherington WG. 1991. Endometrial biopsy in holstein-friesian dairy cows. III. Bacteriological analysis and correlations with histological findings. *Can J Vet R*es, 55:168-173.

Bonnett BN, Martin SW. 1995. Path analysis of peripartum and postpartum events, rectal palpation findings, endometrial biopsy results and reproductive performance in Holstein-Friesian dairy cows. *Prev Vet Med*, 21:279-288.

Brick TA, GM Schuenemann, Bas S, Daniels JB, Pinto CR, Rings DM, Rajala-Schultz PJ. 2012. Effect of intrauterine dextrose or antibiotic therapy on reproductive performance of lactating dairy cows diagnosed with clinical endometritis. *J Dairy Sci*, 95:1894-1905.

Bruun J, Ersboll AK, Alban L. 2002. Risk factors for metritis in Danish dairy cows. *Prev Vet Med*, 54:179-190.

Busato A, Faissle D, Kupfer U, Blum JW. 2002. Body condition scores in dairy cows: associations with metabolic and endocrine changes in healthy dairy cows. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, 49:455-460.

Cai TQ, Weston PG, Lund LA, Brodie B, McKenna DJ, Wagner WC. 1994. Association between neutrophil functions and periparturient disorders in cows. *Am J Vet Res*, 55:934-943.

Carter GR, Wise DJ. 2004. *Essentials of Veterinary Bacteriology and Mycology*. 6th ed. Ames, IA: Iowa State Press.

Castillo C, Hernandez J, Bravo A, Lopez-Alonso M, Pereira V, Benedito JL. 2005. Oxidative status during late pregnancy and early lactation in dairy cows. *Vet J*, 169:286-292.

Cebra CK, Heidel JR, Crisman RO, Stang BV. 2003. The relationship between endogenous cortisol, blood micronutrients, and neutrophil function in postparturient Holstein cows. *J Vet Intern Med*, 17:902-907.

Chastant-Maillard S. 2013. Impact of bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) on reproduction. *Transbound Emerg Dis*. doi: 10.1111/tbed.12155.

Cheong SH, Nydam DV, Galvão KN, Crosier BM, Gilbert RO. 2011. Cow-level and herd-level risk factors for subclinical endometritis in lactating Holstein cows. *J Dairy Sci*, 94:762-770.

Cheong SH, Nydam DV, Galvão KN, Crosier BM, Ricci A, Caixeta LS, Sper RB, Fraga M, Gilbert RO. 2012. Use of reagent test strips for diagnosis of endometritis in dairy cows. *Theriogenology*, 77:858-864.

Colitti M, Stefanon B. 2006. Effect of natural antioxidants on superoxide dismutase and glutathione peroxidase mRNA expression in leukocytes from periparturient dairy cows. *Vet Res Commun*, 30:19-27.

Collier RJ, Dahl GE, Van Baale MJ. 2006. Major advances associated with environmental effects on dairy cattle. *J Dairy Sci*, 89:1244-1253.

de Boer MW, LeBlanc SJ, Dubuc J, Meier S, Heuwieser W, Arlt S, Gilbert RO, McDougall S. 2014. Invited review: Systematic review of diagnostic

tests for reproductive-tract infection and inflammation in dairy cows1. *J Dairy Sci*, 97:3983-3999.

Dohmen MJ, Lohuis JA, Huszenicza G, Nagy P, Gacs M. 1995. The relationship between bacteriological and clinical findings in cows with subacute/chronic endometritis. *Theriogenology*, 43:1379-1388.

Dohmen MJ, Joop K, Sturk A, Bols PE, Lohuis JA. 2000. Relationship between intra-uterine bacterial contamination, endotoxin levels and the development of endometritis in postpartum cows with dystocia or retained placenta. *Theriogenology*, 54:1019-1032.

Doig PA, Ruhnke HL, Palmer NC. 1980. Experimental bovine genital ureaplasmosis. II. granularvulvitis, endometritis and salpingitis following uterine inoculation. *Can J Comp Med*, 44:259-266.

Donofrio G, van Santen VL. 2001. A bovine macrophage cell line supports bovine herpesvirus-4 persistent infection. *J Gen Virol*, 82:1181-1185.

s up-regulated in bovine endometrial stromal cells by the BoHV-4 IE2 gene product, ORF50/rta: a step ahead toward a mechanism for BoHV-4 induced endometritis. *Biol Reprod*, 83:919-928.

Drackley JK. 1999. ADSA foundation scholar award.biology of dairy cows during the transition period: the final frontier? *J Dairy Sci*, 82:2259-2273.

Drackley JK, Dann HM, Neil Douglas G, JanovickGuretzky NA, Litherland NB, Underwood JP, Loor JJ. 2005. Physiological and pathological adaptations in dairy cows that may increase susceptibility to periparturient diseases and disorders. *Ital J Anim Sci*, 4:323-344.

Drillich M, Beetz O, Pfutzner A, Sabin M, Sabin HJ, Kutzer P, Nattermann H, Heuwieser W. 2001. Evaluation of a systemic antibiotic treatment of toxic puerperal metritis in dairy cows. *J Dairy Sci*, 84:2010-2017.

Drillich M, Pfützner A, Sabin H, Sabin M, Heuwieser W. 2003. Comparison of two protocols for the treatment of retained fetal membranes in dairy cattle. *Theriogenology*, 59:951-960.

Drillich M, Raab D, Wittke M, Heuwieser W. 2005. Treatment of chronic endometritis in dairy cows with an intrauterine application of enzymes. A field trial. *Theriogenology*, 63:1811-1823.

DuBois PR, Williams DJ. 1980. Increased incidence of retained placenta associated with heat stress in dairy cows. *Theriogenology*, 13:115-121.

Dubuc J, Duffield TF, Leslie KE, Walton JS, LeBlanc SJ. 2010a. Definitions and diagnosis of postpartum endometritis in dairy cows. *J Dairy Sci*, 93:5225-5233.

Dubuc J, Duffield TF, Leslie KE, Walton JS, LeBlanc SJ. 2010b. Risk factors for postpartum uterine diseases in dairy cows. *J Dairy Sci*, 93:5764-5771.

Dubuc J, Duffield TF, Leslie KE, Walton JS, Leblanc SJ. 2011. Effects of postpartum uterine diseases on milk production and culling in dairy cows. *J Dairy Sci*, 94:1339-1346.

Ducusin RJ, Uzuka Y, Satoh E, Otani M, Nishimura

Donofrio G, Herath S, Sartori C, Cavirani S, Flammini CF, Sheldon IM. 2007. Bovine herpesvirus 4 is tropic for bovine endometrial cells and modulates endocrine function. *Reproduction*, 134:183-197.

Donofrio G, L Ravanetti, Cavirani S, Herath S, Capocefalo A, Sheldon IM. 2008. Bacterial infection of endometrial stromal cells influences bovine herpesvirus 4 immediate early gene activation: A new insight into bacterial and viral interaction for uterine disease. *Reproduction*, 136:361-366.

Donofrio G, Franceschi V, Capocefalo A, Cavirani S, Sheldon IM. 2009. Isolation and characterization of bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) from a cow affected by post partum metritis and cloning of the genome as a bacterial artificial chromosome. *Reprod Biol Endocrinol*, 7:83-7827-7-83.

Donofrio G, Capocefalo A, Franceschi V, Price S, Cavirani S, Sheldon IM. 2010. The chemokine IL8 i

M, Tanabe S, Sarashina T. 2003. Effects of extracellular Ca2+ on phagocytosis and intracellular Ca2+ concentrations in polymorphonuclear leukocytes of postpartum dairy cows. *Res Vet Sci*, 75:27-32.

El-Azab MA, Whitmore HL, Kakoma I, Brodie BO, McKenna DJ, Gustafsson BK. 1988. Evaluation of the uterine environment in experimental and spontaneous bovine metritis. *Theriogenology*, 29:1327-1334.

Erb HN, Martin SW. 1980. Interrelationships between production and reproductive diseases in Holstein cows. age and seasonal patterns. *J Dairy Sci*, 63:1918-1924.

Erb HN, Smith RD, Oltenacu PA, Guard CL, Hillman RB, Powers PA, Smith MC, White ME. 1985. Path model of reproductive disorders and performance, milk fever, mastitis, milk yield, and culling in holstein cows. *J Dairy Sci*, 68:3337-3349.

Foldi J, Kulcsar M, Pecsi A, Huyghe B, de Sa C, Lohuis JA, Cox P, Huszenicza G. 2006. Bacterial complications of postpartum uterine involution in cattle. *Anim Reprod Sci*, 96:265-281.

Galvão KN, Greco LF, Vilela JM, Sá Filho MF, Santos JE. 2009. Effect of intrauterine infusion of ceftiofur on uterine health and fertility in dairy cows. *J Dairy Sci*, 92:1532-1542.

Galvão KN, Flaminio MJ, Brittin SB, Sper R, Fraga M, Caixeta L, Ricci A, Guard CL, Butler WR, Gilbert RO. 2010. Association between uterine disease and indicators of neutrophil and systemic energy status in lactating Holstein cows. *J Dairy Sci*, 93:2926-2937.

Galvão KN, Pighetti GM, Cheong SH, Nydam DV, Gilbert RO. 2011. Association between interleukin-8 receptor-α (CXCR1) polymorphism and disease incidence, production, reproduction, and survival in Holstein cows. *J Dairy Sci*, 94:2083-2091.

Gilbert RO, Schwark WS. 1992. Pharmacologic considerations in the management of peripartum conditions in the cow. *Vet Clin North Am Food Anim Prac*t, 8:29-56.

Gilbert RO, Shin ST, Guard CL, Erb HN, Frajblat M. 2005. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows.

Theriogenology, 64:1879-1888.

Giuliodori MJ, Magnasco RP, Becu-Villalobos D, Lacau-Mengido IM, Risco CA, de la Sota RL. 2013. Metritis in dairy cows: risk factors and reproductive performance. *J Dairy Sci*, 96:3621-3631.

Goff JP, Stabel JR. 1990. Decreased plasma retinol, alpha-tocopherol, and zinc concentration during the periparturient period: effect of milk fever. *J Dairy Sci*, 73:3195-3199.

Goff JP, Kimura K, Horst RL. 2002. Effect of mastectomy on milk fever, energy, and vitamins A, E, and beta-carotene status at parturition. *J Dairy Sci*, 85:1427-1436.

Graugnard DE, Bionaz M, Trevisi E, Moyes KM, Salak-Johnson JL, Wallace RL, Drackley JK, Bertoni G, Loor JJ. 2012. Blood immunometabolic indices and polymorphonuclear neutrophil function in

Herr M, Bostedt H, Failing K. 2011. IgG and IgM levels in dairy cows during the periparturient period. *Theriogenology*, 75:377-385.

Hoeben D, Heyneman R, Burvenich C. 1997. Elevated levels of beta-hydroxybutyric acid in periparturient cows and in vitro effect on respiratory burst activity of bovine neutrophils. *Vet Immunol Immunopathol*, 58:165-170.

Hoeben D, Monfardini E, Opsomer G, Burvenich C, Dosogne H, De Kruif A, Beckers JF. 2000. Chemiluminescence of bovine polymorphonuclear leucocytes during the periparturient period and relation with metabolic markers and bovine pregnancy-associated glycoprotein. *J Dairy Res*, 67:249-259.

Hoedemaker M, Prange D, Gundelach Y. 2009. Body condition change ante- and postpartum, health and reproductive performance in German Holstein cows. *Reprod Domest Anim*, 44:167-173.

Huzzey JM, Veira DM, Weary DM, von Keyserlingk MAG. 2007. Prepartum behavior and dry matter intake identify dairy cows at risk for metritis. *J Dairy Sci*, 90:3220-3233.

Ingvartsen KL. 2006. Feeding-and management-related diseases in the transition cow: physiological adaptations around calving and strategies to reduce feeding-related diseases. *Anim Feed Sci Technol*, 126:175-213.

Jacca S, Franceschi V, Colagiorgi A, Sheldon M, Donofrio G. 2013. Bovine endometrial stromal cells support tumor necrosis factor alpha-induced bovine herpesvirus type 4 enhanced replication. *Biol Reprod*, 88:135. doi: 10.1095/biolreprod.112.106740.

Jost BH, Billington SJ. 2005. *Arcanobacterium pyogenes*: molecular pathogenesis of an animal opportunist. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 88:87-102.

Kaneene JB, Miller R. 1995. Risk factors for metritis in Michigan dairy cattle using herd- and cow-based modelling approaches. *Prev Vet Med*, 23:183-200.

Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*, 2:123-140.

Kasimanickam R, Duffield TF, Foster RA, Gartley CJ, Leslie KE, Walton JS, Johnson WH. 2004. peripartum dairy cows are altered by level of dietary energy prepartum. *J Dairy Sci*, 95:1749-1758.

Gröhn Y, Erb HN, McCulloch CE, Saloniemi HS. 1990. Epidemiology of reproductive disorders in dairy cattle: associations among host characteristics, disease and production. *Prev Vet Med*, 8:25-39.

Hagan WA, Bruner DW, Timoney JF, Hagan WA. 1988. *Hagan and Bruner's Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals: With Reference to Etiology, Epizootiology, Pathogenesis, Immunity, Diagnosis, and Antimicrobial Susceptibility*. 8th ed. Ithaca, NY: Comstock Publ. Associates.

Hammon DS, Evjen IM, Dhiman TR, Goff JP, Walters JL. 2006. Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Vet Immunol Immunopathol*, 113:21-29.

Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology*, 62:9-23.

Kasimanickam R, Duffield TF, Foster RA, Gartley CJ, Leslie KE, Walton JS, Johnson WH. 2005. The effect of a single administration of cephapirin or cloprostenol on the reproductive performance of dairy cows with subclinical endometritis. *Theriogenology*, 63:818-830.

Kehrli ME Jr, Nonnecke BJ, Roth JA. 1989. Alterations in bovine neutrophil function during the periparturient period. *Am J Vet Res*, 50:207-214.

Kim IH, Suh GH. 2003. Effect of the amount of body condition loss from the dry to near calving periods on the subsequent body condition change, occurrence of postpartum diseases, metabolic parameters and reproductive performance in Holstein dairy cows. *Theriogenology*, 60:1445-1456.

Kim IH, Na KJ, Yang MP. 2005. Immune responses during the peripartum period in dairy cows with postpartum endometritis. *J Reprod Dev*, 51:757-764.

Kimura K, Reinhardt TA, Goff JP. 2006. Parturition and hypocalcemia blunts calcium signals in immune cells of dairy cattle. *J Dairy Sci*, 89:2588-2595.

Klucinski W, Degorski A, Miernik-Degorska E, Targowski S, Winnicka A. 1988. Effect of ketone bodies on the phagocytic activity of bovine milk macrophages and polymorphonuclear leukocytes. *Zentralbl Veterinarmed A*, 35:632-639.

Kreplin CM, Ruhnke HL, Miller RB, Doig PA. 1987. The effect of intrauterine inoculation with *Ureaplasmadiversum* on bovine fertility. *Can J Vet Res*, 51:440-443.

Krogfelt KA, Bergmans H, Klemm P. 1990. Direct evidence that the FimH protein is the mannose-specific adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae. *Infect Immun*, 58:1995-1998.

Kumar A, Gart E, Nagaraja TG, Narayanan S. 2013. Adhesion of *Fusobacterium necrophorum* to bovine endothelial cells is mediated by outer membrane proteins. *Vet Microbiol*, 162:813-818.

Kumar A, Menon S, Nagaraja TG, Narayanan S.

2015. Identification of an outer membrane protein of *Fusobacterium necrophorum* subsp. necrophorum that binds with high affinity to bovine endothelial cells. *Vet Microbiol*, 176:196-201.

Kunz PL, Blum JW, Hart IC, Bickel H, Landis J. 1985. Effects of different energy intakes before and after calving on food intake, performance and blood hormones and metabolites in dairy cows. *Anim Prod*, 40:21-231.

Lacetera N, Scalia D, Franci O, Bernabucci U, Ronchi B, Nardone A. 2004. Short communication: Effects of nonesterified fatty acids on lymphocyte function in dairy heifers. *J Dairy Sci*, 87:1012-1014.

LeBlanc SJ, Duffield TF, Leslie KE, Bateman KG, Keefe GP, Walton JS, Johnson WH. 2002. The effect of treatment of clinical endometritis on reproductive prostaglandin F(2)alpha on subclinical endometritis and fertility in lactating dairy cows inseminated by timed artificial insemination. *J Dairy Sci*, 96:6480-6488.

Lima FS, Vieira-Neto A, Vasconcellos GS, Mingoti RD, Karakaya E, Sole E, Bisinotto RS, Martinez N, Risco CA, Galvão KN, Santos JE. 2014. Efficacy of ampicillin trihydrate or ceftiofur hydrochloride for treatment of metritis and subsequent fertility in dairy cows. *J Dairy Sci*, 97:5401-5414.

Lin HK, Oltenacu PA, Van Vleck LD, Erb HN, Smith RD. 1989. Heritabilities of and genetic correlations among six health problems in Holstein Cows1. *J Dairy Sci*, 72:180-186.

Linden TC, Bicalho RC, Nydam DV. 2009. Calf birth weight and its association with calf and cow survivability, disease incidence, reproductive performance, and milk production. *J Dairy Sci*, 92:2580-2588.

Llewellyn S, Fitzpatrick R, Kenny DA, Patton J, Wathes DC. 2008. Endometrial expression of the insulin-like growth factor system during uterine involution in the postpartum dairy cow. *Domest Anim Endocrinol*, 34:391-402.

Locatelli C, Scaccabarozzi L, Pisoni G, Bronzo V, Casula A, Testa F, Allodi S, Pollera C, Toni F, Moroni P. 2013. *Helcococcuskunzii* and *Helcococcusovis* isolated in dairy cows with puerperal metritis. *J Gen Appl Microbiol*, 59:371-374.

Lucy M, Jiang H, Kobayashi Y. 2001. Changes in the somatotrophic axis associated with the initiation of lactation. *J Dairy Sc*i, 84:E113-E119.

Lyons DT, Freeman AE, Kuck AL. 1991. Genetics of health traits in Holstein cattle. *J Dairy Sci*, 74:1092-1100.

Machado VS, Bicalho ML, Pereira RV, Caixeta LS, Bittar JH, Oikonomou G, Gilbert RO, Bicalho RC. 2012a. The effect of intrauterine administration of mannose or bacteriophage on uterine health and fertility of dairy cows with special focus on *Escherichia coli* and *Arcanobacterium pyogenes*. *J Dairy Sci*, 95:3100-3109.

Machado VS, Knauer WA, Bicalho ML, Oikonomou G, Gilbert RO, Bicalho RC. 2012b. A novel diagnostic technique to determine uterine health of Holstein cows performance in dairy cows. *J Dairy Sci*, 85:2237-2249.

LeBlanc SJ, Osawa, T Dubuc J. 2011. Reproductive tract defense and disease in postpartum dairy cows. *Theriogenology*, 76:1610-1618.

Lee CS, Meeusen E, Gogolin-Ewens K, Brandon MR. 1992. Quantitative and qualitative changes in the intraepithelial lymphocyte population in the uterus of nonpregnant and pregnant sheep. *Am J Reprod Immunol*, 28:90-96.

Lee JI, Kim IH. 2007. Pregnancy loss in dairy cows: the contributing factors, the effects on reproductive performance and the economic impact. *J Vet Sci*, 8:283-288.

Lima FS, Bisinotto RS, Ribeiro ES, Greco LF, Ayres H, Favoreto MG, Carvalho MR, Galvão KN, Santos JE. 2013. Effects of 1 or 2 treatments with at 35 days postpartum. *J Dairy Sci*, 95:1349-1357.

Machado VS, Oikonomou G, Bicalho ML, Knauer WA, Gilbert R, Bicalho RC. 2012c. Investigation of postpartum dairy cows' uterine microbial diversity using metagenomic pyrosequencing of the 16S rRNA gene. *Vet Microbiol*, 159:460-469.

Machado VS, Bicalho ML, Pereira RV, Caixeta LS, Knauer WA, Oikonomou G, Gilbert RO, Bicalho RC. 2013. Effect of an injectable trace mineral supplement containing selenium, copper, zinc, and manganese on the health and production of lactating Holstein cows. *Vet J*, 197:451-456.

Machado VS, Bicalho RC. 2014. Complete genome sequence of *Trueperella pyogenes*, an important opportunistic pathogen of livestock. *Genome Announc*, 2:e00400-14. doi:10.1128/genomeA.00400-14.

Machado VS, Bicalho ML, Gilbert RO, Bicalho RC. 2014a. Short communication: Relationship between natural antibodies and postpartum uterine health in dairy cows. *J Dairy Sci*, 97:7674-7678.

Machado VS, Bicalho ML, Meira Junior EB, Rossi R, Ribeiro BL, Lima S, Santos T, Kussler A, Foditsch C, Ganda EK, Oikonomou G, Cheong SH, Gilbert RO, Bicalho RC. 2014b. Subcutaneous immunization with inactivated bacterial components and purified protein of *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum* and *Trueperella pyogenes* prevents puerperal metritis in Holstein dairy cows. *PLoS One*, 9:e91734.

Machado VS, Oikonomou G, Ganda EK, Stephens L, Milhomem M, Freitas GL, Zinicola M, Pearson J, Wieland M, Guard C, Gilbert RO, Bicalho RC. 2015. The effect of intrauterine infusion of dextrose on clinical endometritis cure rate and reproductive performance of dairy cows. *J Dairy Sci*, 98:3849-3858.

Markusfeld O. 1984. Factors responsible for post parturient metritis in dairy cattle. *Vet Rec*, 114:539-542.

Markusfeld O, Galon N, Ezra E. 1997. Body condition score, health, yield and fertility in dairy cows. *Vet Rec*, 141:67-72.

Martinez N, Risco CA, Lima FS, Bisinotto RS, Greco LF, Ribeiro ES, Maunsell F, Galvão KN, Santos JE. 2012. Evaluation of peripartal calcium status, energetic

profile, and neutrophil function in dairy cows at low or high risk of developing uterine disease. *J Dairy Sci*, 95:7158-7172.

Martinez N, Sinedino LDP, Bisinotto RS, Ribeiro ES, Gomes GC, Lima FS, Greco LF, Risco CA, Galvão KN, Taylor-Rodriguez D, Driver JP, Thatcher WW, Santos JEP. 2014. Effect of induced subclinical hypocalcemia on physiological responses and neutrophil function in dairy cows. *J Dairy Sci*, 97:874-887.

Mateus L, Lopes da Costa L, Carvalho H, Serra P, Robalo Silva J. 2002. Blood and intrauterine leukocyte profile and function in dairy cows that spontaneously recovered from postpartum endometritis. *Reprod Domest Anim*, 37:176-180.

McDougall S, Macaulay R, Compton C. 2007. 42:139-150.

Meira Jr EBS, Henriques LCS, Sá LRM, Gregory L. 2012. Comparison of ultrasonography and histopathology for the diagnosis of endometritis in Holstein-Friesian cows. *J Dairy Sci*, 95:6969-6973.

Merrill RM. 2013. *Introduction to Epidemiology*. 6th ed. Burlington, Mass: Jones & Bartlett Learning.

Meyer CL, Berger PJ, Koehler KJ, Thompson JR, Sattler CG. 2001. Phenotypic trends in incidence of stillbirth for Holsteins in the United States. *J Dairy Sci*, 84:515-523.

Miller AN, Williams EJ, Sibley K, Herath S, Lane EA, Fishwick J, Nash DM, Rycroft AN, Dobson H, CE Bryant, Sheldon IM. 2007. The effects of *Arcanobacterium pyogenes* on endometrial function in vitro, and on uterine and ovarian function in vivo. *Theriogenology*, 68:972-980.

Monge A, Elvira L, Gonzalez JV, Astiz S, Wellenberg GJ. 2006. Bovine herpesvirus 4-associated postpartum metritis in a Spanish dairy herd. *Res Vet Sci*, 80:120-125.

Mooi FR, de Graaf FK. 1985. Molecular biology of fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *CurrTop Microbiol Immunol*, 118:119-138.

Mulvey MA. 2002. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol*, 4:257-271.

Nagaraja TG, Narayanan SK, Stewart GC, Chengappa MM. 2005. *Fusobacterium necrophorum* infections in animals: pathogenesis and pathogenic mechanisms. *Anaerobe*, 11:239-246.

Narayanan S, Nagaraja TG, Wallace N, Staats J, Chengappa MM, Oberst RD. 1998. Biochemical and ribotypic comparison of *Actinomyces pyogenes* and *A pyogenes*-like organisms from liver abscesses, ruminal wall, and ruminal contents of cattle. *Am J Vet Res*, 59:271-276.

Narayanan S, Stewart GC, Chengappa MM, Willard L, Shuman W, Wilkerson M, Nagaraja TG. 2002. *Fusobacterium necrophorum*leukotoxin induces activation and apoptosis of bovine leukocytes. *Infect Immun*, 70:4609-4620.

Ndiweni N, Finch JM. 1995. Effects of in vitro supplementation of bovine mammary gland macrophages and peripheral blood lymphocytes with alpha-tocopherol and sodium selenite: Implications for udder defenses. *Vet Immunol Immunopathol*, 47:111-121.

Noakes DE, Wallace L, Smith GR. 1991. Bacterial flora of the uterus of cows after calving on two hygienically contrasting farms. *Vet Rec*, 128:440-442.

Oikonomou G, Angelopoulou K, Arsenos G, Zygoyiannis D, Banos G. 2009. The effects of polymorphisms in the DGAT1, leptin and growth hormone receptor gene loci on body energy, blood metabolic and reproductive traits of Holstein cows. *Anim Genet*, 40:10-17.

Olson JD, Ball L, Mortimer RG, Farin PW, Adney WS, Huffman EM. 1984. Aspects of bacteriology and endocrinology of cows with pyometra and retained fetal membranes. *Am J Vet Res*, 45:2251-2255.

Ospina PA, Nydam DV, Stokol T, Overton TR. 2010. Evaluation of nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: critical thresholds for prediction of clinical diseases. *J Dairy Sci*, 93:546-554.

Overton M, Fetrow J. 2008. Economics of postpartum uterine health. *In*: Proceedings of the Dairy Cattle Reproduction Council Convention, 2008, Omaha NE, USA. Champaign, IL: DCRC. pp. 39-43.

Padua MB, Tekin S, Spencer TE, Hansen PJ. 2005. Actions of progesterone on uterine immunosuppression and endometrial gland development in the uterine gland knockout (UGKO) ewe. *Mol Reprod Dev*, 71:347-357.

Paisley LG, Mickelsen WD, Anderson PB. 1986. Mechanisms and therapy for retained fetal membranes and uterine infections of cows: a review. *Theriogenology*, 25:353-381.

Parks JB, Kendrick JW. 1973. The isolation and partial characterization of a herpesvirus from a case of bovine metritis. *Arch Gesamte Virusforsch*, 41:211-215.

Piechotta M, Sander AK, Kastelic JP, Wilde R, Heppelmann M, Rudolphi B, Schuberth HJ, Bollwein H, Kaske M. 2012. Short communication: Prepartum plasma insulin-like growth factor-I concentrations based on day of insemination are lower in cows developing postpartum diseases. *J Dairy Sci*, 95:1367-1370.

Association between endometritis diagnosis using a novel intravaginal device and reproductive performance in dairy cattle. *Anim Reprod Sci*, 99:9-23.

McDougall S, de Boer M, Compton C, Leblanc SJ. 2013. Clinical trial of treatment programs for purulent vaginal discharge in lactating dairy cattle in New Zealand. *Theriogenology*, 79:1139-1145.

Mee JF, Berry DP, Cromie AR. 2011. Risk factors for calving assistance and dystocia in pasture-based Holstein–Friesian heifers and cows in Ireland. *Vet J*, 187:189-194.

Meglia GE, Johannisson A, Petersson L, Waller KP. 2001. Changes in some blood micronutrients, leukocytes and neutrophil expression of adhesion molecules in periparturient dairy cows. *Acta Vet Scand*,

Pietrocola G, Valtulina V, Rindi S, Jost BH, Speziale P. 2007. Functional and structural properties of CbpA, a collagen-binding protein from *Arcanobacterium pyogenes*. *Microbiology*, 153:3380-3389.

Pinedo PJ, Galvão KN, Seabury CM. 2013. Innate immune gene variation and differential susceptibility to uterine diseases in Holstein cows. *Theriogenology*, 80:384-390.

Polat B, Cengiz M, Cannazik O, Colak A, Oruc E, Altun S, Salar S, Bastan A. 2015. Endometrial echotexture variables in postpartum cows with subclinical endometritis. *Anim Reprod Sci*, 155:50-55.

Potter TJ, Guitian J, Fishwick J, Gordon PJ, Sheldon IM. 2010. Risk factors for clinical 4396.

Roche JR, Friggens NC, Kay JK, Fisher MW, Stafford KJ, Berry DP. 2009. Invited review: Body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare. *J Dairy Sci*, 92:5769-5801.

Ruder CA, Sasser RG, Williams RJ, Ely JK, Bull RC, Butler JE. 1981. Uterine infections in the postpartum cow: II. possible synergistic effect of *Fusobacterium necrophorum* and *Corynebacterium pyogenes*. *Theriogenology*, 15:573-580.

Rukkwamsuk T, Kruip TA, Wensing T. 1999. Relationship between overfeeding and overconditioning in the dry period and the problems of high producing dairy cows during the postparturient period. *Vet Q*, 21:71-77.

Runciman DJ, Anderson GA, Malmo J, Davis GM. 2008. Effect of intrauterine treatment with cephapirin on the reproductive performance of seasonally calving dairy cows at risk of endometritis following periparturient disease. *Aust Vet J*, 86:250-258.

Saloniemi H, Grohn Y, Syvajarvi J. 1986. An epidemiological and genetic study on registered diseases in Finnish Ayrshire cattle. II. reproductive disorders. *Acta Vet Scand*, 27:196-208.

Santos TM, Caixeta LS, Machado VS, Rauf AK, Gilbert RO, Bicalho RC. 2010. Antimicrobial resistance and presence of virulence factor genes in *Arcanobacterium pyogenes* isolated from the uterus of postpartum dairy cows. *Vet Microbiol*, 145:84-89.

Santos TM, Gilbert RO, Bicalho RC. 2011. Metagenomic analysis of the uterine bacterial microbiota in healthy and metritic postpartum dairy cows. *J Dairy S*ci, 94:291-302.

Santos TM, Bicalho RC. 2012. Diversity and succession of bacterial communities in the uterine fluid of postpartum metritic, endometritic and healthy dairy cows. *PLoS One*, 7:e53048.

Scalia D, Lacetera N, Bernabucci U, Demeyere K, Duchateau L, Burvenich C. 2006. In vitro effects of nonesterified fatty acids on bovine neutrophils oxidative burst and viability. *J Dairy Sci*, 89:147-154.

Schuenemann GM, Nieto I, Bas S, Galvão KN, Workman J. 2011. Dairy calving management: effect of perineal hygiene scores on metritis. *J Dairy Sci*, endometritis in postpartum dairy cattle. *Theriogenology*, 74:127-134.

Prunner I, Wagener K, Pothmann H, Ehling-Schulz M, Drillich M. 2014. Risk factors for uterine diseases on small- and medium-sized dairy farms determined by clinical, bacteriological, and cytological examinations. *Theriogenology*, 82:857-865.

Rajala PJ, Grohn YT. 1998. Effects of dystocia, retained placenta, and metritis on milk yield in diary cows. *J Dairy Sci*, 81:3172-3181.

Roche JR, Berry DP, Lee JM, Macdonald KA, Boston RC. 2007. Describing the body condition score change between successive calvings: a novel strategy generalizable to diverse cohorts. *J Dairy Sci*, 90:4378-94(E-suppl. 1):744. (abstract).

Senosy WS, Uchiza M, Tameoka N, Izaike Y, Osawa T. 2009. Association between evaluation of the reproductive tract by various diagnostic tests and restoration of ovarian cyclicity in high-producing dairy cows. *Theriogenology*, 72:1153-1162.

Sens A, Heuwieser W. 2013. Presence of *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes*, α-hemolytic streptococci, and coagulase-negative staphylococci and prevalence of subclinical endometritis. *J Dairy Sci*, 96:6347-6354.

Shankar AH, Prasad AS. 1998. Zinc and immune function: The biological basis of altered resistance to infection. *Am J Clin Nutr*, 68:447S-463S.

Sheldon IM, Lewis GS, LeBlanc S, Gilbert RO. 2006. Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology*, 65:1516-1530.

Sheldon IM, Rycroft AN, Dogan B, Craven M, Bromfield JJ, Chandler A, Roberts MH, Price SB, Gilbert RO, Simpson KW. 2010. Specific strains of *Escherichia coli* are pathogenic for the endometrium of cattle and cause pelvic inflammatory disease in cattle and mice. *PLoS One*, 5:e9192.

Silva E, Gaivão M, Leitão S, Jost BH, Carneiro C, Vilela CL, Lopes da Costa L, Mateus L. 2008. Genomic characterization of *Arcanobacterium pyogenes* isolates recovered from the uterus of dairy cows with normal puerperium or clinical metritis. *Vet Microbiol*, 132:111-118.

Silva E, Leitão S, Tenreiro T, Pomba C, Nunes T, Lopes da Costa L, Mateus L. 2009. Genomic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates recovered from the uterus of puerperal dairy cows. *J Dairy Sci*, 92:6000-6010.

Smith BI, Donovan GA, Risco C, Littell R, Young C, Stanker LH, Elliott J. 1998. Comparison of various antibiotic treatments for cows diagnosed with toxic puerperal metritis. *J Dairy Sci*, 81:1555-1562.

Sordillo LM. 2005. Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Livest Prod Sci*, 98:89-99.

Sordillo LM, O'Boyle N, Gandy JC, Corl CM, Hamilton E. 2007. Shifts in thioredoxin reductase activity and oxidant status in mononuclear cells obtained from transition dairy cattle. *J Dairy Sci*, 90:1186-1192.

Spears JW, Weiss WP. 2008. Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows. *Vet J*, 176:70-76.

Strang BD, Bertics SJ, Grummer RR, Armentano LE. 1998. Effect of long-chain fatty acids on triglyceride accumulation, gluconeogenesis, and ureagenesis in bovine hepatocytes. *J Dairy Sci*, 81:728-739.

Studer E, Morrow DA. 1978. Postpartum evaluation of bovine reproductive potential: comparison of findings from genital tract examination per rectum, uterine culture, and endometrial biopsy. *J Am Vet Med Assoc*, 172:489-494.

Uematsu M, Sasaki Y, Kitahara G, Sameshima H, Osawa T. 2013. Risk factors for stillbirth, dystocia in Japanese black cattle. *Vet J*, 198:212-216.

Urton G, von Keyserlingk MAG, Weary DM. 2005. Feeding behavior identifies dairy cows at risk for metritis. *J Dairy Sci*, 88:2843-2849.

Van Dorp TE, Dekkers JCM, Martin SW, Noordhuizen JPTM. 1998. Genetic parameters of health disorders, and relationships with 305-day milk yield and conformation traits of registered Holstein cows. *J Dairy Sci*, 81:2264-2270.

Van Knegsel AT, de Vries Reilingh G, Meulenberg S, van den Brand H, Dijkstra J, Kemp B, Parmentier HK. 2007. Natural antibodies related to energy balance in early lactation dairy cows. *J Dairy Sci*, 90:5490-5498.

Van Knegsel AT, Hostens M, de Vries Reilingh G, Lammers A, Kemp B, Opsomer G, Parmentier HK. 2012. Natural antibodies related to metabolic and mammary health in dairy cows. *Prev Vet Med*, 103:287-297.

Vergara CF, Döpfer D, Cook NB, Nordlund KV, McArt JAA, Nydam DV, Oetzel GR. 2014. Risk factors for postpartum problems in dairy cows: Explanatory and predictive modeling. *J Dairy Sci*, 97:4127-4140.

Wagener K, Grunert T, Prunner I, Ehling-Schulz M, Drillich M. 2014. Dynamics of uterine infections with Escherichia coli, *Streptococcus uberis* and *Trueperella pyogenes* in post-partum dairy cows and their association with clinical endometritis. *Vet J*, 202:527-532.

Wathes DC, Cheng Z, Chowdhury W, Fenwick MA, Fitzpatrick R, Morris DG, Patton J, Murphy JJ. 2009. Negative energy balance alters global gene expression and immune responses in the uterus of postpartum dairy cows. *Physiol Genomics*, 39:1-13.

Wathes DC, Cheng Z, Fenwick MA, Fitzpatrick R, Patton J. 2011. Influence of energy balance on the somatotrophic axis and matrix metalloproteinase expression in the endometrium of the postpartum dairy cow. *Reproduction*, 141:269-281.

Suriyasathaporn W, Daemen AJ, Noordhuizen-Stassen EN, Dieleman SJ, Nielen M, Schukken YH. 1999. Beta-hydroxybutyrate levels in peripheral blood and ketone bodies supplemented in culture media affect the in vitro chemotaxis of bovine leukocytes. *Vet Immunol Immunopathol*, 68:177-186.

Tan ZL, Nagaraja TG, Chengappa MM. 1992. Factors affecting the leukotoxin activity of *Fusobacterium necrophorum*. *Vet Microbiol*, 32:15-28.

Tan ZL, Nagaraja TG, Chengappa MM, Smith JS. 1994. Biological and biochemical characterization of *Fusobacterium necrophorum*leukotoxin. *Am J Vet Res*, 55:515-521.

Westermann S, Drillich M, Kaufmann TB, Madoz LV, Heuwieser W. 2010. A clinical approach to determine false positive findings of clinical endometritis by vaginoscopy by the use of uterine bacteriology and cytology in dairy cows. *Theriogenology*, 74:1248-1255.

Williams EJ, Fischer DP, Pfeiffer DU, England GC, Noakes DE, Dobson H, Sheldon IM. 2005. Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. *Theriogenology*, 63:102-117.

Wittrock JM, Proudfoot KL, Weary DM, von Keyserlingk MA. 2011. Short communication: Metritis affects milk production and cull rate of Holstein multiparous and primiparous dairy cows differently. *J Dairy Sci*, 94:2408-2412.

Xin Z, Waterman DF, Hemken RW, Harmon RJ. 1993. Copper status and requirement during the dry period and early lactation in multiparous Holstein cows. *J Dairy Sci*, 76:2711-2716.

Yasui T, McArt JA, Ryan CM, Gilbert RO, Nydam DV, Valdez F, Griswold KE, Overton TR. 2014. Effects of chromium propionate supplementation during the periparturient period and early lactation on metabolism, performance, and cytological endometritis in dairy cows. *J Dairy Sci*, 97:6400-6410.

Zarrin M, Wellnitz O, van Dorland HA, Bruckmaier RM. 2014. Induced hyperketonemia affects the mammary immune response during lipopolysaccharide challenge in dairy cows. *J Dairy Sci*, 97:330-339.

Zwald NR, Weigel KA, Chang YM, Welper RD, Clay JS. 2004a. Genetic selection for health traits using producer-recorded data. I. Incidence rates, heritability estimates, and sire breeding values. *J Dairy Sci*, 87:4287-4294.

Zwald NR, Weigel KA, Chang YM, Welper RD, Clay JS. 2004b. Genetic selection for health traits using producer-recorded data. II. Genetic correlations, disease probabilities, and relationships with existing traits. *J Dairy Sci*87:4295-4302.,

Produção *in vitro* de embriões bovinos: Reconsiderando o desenvolvimento oócitário e a aplicação da biologia de sistemas

L. Stroebech[1], G. Mazzoni[2], H.S. Pedersen[3], K.K. Freude[2], H.N. Kadarmideen[2], H. Callesen[3], P. Hyttel[2,4]

[1]EmbryoTrans Biotech ApS, Koege, Denmark.
[2]Department of Clinical Veterinary and Animal Sciences, University of Copenhagen, Denmark.
[3]Department of Animal Science, Aarhus University, Denmark

Resumo

A produção *in vitro* (PIV) de embriões tornou-se uma tecnologia amplamente utilizada em sistemas de criação e produção de bovinos. A implementação da seleção genômica e da biologia de sistemas acrescenta grande dimensão ao impacto da PIV bovina. Os procedimentos físicos incluídos no processo de PIV ainda podem ser melhorados, e os aspectos relacionados às doadoras, à maturação de oócitos e às receptoras de embrião são abordados a seguir. Além disso, algumas das tendências futuras da seleção genômica e da biologia de sistemas são discutidas, com destaque específico para a colaboração Brasil-Dinamarca no projeto denominado GIFT.

Palavras-chave: bovino, fertilização, genoma, oócito.

Introdução

Nos últimos anos, a produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos foi implementada em sistemas de criação de gado em muitos países. Particularmente, a América do Sul e a do Norte são as regiões onde esta tecnologia ganhou grande destaque. Do ponto de vista biológico, a PIV foi melhorada de forma a contornar alguns dos primeiros inconvenientes relacionados às condições de cultivo de embriões, caracterizadas pela alta concentração de soro fetal bovino, o que resultava na ocorrência da Síndrome do Bezerro Grande (SBG). Do ponto de vista da realização de cruzamentos, a implementação da punção folicular guiada por ultrassom (OPU), da genômica quantitativa e da biologia de sistemas abriu novas possibilidades para a seleção de dadoras de oócitos e embriões, visando a melhoria das estratégias de cruzamento.

Apesar das melhorias dos procedimentos *in vitro* que mimetizam a maturação de oócitos, a fertilização e o desenvolvimento embrionário inicial, a PIV ainda precisa de refinamentos. A presente revisão tem como objetivo reconsiderar, em particular, o desenvolvimento de oócitos, abordando aspectos pontuais dos sistemas de PIV em bovinos que ainda não estão otimizados, quando comparados aos sistemas de desenvolvimento *in vivo*, bem como os aspectos relacionados às doadoras de oócitos de diferentes fases reprodutivas e idades. Além disso, objetivamos direcionar a implementação da biologia de sistemas na PIV em bovinos e fazer algumas considerações práticas sobre a implementação desta tecnologia na Dinamarca; um país onde a criação de gado atingiu um elevado nível de aperfeiçoamento, mas a implementação da PIV bovina foi adiada devido a considerações éticas a respeito do bem-estar animal, relacionadas à OPU e à SBG.

Interações tuba uterina e gametas: conversas ou negociações?

Desenvolvimento oocitário em novilhas póspuberais e vacas

O desenvolvimento de um oócito competente para estar presente na tuba uterina para fertilização pode ser dividido em três fases distintas. A estrutura celular básica (ultraestrutura) e a capacidade de desenvolvimento do oócito é gerada durante a primeira fase (a fase de crescimento dos oócitos), quando o crescimento dos oócitos acompanha o crescimento folicular desde o folículo primordial até o folículo terciário (antral) pequeno (2-3 mm). Durante a fase de folículos antrais quando folículos de um grupo alcançam um diâmetro de cerca de 3-5 mm, um folículo dominante é selecionado, em oposição a um grupo de folículos subordinados (Fig 1;. Ginther *et al.*, 1989). A ultraestrutura do oócito do folículo dominante entra numa segunda fase (pré-maturação do oócito ou capacitação), onde é modificada refletindo um aumento na capacidade de desenvolvimento do oócito. No folículo ovulatório, ou seja, o folículo dominante da última onda de crescimento folicular, o oócito sofre uma terceira e última fase de alterações ultraestruturais (maturação do oócito) durante um período de cerca de 24 h entre o momento do pico máximo de LH e a ovulação.

Quando oócitos são aspirados para PIV a partir de folículos de 2-8 mm de diâmetro, eles são recuperados a partir de um conjunto heterogêneo e não totalmente competente de folículos. Assim, eles são originários de folículos antrais de ondas de crescimento folicular não-ovulatórias ou ovulatórias e de folículos iniciais, subordinados ou dominantes. Consequentemente, os oócitos não concluíram a aquisição de competência para o desenvolvimento, que foi projetada no folículo dominante (prematuração do oócito), e alguns deles podem até ter encontrado o ambiente de folículos atrésicos iniciais.

A fim de revelar as alterações ultraestruturais durante as três fases do desenvolvimento do oócito, nós

Autor correspondente: poh@sund.ku.dk

cuidadosamente processamos oócitos de folículos pré-antrais (folículos primordiais, primários e secundários, para microscopia eletrônica de transmissão (Fair *et al.*, 1997), bem como de folículos antrais, levando-se em consideraçaoo seu estado de dominante ou subordinado (Assey *et al.*, 1994), e de folículos pré-ovulatórios que se aproximavam da ovulação (Hyttel *et al.*, 1986). A definição exata de folículos dominantes vs. subordinados foi conseguida através da administração de prostaglandina-F2alfa no dia 7 após a ovulação. Este tratamento estimula a ovulação do folículo dominante da primeira onda folicular. Esse modelo simples permite a recuperação de oócitos em etapas bem definidas de dominância folicular e subordinação. As alterações ultraestruturais associadas com o desenvolvimento dos oócitos

A partir dos dados apresentados na Fig. 2, é óbvio que o oócito durante as fases de crescimento e pré-maturação passa por mudanças bem ressaltadas que são refletidas em sua competência de desenvolvimento e que são significativas para a obtenção de competência completa do oócito após a maturação *in vivo* bem como *in vitro*. De acordo com estudos funcionais dos oócitos bovinos em diferentes fases do seu desenvolvimento, parece que o oócito atinge a sua competência básica para completar a maturação meiótica a metáfase meiótica II (MII) com um diâmetro de cerca de 110 µm (isto é, durante a fase de crescimento do oócito no momento em que a transcrição diminui), e com um diâmetro de cerca de 120 µm ele atinge a competência para o desenvolvimento embrionário subsequente. Assim, oócitos recuperados a partir de folículos com menos de 3 mm de diâmetro não completaram a fase de crescimento e não acumularam o mínimo requisitado de mRNA e proteínas para sustentar o desenvolvimento (Fair *et al.*, 1995, 1996, 1997). Durante a fase de pré-maturação subsequente, o oócito exibe outras modulações estruturais (Fig. 2) e sua capacidade de desenvolvimento aumenta (Assey *et al.*, 1994). Surpreendentemente, os oócitos de folículos subordinados, que acabaram de entrar em fase da atresia, podem apresentar alterações muito semelhantes como as vistas no oócito do folículo dominante. Em circunstâncias normais eles poderão ser oócitos de folículos em pré-maturação ou atresia inicial, que serão aspirados para PIV de embriões bovinos.

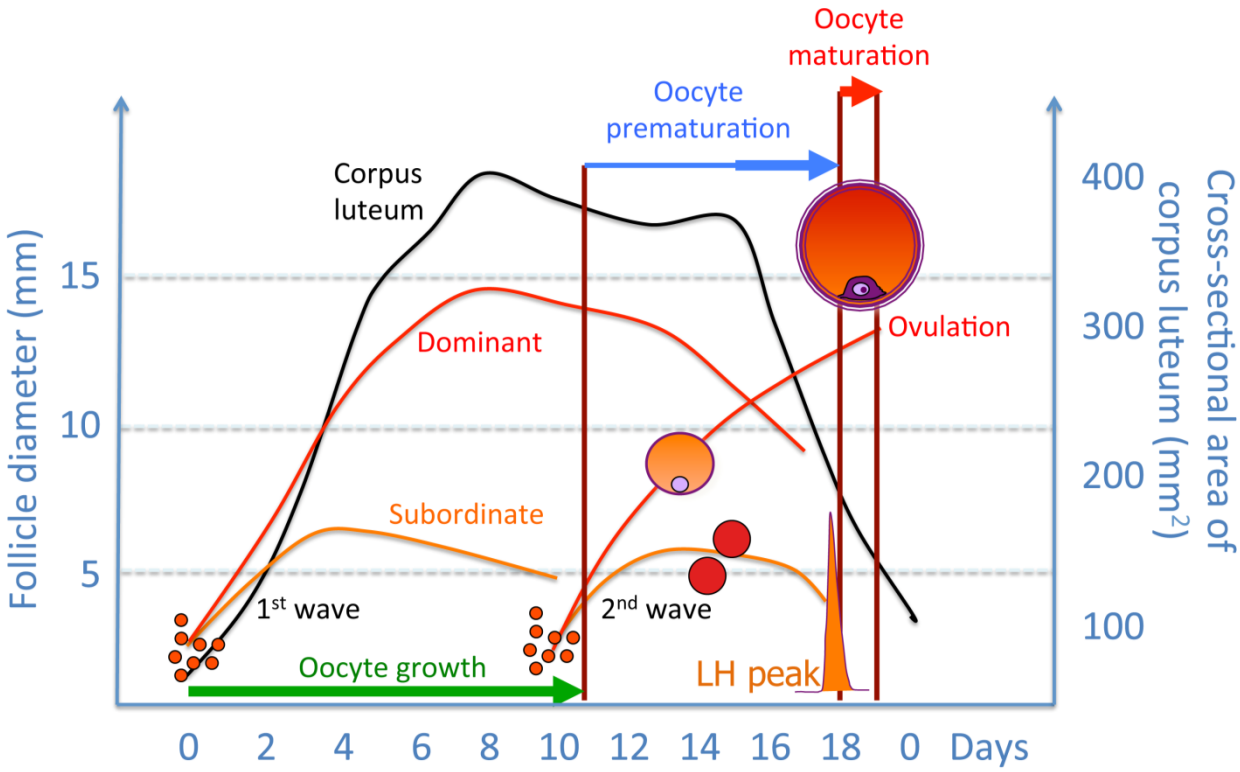

Figura 1. Ondas foliculares e fases de desenvolvimento do oócito em bovinos (adaptado de Ginther, 1998). O eixo inferior indica dias após a ovulação.

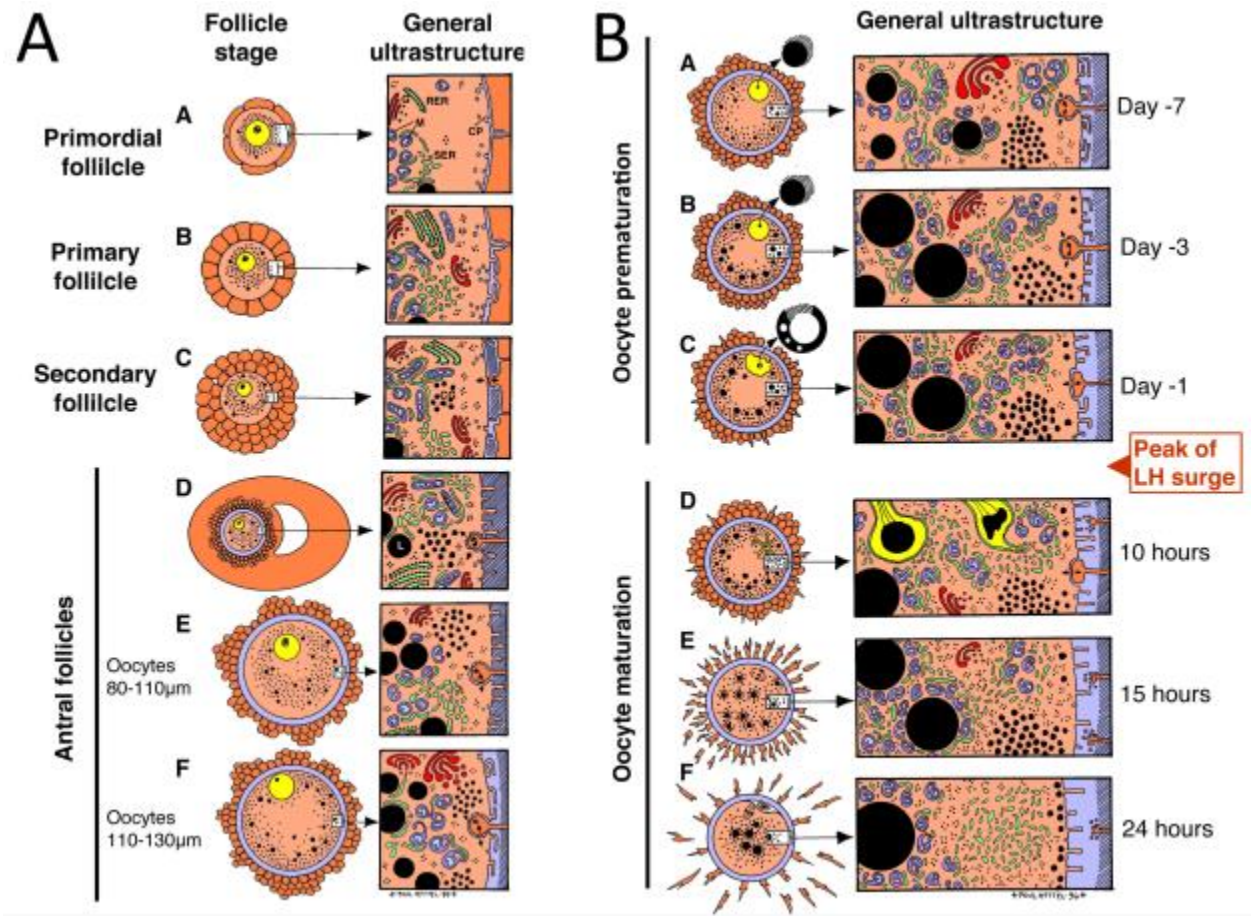

Figura 2. **(A)** Desenho esquemático do crescimento oocitário em bovinos. **(A_A)** folículo primordial com oócito rodeado por uma única camada de células da granulosa achatadas. O núcleo (amarelo) central do oócito é cercado por mitocôndrias arredondadas (M), retículo endoplasmático liso (SER) e rugoso (RER) e pequenos complexos de Golgi (G). O córtex do oócito apresenta inúmeros poços (PB) e vesículas revestidos. O oócito é transcricionalmente quiescente. **(A_B)** Folículos primários com oócito rodeado por uma única camada de células da granulosa cubóides. O núcleo excêntrico do oócito está rodeado por mitocôndrias arredondadas e alongadas. **(A_C)** Folículo secundário com oócito rodeado por mais do uma camada de células da granulosa cubóides. Pequenas manchas de material de zona pelúcida (áreas sombreadas) têm aparecido e junções comunicantes (*gap junctions*; pequenas setas) desenvolveram-se entre o oócito e as células da granulosa. No oócito, os primeiros pequenos aglomerados de grânulos corticais (GC). O oócito exibe atividade de transcrição inicial. **(A_D)** Folículo terciário iniciais com cerca de 1 mm. O antro folicular desenvolveu-se e o oócito é rodeado por células do cumulus das quais as localizadas mais interiormente possuem saliências que penetram na zona pelúcida, invaginam e estabelecem junções comunicantes com o oolema. No oócito, as organelas atingiram uma distribuição mais uniforme ao longo do ooplasma, mitocôndrias alongadas tornaram-se mais numerosas, gotículas lipídicas (L) tornaram-se comuns, e o número e tamanho dos aglomerados de grânulos corticais aumentaram. Microvilosidades eretas tornaram-se incorporadas na zona pelúcida. O oócito é transcricionalmente ativo. **(A_E)** Folículo terciário até cerca de 3 mm, contendo oócitos de 80-110 µm de diâmetro. O número de gotículas lipídicas no oócito aumetou. Oócitos menores do que 100 µm são transcricionalmente ativos, ao passo que em oócitos de 100-110 µm a transcrição diminui em abundância. **(A_F)** Folículos terciários maiores, contendo oócitos com mais de 110 µm de diâmetro. No oócito, as organelas foram deslocados para a periferia, o número de gotículas lipídicas aumentou, assim como o tamanho dos complexos de Golgi. As microvilosidades foram liberadas a partir da zona pelúcida e se acumulam em pilhas no espaço perivitelino. Os presentes núcleo do oócito periférico tem sua atividade transcricional reduzida a um mínimo. **(B)** Desenho esquemático de aspectos ultraestruturais da pré-maturação de oócitos bovinos no folículo dominante até o pico de LH e maturação após o pico. **(B_A)** Oócitos de um folículo dominante seis dias antes do pico de LH. A ultraestrutura geral é idêntica à do final do crescimento do oócito (A_F). **(B_B)** Oócitos de um folículo dominante 3 dias antes do pico de LH. O número de pilhas de microvilosidades diminui assim como o tamanho dos complexos de Golgi, a quantidade de gotículas lipídicas aumentou, e os aglomerados de grânulos corticais se deslocaram para um local mais superficial. **(B_C)** Oócitos de um folículo dominante no dia anterior ao pico de LH. Algumas células individuais da corona são alongadas e as projeções das células da corona foram retraídas para uma localização mais superficial, o espaço

perivitelino ampliou, as microvilosidades tornaram-se mais eretas, e o tamanho dos complexos de Golgi foi ainda mais reduzido. Além disso, o envelope nuclear do oócito tornou-se ondulado e o remanescente nucleolar foi transformado numa estrutura em forma de anel. **(B_D)** Oócitos no "rompimento da vesícula germinal" a partir de um folículo ovulatório 9-12 h após o pico de LH. O espaço perivitelino desenvolve-se no oócito e as mitocôndrias tendem a se organizar em torno das gotículas lipídicas e o envelope nuclear é dissolvido em túbulos de SER e microtúbulos aparecem adjacentes aos cromossomos em condensação. **(B_E)** Oócitos MI a partir de um folículo ovulatório cerca de 15 h após o pico de LH. O número e tamanho das gotículas lipídicas aumentaram e as mitocôndrias se localizam em volta das gotículas e estes aglomerados atingiram uma distribuição mais uniforme. Numerosos ribossomos têm aparecido especialmente em torno dos cromossomos e o tamanho dos complexos de Golgi diminuiu ainda mais. **(B_F)** Oócitos em MII de um folículo ovulatório em cerca de 24 h após o pico de LH. A maior parte dos grânulos corticais é distribuída em posições solitárias ao longo do oolema. As gotículas lipídicas e mitocôndrias atingiram uma localização mais central no ooplasma deixando uma zona periférica um pouco livre de organelas caracterizada principalmente por grandes aglomerados de SER (adaptado de Hyttel, 2011)

Idade e status da doadora de oócito

Há uma tendência crescente na criação de animais de produção para se realizar OPU, e posteriormente IVP em fêmeas cada vez mais jovens, a fim de acelerar o progresso genético através da redução do intervalo de gerações. Além disso, algumas doadoras estão em período de lactação com alta produção de leite e/ou no início da gestação. Cada uma destas diferentes situações representa um desafio particular a respeito da competência de desenvolvimento do oócito, o que pode mudar de acordo com o status da doadora.

Ovários de fêmeas jovens contêm folículos pré-antrais e antrais, sendo que o número total de folículos varia entre indivíduos (Silva-Santos *et al.,* 2013). O número de folículos em crescimento aumenta rapidamente entre 50-80 dias após o nascimento e aumenta até os 120 dias. Este crescimento de folículos é estimulado por um aumento transitório na secreção de LH e FSH, que depois diminui até imediatamente antes da primeira ovulação, momento em que a concentração de LH circulante e o padrão de secreção pulsátil aumenta e se modifica. Durante o período pré puberal ondas foliculares estão presentes e são precedidas por picos de FSH (Erickson, 1966;. Rawlings *et al.,* 2003). Mesmo que seja possível aspirar folículos antrais de novilhas muito jovens, os oócitos tem reduzida capacidade de desenvolvimento em relação aos adultos (Steeves *et al.,* 1999), o que é ilustrado por exemplo, por diferenças na ultraestrutura (Duby *et al.,* 1996), no metabolismo do oócito (Steeves e Gardner, 1999), e na maturação citoplasmática (Salamone *et al.,* 2001).

Em vacas de alta produção leiteira no pós-parto, baixas concentrações de esteróides circulantes tem sido mensuradas, o que poderia indicar que os folículos dominantes estão produzindo menos estrógeno, o que afeta a fase de crescimento do folículo (Lopez *et al.,* 2004; Sartori *et al.,* 2004). Além disso, o balanço energético negativo em vacas leiteiras no pós-parto tem um efeito adverso sobre a qualidade do oócito, devido à alteração dos perfis endócrino e metabólicos (Leroy *et al.,* 2008). Em animais gestantes, o crescimento folicular é, possivelmente, afetado por concentrações elevadas de progesterona (Adams *et al.,* 1992; Dominguez, 1995).

Como ilustrado acima, as expectativas e os resultados de OPU e PIV em bovinos dependem do status reprodutivo e fisiológico da doadora de oócito, determinado por fatores como a genética, idade, raça, nutrição, gestação, produção de leite, etc. Mais pesquisas são necessárias para investigar as possibilidades de avaliação e melhoria da qualidade do oócito por exemplo por tratamentos hormonais com base no status individual da dadora (ex.: Ireland *et al.,* 2007). Além disso, a inclusão de um período de retirada FSH antes aspiração demonstrou efeitos positivos no resultado da PIV ("*coasting*"; Blondin *et al.,* 2012; Nivet *et al.,* 2012). Por fim, as possibilidades de utilização do hormônio anti-mülleriano (AMH) plasmático como um estimador do potencial da doadora devem ser mais investigadas, incluindo fêmeas jovens (Silva-Santos *et al.,* 2013; Guerreiro *et al.,* 2014).

Novos desenvolvimentos em meios para a produção *in vitro*

Por muitos anos, a produção *in vitro* de embriões bovinos utiliza-se de composições de meios artesanais com base em soluções estoque disponíveis no mercado: Tissue Culture Medium 199 (TCM 199, Sigma-Aldrich), Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate (TALP) stocks (Parrish *et al.,* 1986), e Synthetic Oviduct Fluid (SOF) com algumas modificações (Tervit *et al.,* 1972; Holm *et al.,* 1999), sendo que a maior parte deles contem soro. Todos os meios para a FIV são baseados em uma solução salina equilibrada, soluções de aminoácidos e piruvato. Compostos adicionais são as vitaminas, EDTA, e tampões de íons metálicos.

Com a crescente implementação da PIV de embriões de bovinos para uso comercial em todo o mundo, há um aumento do foco na otimização da produção de blastocistos. Além disso, a crescente atenção voltada para as restrições regulatórias sobre importação/exportação de embriões cultivados em meio contendo soro devido ao risco de propagação de agentes patogênicos, levou-se ao aumentou da suplementação de meios para PIV com albumina sérica bovina (BSA) e substitutos de soro sintéticos, em vez de soro. Atualmente, uma empresa dinamarquesa, EmbryoTrans

Biotech ApS, está desenvolvendo um novo meio de cultivo baseado na ausência de qualquer proteína de origem animal e com soro estritamente sintético.

Como meio para o cultivo *in vitro* (CIV) dos embriões, o SOF foi utilizado como um sistema contínuo de meio de cultivo. No entanto, desenvolveu-se um interesse crescente de alguns laboratórios comerciais de embriões bovinos para se executar o cultivo sequencial. O sistema de cultivo sequencial tem sido amplamente utilizado há anos na fertilização *in vitro* (FIV) humana, com base na teoria de que o embrião tem diferentes necessidades, dependendo da fase de desenvolvimento. Assim, os meios são compostos para fornecer o suporte ideal, do estágio de clivagem embrionária até o desenvolvimento de estágio de blastocisto (Simon, 2002). No entanto, na FIV humana o sistema de meio para monocultivo está ganhando popularidade novamente. O meio é suplementado com monoculturas de todos os compostos requeridos para dar suporte ao desenvolvimento do embrião até a fase de blastocisto, e baseia-se em deixar que o embrião escolha os nutrientes e componentes necessários para seu desenvolvimento ótimo durante todo o período de cultivo (Gardner *et al.,* 2002). Tem sido sugerido que o sistema de monocultivo é tão eficiente como o sistema de meio sequencial (Macklon *et al.,* 2002). Sabendo-se que o pior inimigo embriões são as flutuações, em particular, do pH e da temperatura (Swain, 2010), um sistema de meio de monocultivo tem a vantagem de diminuir o número de manipulações e o tempo em que o embrião está fora da incubadora. O embrião produz fatores parácrinos/autócrinos, essenciais para a sobrevivência *in vitro* (Gopichandran e Leese, 2006), assim, um sistema de meio de monocultivo pode muito bem ser a solução preferida.

Com o aumento da produção de embriões PIV bovinos, os meios comerciais estão se tornando disponíveis. As taxas de desenvolvimento e expressão gênica de blastocistos PIV são afetadas pelo uso de diferentes sistemas de meio PIV. Métodos PIV foram avaliados através da investigação de saúde da prole nascida (Wrenzycki *et al.,* 2004; Bonilla *et al.,* 2014), e pesquisas recentes têm objetivado encontrar um novo método, onde a qualidade do embrião e do subsequente bezerro produzido em um determinado sistema de PIV, podem ser avaliadas antes da transferência para a receptora. O foco central desta pesquisa foi encontrar diferenças na expressão gênica e modificações epigenéticas entre embriões produzidos *in vitro* ou *in vivo*, e uma longa lista de genes candidatos, que se acreditam estar envolvidos nos processos críticos de desenvolvimento do embrião, está agora disponível (Wrenzycki *et al.,* 2004, 2005;. Thompson *et al.,* 2007; Wrenzycki *et al.,* 2007; Chen *et al.,* 2013). Portanto, mais estudos devem ser realizados para investigar a correlação entre o nascimento de prole viva e saudável com a qualidade do embrião, em termos de influência do meio sobre o desenvolvimento do embrião, tais como: expressão gênica, morfologia, cinética e taxas de blastocisto. Como a abundância de expressão gênica em si não é um marcador da qualidade, os estudos devem ser realizados, incluindo-se a comparação com embriões produzidos *in vivo.*

Recentemente, um estudo preliminar foi publicado mostrando aumento das taxas de blastocisto, qualidade do embrião superior e expressão gênica mais abundantes em embriões produzidos no sistema de meios da empresa dinamarquesa EmbryoTrans Biotech em comparação com o sistema de meios PIV da Minitube Alemanha (Nielsen *et al.,* 2014). Os genes selecionados, em função do seu valor proposto como marcadores de qualidade para PIV de embriões de bovinos, incluídos na análise foram: resposta ao estresse: *HSPA1A* (proteína de choque térmico), transporte de glicose*: SLC2A1* e *SLC2A3*, a metilação do DNA: *DNMT3A* (DNA metiltransferase), reconhecimento materno da gestação: *IFNT2* (Interferon tau), sistema de fator de crescimento semelhante à insulina (crescimento): *IGF1R*, apoptose: *BAX* e *BCL1L* (pró e anti-apoptóticos), *G6PD* (metabolismo de glicose) e *FASN* (metabolismo de gordura).

No momento da aspiração dos oócitos, por exemplo por OPU, os oócitos recuperados a partir do mesmo ovário estarão em diferentes estágios de pré-maturação ou em início de atresia. Uma abordagem para lidar com esta situação tem sido a de induzir uma parada temporária de maturação do oócito, descrita em trabalhos realizados há uma década (Lonergan *et al.,* 2003; Donnay *et al.,* 2004; Vigneron *et al.,* 2004). Recentemente, este conceito foi lançado novamente através de um meio especialmente concebido, denominado como estimulador fisiológico da maturação de oócitos (Albuz *et al.,* 2010). Os resultados foram variáveis, e uma segunda versão modificada está agora sendo testada (Gilchrist *et al.,* 2015), o que exemplifica que uma solução prática para um desafio tão complexo não é sempre tão fácil. Da mesma forma, questões permanecem em relação à forma como os oócitos de novilhas muito jovens (bezerras velhas) devem ser potencialmente tratados para melhores resultados.

Finalmente, existem muitas técnicas para se avaliar a qualidade embrionária, as quais incluem análise de taxa de eclosão, sobrevivência à criopreservação, as contagens celulares da massa celular interna e trofectoderma, a contagem de células apoptóticas e análise de incidência de anomalias cromossômicas (Munoz *et al.,* 2014). No entanto, os procedimentos anteriores limitaram a aplicação prática e generalizada para a TE em fazendas. Talvez valesse a pena se avaliar os embriões em fase de pré-implantação com relação ao seu mérito genético para características de importância econômica e usá-los em seleção genômica - um método que avalia um animal antes de nascer. No artigo que acompanha este documento, por Kadarmideen et al. (2015), nós descrevemos como a triagem genômica de embriões pré-implantação pode acelerar o melhoramento genético.

Dados multi-omicos e aplicação da biologia de sistemas para a PIV bovina

As biociências animais e veterinárias estão passando por mudança de paradigma a partir de experimentos simples de baixo rendimento, gerando dados biológicos de estratificação simples para muitas vezes um único experimento integrado, em que os dados biológicos multi-omicos estão sendo gerados em animais individuais. Tecnologias modernas de alta capacidade geram dados em todos os níveis dos sistemas biológicos (ex.: mensurações de genoma amplo, transcriptoma amplo, metaboloma amplo ou proteoma amplo). Isso abrange sistemas reprodutivos e vários tipos de células, incluindo ovários, oócitos, embriões e endométrio. Outro ângulo para os dados – omicos é o surgimento da "fenômica", que refere-se a dezenas de milhares de fenótipos observados em um único animal em vez de algumas dezenas ou uma centena.

Técnicas de biologia de sistemas (SB), por necessidade, envolvem dados sistemáticos coletados em todas as categorias dos sistemas biológicos e do indivíduo (categoria animal) e destinam-se a estudar as interações entre todas estas categorias e não a uma única categoria de forma isolada (Kadarmideen, 2008, 2014). Elas tem o objetivo de fornecer uma visão holística de todo o resultado. Se o sucesso reprodutivo é um resultado, então elas tentam fornecer uma explicação baseada em levantamento de dados experimentais e hipóteses para o sucesso reprodutivo. Para alcançar este objetivo, a biologia de sistemas coletivamente modela e analisa esses conjuntos de dados multi-omicos usando uma combinação de princípios e ferramentas de matemática, biologia computacional e bioinformática (Kadarmideen, 2008, 2014). SB é uma disciplina que itera entre abordagens orientadas por dados e orientada por hipóteses para entender sistema biológico como um todo e fornecer um modelo completo de funções de fenótipo ou de evolução de uma doença complexa. Por isso, a SB exige conhecimentos multidisciplinares em uma equipe, de ciências matemáticas, passando por genética quantitativa, até a biologia molecular.

O termo "Genética de Sistemas", um ramo da SB que foi originalmente proposto por Kadarmideen et al. (2006), integra medições do genoma na escala "omica" do metaboloma ao funciotoma passando por transcriptoma e proteoma. Esta abordagem genética de sistemas tem sido aplicada em animais (Kadarmideen e Janss, 2007; Kogelman *et al*., 2014), humanos (Civelek e Lusis, 2014) e foi completamente revisada (Li, 2013; Kadarmideen, 2014). Uma forma que ela aborda é a integração da genômica e da transcriptômica através da detecção de QTLs de expressão (eQTLs). Um eQTL é uma região genômica associada com níveis de transcrição, que posteriormente afetam o fenótipo. A genética de sistemas tem se mostrado como um poderoso método para encontrar importantes genes causais e reguladores e suas variantes para se prever biomarcadores [por exemplo, o sucesso reprodutivo através de um inseminação artificial (IA) convencional ou da transferência de embriões (ET)].

Vários estudos de genômica ou transcriptômica, isoladamente, têm sido realizados para revelar a arquitetura genética ou os mecanismos regulatórios dos genes que determinam os fenótipos ou os mecanismos que determinam a gestação em bovinos, com base na transferência de embriões produzidos tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Existem alguns estudos de transcriptômica em grande escala que visam compreender a comunicação concepto-maternal, que é vital para o estabelecimento e a manutenção da gestação.

Por exemplo, Bauersach et al. (2006) mostraram que a expressão de *AGRN*, *LGALS3BP*, *LGALS9*, *USP18*, *PARP12* e *BST2* no endométrio desempenha um papel central no contexto de comunicação concepto-maternal do início da gestação. Clemente et al. (2011) mostraram genes diferencialmente expressos entre os dias 7 e 13 em embriões produzidos *in vivo* ou *in vitro* e mostram os 40 genes que tiveram sua expressão mais aumentada ou mais reduzida no dia 13, unicamente em embriões produzidos *in vivo*, ou unicamente em embriões produzidos *in vitro*, e comuns a ambos. Mamo *et al.* (2011), utilizando a tecnologia de RNASeq, geraram perfis transcriptômicos em conceptos bovinos durante os períodos pré e peri-implantação (dias 7, 10, 13, 16 e 19) e identificaram grupos (clusters) de genes associados á formação do blastocisto, alongamento do concepto, reconhecimento materno da gestação e início da implantação. Mamo *et al.* (2011) estudaram o transcriptoma do endométrio uterino para se determinar os genes e vias que regulam o crescimento e desenvolvimento do concepto bovino. Os autores concentraram-se particularmente no tempo de eclosão do blastocisto da zona pelúcida e no seu subsequente alongamento coincidente com o tempo do reconhecimento materno da gestação.

No entanto, ainda faltam as abordagens de SB ou de genética de sistemas, tal como descrito acima, para os estudos de comunicação concepto-maternal englobando conjuntos de dados multi-omicos. Esta é exatamente uma das áreas focais das atividades do consórcio Dinamarquês-Brasileiro GIFT (www.gift.ku.dk). Como um de seus aspectos, o projeto GIFT prevê eventualmente, a aplicação de abordagens de transcriptomica e genética de sistemas para células foliculares buscando-se caracterizar transcriptomas e biologia de sistemas de vaca doadoras. Resumidamente, o projeto envolve a aspiração de oócitos de vacas doadoras abatidas, que têm disponíveis seus dados de produção, e subsequente isolamento e extração de RNA a partir de células da granulosa murais ou do *cumulus* para a análise de RNA Seq. Oócitos maturados e fertilizados *in vitro* com sêmen de touros de alto e baixo méritos genéticos são então utilizados para se estudar o efeito da interação genômica-touro sobre as taxas de

blastocisto. Além disso, a correlação entre a expressão de genes em células da granulosa e as taxas de blastocistos, valores recuperados para cada animal, é analisada, implementando-se modelos estatísticos lineares. As análises irão identificar genes diferencialmente expressos que podem ser potenciais marcadores para a caracterização de vacas doadoras para procedimentos PIV.

Conclusões e perspectivas

A última década trouxe uma quantidade impressionante de novos conhecimentos relacionados à OPU- PIV e TE em bovinos, nos âmbitos biológico, fisiológico, molecular, genético e, especialmente, prático. O processo global é basicamente bastante simples e direto, mas com o conhecimento crescente, haverá mais e mais opções para se fazer seleções ao longo do processo. Isso seria valioso à medida que novas características são utilizadas para melhorar a fertilidade global a partir do ponto de vista de reprodução. Além disso, o processo também fornece uma "abordagem personalizada" emergente em tecnologias de reprodução assistida (TRAs) de bovinos como por exemplo, o tratamento individual da doadora com base em seu status e situação corrente; do touro baseado no comportamento do seu sêmen ao tratamento anterior à FIV e do estado do endométrio receptor para garantir a implantação do embrião PIV.

Reflexões futuras devem levar em consideração as novas características como ferramentas de apoio à decisão para biotecnologias da área da reprodução, como a seleção de vacas doadoras para a produção de embriões em termos de capacidade de executar a PIV em laboratórios. Características quantitativas, como o número de oócitos e número de embriões, e qualitativas, tais como a qualidade dos oócitos, taxa de clivagem, taxa de desenvolvimento, morfologia e cinética dos embriões produzidos, são marcadores importantes para serem identificardos na era de rápidos avanços da PIV bovina.

Agradecimentos

Os autores agradecem o financiamento do Programme Commission on Health, Food and Welfare of the Danish Council for Strategic Research para o projeto GIFT (www.gift.ku.dk). HNK agradece ao EU-FP7 Marie Curie Actions – Career Integration Grant (CIG-293511) pelo financiamento de parte seu tempo dispendido com este artigo.

Referências

Adams GP, Matteri RL, Ginther OJ. 1992. Effect of progesterone on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating follicle-stimulating hormone in heifers. *J Reprod Fertil*, 96:627-640.

Albuz FK, Sasseville M, Lane M, Armstrong DT, Thompson JG, Gilchrist RB. 2010. Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel *in vitro* maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. *Hum Reprod*, 25:2999-3011.

Assey RJ, Hyttel P, Greve T, Purwantara B. 1994. Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. *Mol Reprod Dev*, 37:335-344.

Bauersachs S, Ulbrich SE, Gross K, Schmidt SE, Meyer HH, Wenigerkind H, Vermehren M, Sinowatz F, Blum H, Wolf E. 2006. Embryo-induced transcriptome changes in bovine endometrium reveal species-specific and common molecular markers of uterine receptivity. *Reproduction*, 132:319-331.

Blondin P, Vigneault C, Niv*et al*., Sirard MA. 2012. Improving oocyte quality in cows and heifers – What have we learned so far? *Anim Reprod*, 9:281-289.

Bonilla L, Block J, Denicol AC, Hansen PJ. 2014. Consequences of transfer of an *in vitro*-produced embryo for the dam and resultant calf. *J Dairy Sci*, 97:229-239.

Chen Z, Robbins KM, Wells KD, Rivera RM. 2013. Large offspring syndrome: a bovine model for the human loss-of-imprinting overgrowth syndrome Beckwith-Wiedemann. *Epigenetics*, 8:591-601.

Civelek M, Lusis AJ. 2014. Systems genetics approaches to understand complex traits. *Nat Rev Genet*, 15:34-48.

Clemente M, Lopez-Vidriero I, O'Gaora P, Mehta JP, Forde N, Gutierrez-Adan A, Lonergan P, Rizos D. 2011. Transcriptome changes at the initiation of elongation in the bovine conceptus. *Biol Reprod*, 85:285-295.

Dominguez MM. 1995. Effects of body condition, reproductive status and breed on follicular population and oocyte quality in cows. *Theriogenology*, 45:121-130.

Donnay I, Faerge I, Grondahl C, Verhaeghe B, Sayoud H, Ponderato N, Galli C, Lazzari G. 2004. Effect of prematuration, meiosis activating sterol and enriched maturation medium on the nuclear maturation and competence to development of calf oocytes. *Theriogenology*, 62:1093-1107.

Duby RT, Damiani P, Looney CR, Fissore RA, Robl JM. 1996. Prepuberal calves as oocyte donors: promises and problems. *Theriogenology*, 45:121-130.

Erickson BH. 1966. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *J Anim Sci*, 25:800-805.

Fair T, Hyttel P, Greve T. 1995. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol Reprod Dev*, 42:437-442.

Fair T, Hyttel P, Greve T, Boland M. 1996. Nucleus structure and transcriptional activity in relation to oocyte diameter in cattle. *Mol Reprod Dev*, 43:503-512.

Fair T, Hulshof SC, Hyttel P, Greve T, Boland M. 1997. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. *Anat Embryol*, 195:327-336.

Gardner DK, Lanza M, Cibelli J, Lanza RP, Campbell KHS, West MD. 2002. Development of viable mammalian embryos *in vitro*: evolution of sequential media. *In*: Cibelli J, Lanza R, Campbell K,

West MD (Ed.). *Principles of Cloning*. New York: Academic Press. pp. 187-213.

Gilchrist RB, Zeng HT, Wang X, Richani D, Smitz J, Thompson JG. 2015. Re-evaluating and evolution of the simulated physiological oocyte maturation (SPOM) system. *Theriogenology*. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.03.032.

Ginther OJ, Kastelic JP, Knopf L. 1989. Intraovarian relationships among dominant and subordinate follicles and the corpus luteum in heifers. *Theriogenology*, 32:787-795.

Gopichandran N, Leese HJ. 2006. The effect of paracrine/autocrine interactions on the *in vitro* culture of bovine preimplantation embryos. *Reproduction*, 131:269-277.

Guerreiro BM, Batista EO, Vieira LM, Sa Filho MF, Rodrigues CA, Castro Netto A, Silveira CR, Bayeux BM, Dias EA, Monteiro FM, Accorsi M, Lopes RN, Baruselli PS. 2014. Plasma anti-mullerian hormone: an endocrine marker for *in vitro* embryo production from Bos taurus and Bos indicus donors. *Domest Anim Endocrinol*, 49:96-104.

Holm, P, Booth, P.J, Schmidt, M.H, Greve, T, Callesen, H. 1999. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology* 52:683-700.

Hyttel, P, Callesen, H, Greve, T. 1986. Ultrastructural features of preovulatory oocyte maturation in superovulated cattle. *J Reprod Fertil*, 76:645-656.

Hyttel P. 2011. Electron microscopy of mammalian oocyte development, maturation and fertilization. *In:* Tosti E, Boni R. *Oocyte Maturation and Fertilization: A Long History for a Short Event*. Sharjah, UAE: Bentham Science Publishers. pp. 1-37.

Ireland JJ, Ward F, Jimenez-Krassel F, Ireland JL, Smith GW, Lonergan P, Evans AC. 2007. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Hum Reprod*, 22:1687-1695.

Kadarmideen HN, von Rohr P, Janss LL. 2006. From genetical genomics to systems genetics: potential applications in quantitative genomics and animal breeding. *Mamm Genome*, 17:548-564.

Kadarmideen HN, Janss LL. 2007. Population and systems genetics analyses of cortisol in pigs divergently selected for stress. *Physiol Genomics*, 29:57-65.

Kadarmideen HN. 2008. Genetical systems biology in livestock: application to gonadotrophin releasing hormone and reproduction. *IET Syst Biol*, 2:423-441.

Kadarmideen HN. 2014. Genomics to systems biology in animal and veterinary sciences: Progress, lessons and opportunities. *Livest Sci*, 166:232-248.

Kadarmideen HN, Mazzoni G, Watanabe YF, Strøbech L, Baruselli PS, Meirelles FV, Callesen H, Hyttel P, Ferraz JBS, Nogueira MFG. 2015. Genomic selection of *in vitro* produced and somatic cell nuclear transfer embryos for rapid genetic improvement in cattle production. *Anim Reprod Sci*. (accepted).

Kogelman LJ, Cirera S, Zhernakova DV, Fredholm M, Franke L, Kadarmideen HN. 2014. Identification of co-expression gene networks, regulatory genes and pathways for obesity based on adipose tissue RNA Sequencing in a porcine model. *BMC Med Genomics*, 7:57.

Leroy JL, Opsomer G, Van Soom A, Goovaerts IG, Bols PE. 2008. Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? Part I. The importance of negative energy balance and altered corpus luteum function to the reduction of oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows. *Reprod Domest Anim*, 43:612-622.

Li H. 2013. Systems genetics in "-omics" era: current and future development. *Theory Biosci*, 132:1-16.

Lonergan P, Faerge I, Hyttel PM, Boland M, Fair T. 2003. Ultrastructural modifications in bovine oocytes maintained in meiotic arrest *in vitro* using roscovitine or butyrolactone. *Mol Reprod Dev*, 64:369-378.

Lopez H, Satter LD, Wiltbank MC. 2004. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. *Anim Reprod Sci*, 81:209-223.

Macklon NS, Pieters MH, Hassan MA, Jeucken PH, Eijkemans MJ, Fauser BC. 2002. A prospective randomized comparison of sequential versus monoculture systems for in-vitro human blastocyst development. *Hum Reprod*, 17:2700-2705.

Mamo S, Mehta JP, McGettigan P, Fair T, Spencer TE, Bazer FW, Lonergan P. 2011. RNA sequencing reveals novel gene clusters in bovine conceptuses associated with maternal recognition of pregnancy and implantation. *Biol Reprod*, 85:1143-1151.

Munoz M, Uyar A, Correia E, Diez C, Fernandez-Gonzalez A, Caamano JN, Martinez-Bello D, Trigal B, Humblot P, Ponsart C, Guyader-Joly C, Carrocera S, Martin D, Marquant Le Guienne B, Seli E, Gomez E. 2014. Prediction of pregnancy viability in bovine *in vitro*-produced embryos and recipient plasma with Fourier transform infrared spectroscopy. *J Dairy Sci*, 97:5497-5507.

Nielsen JMK, Wrenzycki C, Hyttel P, Poppicht F, Stroebech L. 2014. New culture medium affects blastocyst development and gene expression levels in *in vitro* produced bovine embryos. *Reprod Fertil Dev*, 27:206-207.

Niv*et al.*, Bunel A, Labrecque R, Belanger J, Vigneault C, Blondin P, Sirard MA. 2012. FSH withdrawal improves developmental competence of oocytes in the bovine model. *Reproduction*, 143:165-171.

Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH, First NL. 1986. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 25:591-600.

Rawlings NC, Evans AC, Honaramooz A, Bartlewski PM. 2003. Antral follicle growth and endocrine changes in prepubertal cattle, sheep and goats. *Anim Reprod Sci*, 78:259-270.

Salamone DF, Damiani P, Fissore RA, Robl JM, Duby RT. 2001. Biochemical and developmental evidence that ooplasmic maturation of prepubertal bovine oocytes is compromised. *Biol Reprod*, 64:1761-1768.

Sartori R, Haughian JM, Shaver RD, Rosa GJ, Wiltbank MC. 2004. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. *J Dairy Sci*, 87:905-920.

Silva-Santos KC, Marinho LSR, Santos GMG, Machado FZ, Gonzalez SM, Lisboa LA, Seneda MM. 2013. Ovarian follicle reserve: emerging concepts and applications. *Anim Reprod*, 10:180-186.

Simon C, Quinn P, Kime L, Ayres C, Tyler JPP, Driscoll GL. 2002. Improvement in early human embryo development using new formulation sequential stage-specific culture media. *Fertil Steril*, 78:1254-1260.

Steeves TE, Gardner DK. 1999. Metabolism of glucose, pyruvate, and glutamine during the maturation of oocytes derived from pre-pubertal and adult cows. *Mol Reprod Dev*, 54:92-101.

Steeves TE, Gardner DK, Zuelke KA, Squires TS, Fry RC. 1999. *In vitro* development and nutrient uptake by embryos derived from oocytes of pre-pubertal and adult cows. *Mol Reprod Dev*, 54:49-56.

Swain JE. 2010. Optimizing the culture environment in the IVF laboratory: impact of pH and buffer capacity on gamete and embryo quality. *Reprod Biomed Online*, 21:6-16.

Thompson JG, Mitchell M, Kind KL. 2007. Embryo culture and long-term consequences. *Reprod Fertil Dev*, 19:43-52.

Tervit HR, Whittingham DG, Rowson LE. 1972. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. *J Reprod Fertil*, 30:493-497.

Vigneron C, Perreau C, Dalbies-Tran R, Joly C, Humblot P, Uzbekova S, Mermillod P. 2004. Protein synthesis and mRNA storage in cattle oocytes maintained under meiotic block by roscovitine inhibition of MPF activity. *Mol Reprod Dev*, 69:457-465.

Wrenzycki C, Herrmann D, Lucas-Hahn A, Lemme E, Korsawe, K, Niemann H. 2004. Gene expression patterns in *in vitro*-produced and somatic nuclear transfer-derived preimplantation bovine embryos: relationship to the large offspring syndrome? *Anim Reprod Sci*, 82/83:593-603.

Wrenzycki C, Herrmann D, Lucas-Hahn A, Korsawe K, Lemme E, Niemann H. 2005. Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from *in vitro* procedures and their implications for development. *Reprod Fertil Dev*, 17:23-35.

Wrenzycki C, Herrmann D, Niemann H. 2007. Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. *Theriogenology*, 68:S77-S83.

Estado da arte da IATF com protocolos a base de GnRH em bovinos de corte

M.L. Day

Department of Animal Sciences, The Ohio State University, Columbus Ohio, USA.

Resumo

Com base em observações levantadas em uma série de experimentos, de que a taxa de concepção após a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) foi positivamente relacionada ao tempo de proestro, o tradicional protocolo CO-Synch + CIDR de 7 dias foi modificado para permitir um aumento do intervalo da prostaglandina/remoção de CIDR até a aplicação de GnRH/inseminação artificial; resultando no protocolo CO-Synch + CIDR de 5 dias. Esta modificação resultou em aumento da taxa de concepção de vacas submetidas à IATF em comparação ao protocolo tradicional. O resultado deste protocolo nas concentrações pré-ovulatórias de estradiol, em consequência do maior período de estímulo gonadotrópico ao folículo bem como do início do proestro, numa fase em que folículos ovulatórios são altamente estrogênicos e/ou da redução da incidência da ovulação de folículos muito jovens, são mecanismos potenciais para o aumento das concentrações de estradiol e aumento da fertilidade. Fêmeas submetidas a protocolos pelos quais o crescimento folicular é controlado adequadamente, a diferenças na idade do folículo ovulatório não devem interferir na taxa de concepção após a IATF.

Palavras-chave: bovino, estradiol, inseminação artificial em tempo fixo.

Introdução

As abordagens mais comumente utilizadas na inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em bovinos de corte nos EUA baseiam-se no protocolo CO-Synch (Geary e Whittier, 1998). Nos EUA, três hormônios estão disponíveis para sincronizar vacas; progesterona (geralmente um implante vaginal; CIDR), a prostaglandina F2α (PGF2α; ou seu analógico) e GnRH. O protocolo CO-Synch inicial consiste em tratamento inicial de GnRH, PGF2α 7 dias mais tarde para induzir a luteólise, e um segundo tratamento com GnRH 48 h após a PGF2α para induzir a ovulação para a IATF. O momento da segunda injeção de GnRH determina o comprimento do "proestro", ou do intervalo entre o início de regressão do corpo lúteo (CL) e o pico de LH. Um CIDR é normalmente inserido em fêmeas de corte entre o GnRH inicial e o tratamento com PGF2α, resultando no protocolo de CO-Synch + CIDR. Cada hormônio exógeno utilizado neste protocolo tem ação específica, e a eficácia e precisão dessas ações são cruciais para a sincronização. O primeiro tratamento com GnRH é utilizado para induzir a ovulação e iniciar uma onda de crescimento folicular. Em outras palavras, cerca de 1 a 2 dias depois do GnRH uma nova onda folicular deve ser iniciada na maioria das vacas (Thatcher *et al.*, 1989; Macmillan e Thatcher, 1991; Twagiramungu *et al.*, 1994, 1995). A eficácia do primeiro GnRH, no entanto, varia entre a categoria animal e a fase do ciclo estral (Pursley *et al.*, 1995; Geary *et al.*, 2000; Atkins *et al.*, 2008, 2010; Souza *et al.*, 2009). O segundo GnRH induz o pico pré-ovulatório de LH e ovulação do folículo dominante que emergiu logo após o primeiro GnRH. A luteólise é induzida pela PGF2α entre 48 e 72 h antes do segundo tratamento com GnRH. A IATF é realizada juntamente com a segunda administração de GnRH. Uma preocupação importante é a proporção de vacas que são induzidas a ovular folículos que são menores do que o diâmetro típico, com a segunda administração de GnRH, e o fato de que estes animais são menos susceptíveis a se tornarem gestantes como resultado da IATF (Lamb *et al.*, 2001; Perry *et al.*, 2005).

A influência da maturidade do folículo ovulatório na fertilidade em gado de corte tem sido investigada (Perry *et al.*, 2005; Mussard *et al.*, 2003, 2007; Bridges *et al.*, 2010). Uma hipótese era que o diâmetro dos folículos ovulatórios era o indicador mais adequado da "maturidade" do folículo e que as vacas induzidas a ovular pequenos folículos teriam menor fertilidade que aquelas induzidas a ovular folículos maiores. Em cada um dos três experimentos (Tabela 1; Mussard *et al.*, 2003ab, 2007) esta hipótese foi suportada, mas à medida que dados de vários experimentos foram acumulados, a relação do diâmetro do folículo com a taxa de concepção foi inconsistente. Considerando-se estes experimentos, o preditor mais consistente da taxa de concepção parecia ser duração do proestro (intervalo do início da regressão de CL com PGF2α até o pico pré-ovulatório de LH; Tabela 1). Com base na relação entre o comprimento de proestro e taxa de concepção, um experimento adicional (Tabela 1; Bridges *et al.*, 2010) foi realizado mantendo-se constante o diâmetro do folículo e apenas variando-se o comprimento do proestro. Foi demonstrado que com um diâmetro do folículo ovulatório constante, o comprimento do proestro teve uma influência substancial na taxa de concepção. Tomados em conjunto, os dados desta gama de estudos sugeriram uma forte relação positiva de duração do proestro com o grau de maturação do folículo e com a fertilidade, e também que o diâmetro do folículo ovulatório, por si só, não foi um preditor consistente de maturidade do folículo. O efeito do diâmetro do folículo ovulatório na ovulação induzida por GnRH ou na ovulação espontânea sobre a taxa de concepção também foi avaliado (Perry *et al.*, 2005, 2007). Foi relatado que o

[1]Autor correspondente: day.5@osu.edu

diâmetro do folículo ovulatório influenciou a taxa de concepção após a detecção do estro em novilhas, mas não em vacas no pós-parto. Em vacas no pós-parto que não apresentaram estro, o diâmetro do folículo ovulatório foi positivamente associado com a taxa de concepção quando a ovulação foi induzida com GnRH. Assim, se um proestro espontâneo 'completo' ocorre em vacas (confirmado pela exibição do estro), o diâmetro do folículo não tem efeito na fertilidade, mas, diâmetro do folículo ovulatório, quando a ovulação foi induzida com GnRH, influenciou a taxa de concepção; com uma duração constante de proestro. Uma vez que estes achados sugerem que a maturidade do folículo ovulatório e probabilidade de concepção são, talvez, definidos pelo tempo de proestro, aplicamos esse conhecimento para otimizar o protocolo existente CO-Synch + CIDR.

Tabela 1: Taxa de concepção, diâmetro e idade do folículo ovilatório, duração do proestro, e número de vacas de diferentes experimentos que investigaram o efeito da maturidade do folículo na fertilidade

Taxa de concepção (%)[a]	Diâmetro do folículo ovulatório (mm)[b]	Duração do proestro (dias)[c]	n	Experimento
4	11,1 ± 0,2	1,0 ± 0,1	45	Mussard *et al.*, 2003a [e]
8	11,1 ± 0,2	1.,0 ± 0,1	12	Mussard *et al.*, 2003b[f]
10	12,6 ± 0,2	1,25	10	Bridges *et al.*, 2010[g]
57	13,6 ± 0,2	2,2 ± 0,1	54	Mussard *et al.*, 2003a [e]
67	13,7 ± 0,2	2,0 ± 0,1	12	Mussard *et al.*, 2003b [f]
71	12,9 ± 0,2	2,25	28	Bridges *et al.*, 2010[g]
76	10,7 ± 0,1	3,3 ± 0,1	29	Mussard *et al.*, 2007[d]
100	12,0 ± 0,3	4,7 ± 0,2	24	Mussard *et al.*, 2007[d]

[a] Porcentagem de animais diagnosticados como gestantes após a IA. O diagnóstico de gestação foi realizado por ultrassonografia cerca de 30 dias após inseminação artificial. [b]Diâmetro do maior folículo ovulatório, determinado pela ultrassonografia realizada no momento da administração de GnRH ou do estro. [c] Intervalo da PGF2α até a administração de GnRH. [d] Vacas foram induzidas, com GnRH, a ovularem um folículo pequeno (~ 11 mm) ou demonstraram estro espontaneamente. As vacas foram inseminadas 12 h após estro ou baseada na aplicação de GnRH. [e]Vacas foram induzidas com GnRH, a ovularem um folículo pequeno (~ 11 mm) ou folículo grande (~ 13 mm). Os animais foram inseminados 12 h após a administração de GnRH. [f]Vacas foram induzidas com GnRH, a ovularem um folículo pequeno (~ 11 mm) ou folículo grande (~ 13 mm). Embriões de vacas não tratadas foram então transferidos 7 dias após o GnRH. [g]Vacas ovularam folículo de diâmetro semelhante, entretanto o GnRH foi administrado 1,25 ou 2,25 dias após a PGF2α. Os animais foram inseminados 12 h após a administração de GnRH. Incluem-se apenas vacas com uma fase lútea de comprimento normal.

Aumentando a duração do proestro com o protocolo CO-Synch + CIDR

A duração do proestro com o protocolo tradicional CO-Synch + CIDR de 7 dias pode variar de 50 a 66 h em vacas adultas sem influenciar na taxa de concepção da IATF. No entanto, em vacas mais jovens (≤3 anos de idade), maiores taxas de concepção à IATF foram obtidas quando o proestro teve duração de 56 h, em comparação a intervalos mais longos (Dobbins *et al.*, 2009). Outros pesquisadores (Busch *et al.*, 2008) relataram que as taxas de concepção após IATF foram maiores quando o proestro foi de 66 a 54 h. Na prática, o segundo GnRH é administrado e a IATF é realizada na maioria dos rebanhos entre 54 e 66 h após a PGF2α. Nossa hipótese é que, a abordagem de sincronização CO-Synch + CIDR poderia ser modificada de uma forma em que se poderia aumentar o intervalo da PGF2α e da retirada do CIDR para o segundo GnRH e a inseminação, e assim a taxa de concepção da IATF aumentaria. Este objetivo foi alcançado através do desenvolvimento do protocolo CO-Synch + CIDR de 5 dias (Bridges *et al.*, 2008). Este artigo de revisão faz uma abordagem sobre os efeitos fisiológicos desta mudança no protocolo e os mecanismos envolvidos no aumento das taxas de concepção quanto utilizado este potocolo de IATF.

Alterações hormonais do proestro prolongado

O proestro inicia-se com a remoção das fontes de progesterona (um CL, um CIDR ou ambos) e termina com um pico pré-ovulatporio de LH, induzido pelo GnRH exógeno, ou espontâneo. As concentrações de progesterona diminuem rapidamente e são mantidas em concentrações basais em todo proestro, desencadeando uma série de mudanças hormonais cruciais que precedem a ovulação. Uma resposta quase imediata à diminuição das concentrações de progesterona é o aumento na frequência de pulsos de LH. A frequência de liberação de LH pela hipófise anterior é regulada principalmente pela progesterona, e a associação negativa da concentração de progesterona e a frequência de pulsos de LH tem sido bem estabelecida (Kinder *et al.*, 1996). O proestro é caracterizado por pulsos de LH, com uma frequência cada vez maior, à medida que o proestro progride e o pico pré-ovulatório de LH se aproxima (Imakawa *et al.*, 1986). A secreção pulsátil de

LH é o principal fator que impulsiona o desenvolvimento final dos folículos pré-ovulatórios. Durante um proestro espontâneo, o crescimento do folículo pré-ovulatório e a produção de estradiol pelas células da granulosas foliculares aumenta à medida que o proestro progride. Comparamos concentrações pré-ovulatórias de estradiol e pós-ovulatórias de progesterona e a magnitude do pico pré-ovulatório de LH entre fêmeas bovinas que passaram por proestro longo (54 h; LPE) ou curto (30 h; SPE) depois da sincronização do crescimento folicular pela aspiração de folículo dominante guiada por ultrassom e alteração do tempo de regressão luteal (Bridges *et al.*, 2010). O tamanho do folículo ovulatório e a magnitude do pico de LH induzido por GnRH não diferiram, mas houve uma tendência de maior incidência de ciclos estrais curtos e menores concentrações de progesterona durante o ciclo estral subsequente no tratamento SPE em comparação ao LPE. A diferença mais notável entre tratamentos foi que as concentrações de estradiol foram maiores no tratamento LPE em relação ao SPE durante as 38 horas que antecederam o pico pré-ovulatório de GnRH (Fig. 1). Consistente com esta observação, vacas que foram submetidas ao protocolo CO-Synch + CIDR de 5 dias quando compardas ao de 7 dias, mesmo com apresentando folículos ovulatórios de diâmetros similares tenderam a apresentar um maior pico de estradiol (Bridges *et al.*, 2014). Uma explicação lógica para essa diferença de concentrações de estradiol é o longo período de estimulação por pulsos de LH em alta frequência. No entanto, um fator adicional que pensamos também poder contribuir para o aumento do estradiol sistêmico no protocolo de 5 dias é a antecipação da retirada do efeito inibitório da secreção de LH, causado pela progesterona, que ocorreu mais cedo em relação à emergência da onda folicular. No protocolo de 5 dias, em comparação ao protocolo de 7 dias, os folículos resultantes da nova onda iniciada após a primeira injeção de GnRH seriam de 3 a 4 dias de idade, aproximadamente, pós-emergência, em comparação a 5 a 6 dias, respectivamente, no momento da administração da PGF2α e da retirada do CIDR. Tem sido relatado que folículos dominantes em crescimento, 4 dias após a emergência, apresentam concentrações de estradiol intrafoliculares e a capacidade para produzir estradiol *in vitro* aumentadas, em relação a folículos dominantes não atrésicos em um momento posterior na onda folicular (Valdez *et al.*, 2005) . Além disso, foi demonstrado que as concentrações de estradiol na veia cava caudal foram maiores (Rhodes *et al.*, 1995) com aproximadamente 3 dias após a emergência do folículo dominante da primeira onda folícular em comparação com os momentos posteriores da vida deste folículo. Assim, aumentando-se a duração do proestro e removendo-se a progesterona numa altura em que a capacidade esteroidogênica do folículo dominante é ótima, pode-se contribuir com o aumento das concentrações máximas de estradiol e/ou aumentar o período do mesmo elevado durante o proestro. A concentração de estradiol durante o período pré-ovulatório em bovinos é cada vez mais reconhecida como um fator chave que influencia na fertilidade (Bridges *et al.*, 2012, 2013; Atkins *et al.*, 2013; Jinks *et al.*, 2013; Geary *et al.*, 2013). Sendo assim, concluiu-se que a maior contribuição do aumento do comprimento do proestro é o aumento das concentrações circulantes de estradiol pré-ovulatório em resposta ao maior período sob estímulo de LH. Foi demonstrado também que as concentrações de estradiol durante o proestro são maiores, bem como a taxa de concepção obtida com o protocolo CO-Synch + CIDR de 5 dias, em comparação com o protocolo de 7 dias.

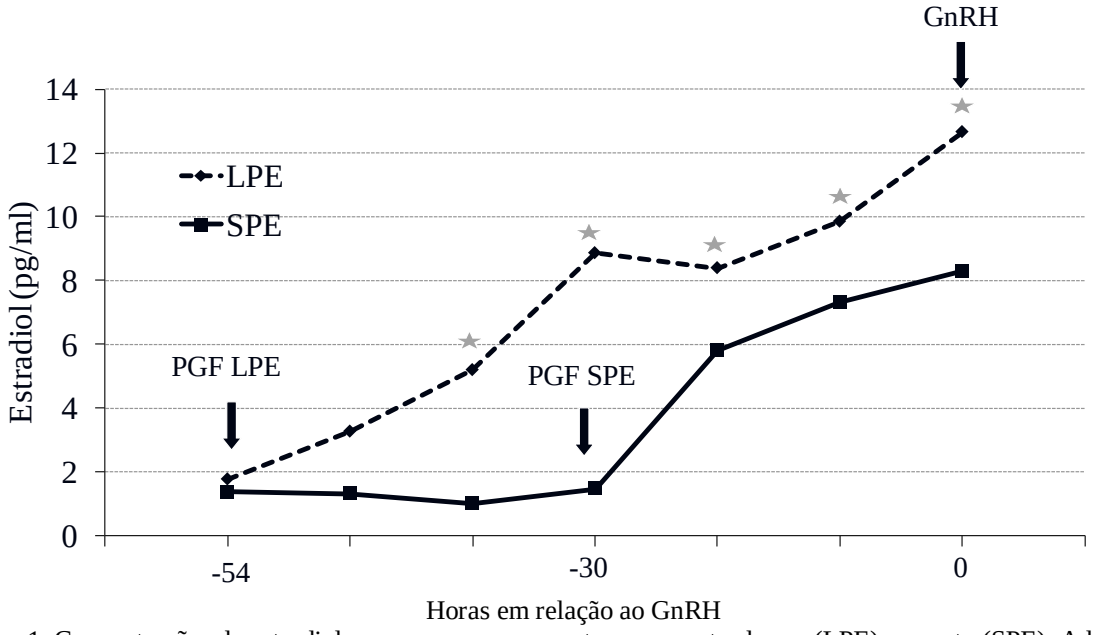

Figura 1. Concentrações de estradiol em vacas que apresentaram proestro longo (LPE) ou curto (SPE). Adaptado de Bridges *et al.*, 2010.

Crescimento follicular e duração do protocolo de sincronização

Tem sido demonstrado que o protocolo CO-Synch de 7 dias resulta numa proporção de vacas que ovulam folículos de menor diâmetro do que o observado nos protocolos típicos de IATF, o qual resulta na diminuição da fertilidade destes animais (Lamb *et al.*, 2001; Perry *et al.*, 2005). Tanto o nosso grupo como outros presumimos que os folículos menores no momento da ovulação sincronizada são o resultado de atresia espontânea de folículos e início de uma nova onda de desenvolvimento folicular durante os últimos estágios do intervalo entre o tratamento inicial de GnRH e a PGF2α em fêmeas que responderam ao primeiro tratamento com GnRH. Isto tem sido relatado como um dos possíveis fatores que contribuem para a variação do diâmetro do folículos ovulatório (Atkins *et al.*, 2008, 2010). Esperou-se que com a redução do tempo de tratamento com o CIDR de 7 para 5 dias se reduziria a probabilidade deste padrão de crescimento folicular ocorrer, resultando em maiores concentrações de estradiol durante o proestro nestas fêmeas. Falhas na ovulação após o primeiro tratamento com GnRH resultaram em redução da concetração circulante de estradiol pré-ovulatório e progesterona durante a fase luteal subsequente em protocolo de 7 dias mas não no protocolo de 5 dias (Bridges *et al.*, 2014). Em um estudo preliminar recente (Dias *et al.*, 2014), as fêmeas que não ovularam à primeira administração de GnRH no protocolo CO-Synch + CIDR de 5 dias tiveram maiores taxas de concepção após a IATF (65,0%; n = 163; P = 0,01) que as que ovularam (51,5%). Mais estudos devem ser realizados para elucidar o mecanismo pelo qual o benefício do protocolo de 5 dias nessas fêmeas que não respondem ao primeiro GnRH.

Idade dos folículos no momento da indução da ovulação

Na protocolo CO-Synch + CIDR de 5 dias, o intervalo da emergência da onda folícular, 1 a 2 dias após o primeiro GnRH, até indução da ovulação com o segundo GnRH (dia 8) é de 6 a 7 dias. No protocolo de 7 dias, esse intervalo é de 8-9 dias. Refere-se a este intervalo como a idade do folículo, e com a utilização do protocolo de 5 dias, os folículos mais jovens são induzidos a ovular no momento do segundo GnRH, em comparação com o protocolo de 7 dias. Variação na idade dos folículos na ovulação existe em vacas ovulando espontaneamente. Por exemplo, em fêmeas bovinas leiteiras que têm 2 ou 3 ondas de crescimento folicular durante o ciclo estral, e que ovulam espontaneamente, o intervalo da emergência folicular à ovulação ou cio (idade do folículo) é superior em cerca de 3 dias em vacas (Bleach *et al.*, 2004) e 4 dias em novilhas (Sartori *et al.*, 2004) que apresentaram duas ondas foliculares, e taxa de concepção após a IA foi menor, quando comparado com vacas com três ondas foliculares durante o ciclo estral (Townson *et al.*, 2002). O uso de um intervalo de cinco dias entre GnRH e PGF2α aumentou a taxa de concepção em vacas em lactação (Santos *et al.*, 2010) e Cerri *et al.* (2009) demonstraram uma maior porcentagem de embriões de boa qualidade coletados a partir de vacas leiteiras que foram induzidas a ovular folículos mais jovens, dentro do intervalo normalmente observado em fêmeas que ovulam espontaneamente. A interpretação cumulativa de trabalhos conduzidos em vacas em lactação sugere que a idade do folículo é uma fonte significativa de variação na fertilidade. Nós completamos recentemente dois experimentos abordando diretamente o efeito da idade do folículo ovulatório na fertilidade em bovinos e testamos a hipótese de que a taxa de concepção à IA após a ovulação de um folículo mais jovem seria maior em novilhas de corte após a ovulação espontânea, e em vacas de corte no pós-parto, após ovulação espontânea ou induzida por GnRH.

No primeiro experimento em novilhas, regressão luteal foi induzida com PGF2α 2 (folículo jovem = FJ) ou 6 (folículo maduro = FM) dias após a emergência de uma nova onda de crescimento folicular e novilhas foram inseminadas artificialmente 12 h após a apresentação de estro (Abreu *et al.*, 2014a). Como esperado, o intervalo da PGF2α ao estro foi maior no grupo de FJ em comparação com o FM, com alguma variação neste intervalo entre os dois estados (Tabela 2). Idade do folículo à IA foi maior aproximadamente 3 dias no grupo FM, e o diâmetro do folículo ovulatório foi marginalmente maior nas novilhas FM em comparação às FJ. No entanto, a taxa de concepção da IA após o estro não diferiu entre os grupos.

Em vacas no pós-parto (Abreu *et al.*, 2014b), a regressão luteal foi induzida com PGF2α 2,5 (folículo jovem = FJ) ou 6,5 (folículo maduro = FM) dias após a emergência de uma nova onda de crescimento folicular. Com base nos intervalos até o estro em novilhas (Abreu *et al.*, 2014A), as vacas do grupo FM foram inseminadas artificialmente baseando-se na detecção de estro até 72 horas após a PGF2α, e as vacas não detectadas em estro receberam GnRH e foram inseminadas em tempo-fixo na hora 72. No grupo FJ, a detecção estro e IA foram realizadas até a hora 96, com IATF nas vacas restantes na hora 96. O intervalo até o estro, após a PGF2α, foi aproximadamente 24 h maior no tratamento FJ em relação ao FM (Tabela 3). Isto resultou em uma diferença na idade do folículo no momento da IA de aproximadamente 3 dias (FM> FJ) ainda que o diâmetro do folículo ovulatório não diferiu entre os tratamentos. A taxa de concepção durante o período de sincronização não diferiu entre vacas dos tratamentos FM e FJ (Tabela 3).

Como descrito anteriormente, em bovinos que apresentam um nova onda folícular iniciada após o primeiro GnRH, a idade do folículo ovulatório em um protocolo de 5 dias, pelo delineamento, é de aproximadamente 2 dias a menos do que com um protocolo CO-Synch + CIDR de 7 dias. Os resultados dos experimentos de Abreu *et al.* (2014a, b) sugerem que a idade dos folículos ovulatórios, por si só, para as fêmeas que respondem ao primeiro GnRH não

pode ser uma importante fonte de variação na taxa de concepção após a IATF.

Tabela 2: Efeito do tratamento (Trt) na apresentação de estro, no comprimento do proestro, na idade do folículo e no tamanho no momento da inseminação artificial (IA) (média ± EP), e na taxa de concepção em dois estados americanos

	Trt[1]	n	Apresentação de estro (%)	Duração do proestro[2] (h)	Idade do folículo[3] à IA (dias)	Tamanho do folículo na IA (mm)	Taxa de concepção (%)
Montana	FM	53	92,5	55,8 ± 2,7[a]	8,3 ± 0,11[a]	11,0 ± 0,18[a]	63,3
	FJ	75	90,7	67,4 ± 1,6[b]	4,8 ± 0,06[b]	10,4 ± 0,15[b]	64,7
Ohio	FM	77	87,0	53,7 ± 2,2[a]	8,2 ± 0,10[a]	-	64,2
	FJ	75	90,7	78,5 ± 1,4[c]	5,3 ± 0,06[c]	-	69,1

[a-c]Valores com diferentes sobrescritos na mesma coluna diferem (P <0,01), [1]FM = folículo maduro; FJ = folículo jovem, [2] Duração do proestro foi definida como o intervalo da administração prostaglandina F2α (PGF2α) ao estro, [3]Idade do folículo foi definida como o intervalo da administração de benzoato de estradiol (BE) até 12 h após o estro menos 3 dias para a ocorrência da formação de nova onda folicular em novilhas que receberam PGF2α 5 (FJ) ou 9 dias (MF) após o BE, Adaptado de Abreu *et al.*, (2014a).

Tabela 3: Efeito do tratamento na resposta de diversas variáveis (média ± EP) em vacas de corte

Variável[1]	Folículo maduro	Folículo jovem	Valor de P
Apresentação de estro em até 72 h (%)	76,3	47,7	< 0,01
Apresentação de estro da PGF2α até a IATF - 72 *vs.* 96 h (%)	76,3	88,6	< 0,01
Intervalo da PGF2α ao estro (h)	57,5 ± 1,6	78,9 ± 0,8	< 0,01
Idade do folículo à IA (dia)	9,32 ± 0,04	6,26 ± 0,02	< 0,01
Diâmetro do folículo à IA (mm)	13,1 ± 0,2	12,9 ± 0,1	> 0,10
Taxa de crescimento do folículo da PGF2α até a IA (mm/dia)	0,95 ± 0,07	1,14 ± 0,04	< 0,05
Taxa de crescimento do folículo, 5,5 d após o BE até a PGF2α (mm/dia)	0,77 ± 0,06	n/a	-
Taxa de concepção (%)	72,0	67,1	> 0,10
Concentração de progesterona (~ 7 d) após a IA, ng/ml (G1 apenas)	3,56 ± 0,21	3,85 ± 0,13	> 0,10

[1]IATF = inseminação artificial em tempo fixo; BE = benzoato de estradiol; G1 = grupo 1; PGF2α = prostaglandina F2α, Adaptado de Abreu *et al*, (2014b)

Agradecimentos

Nossos agradecimento ao OSU-OARDC, USDA-NIFA, USDA-ARS (Miles City, MT), Select Sires Inc,, Zoetis (ex-Pfizer Saúde Animal), e IVX Animal Health pelo apoio de vários experimentos apresentados. Além disso, os autores gostariam de agradecer aos numerosos indivíduos de outros laboratórios que ajudaram com a pesquisa aqui apresentada.

Referências

Abreu FM, Cruppe LH, Maquivar M, Utt MD, Madsen CA, Vasconcelos JLM, Day ML, Geary TW, 2014a, The effect of follicle age on conception rate in beef heifers, *J Anim Sci*, 92:1022-1028.

Abreu FM, Geary TW, Cruppe LH, Madsen CA, Jinks EM, Pohler KG, Vasconcelos JLM, Day ML, 2014b, The effect of follicle age on pregnancy rate in beef cows, *J Anim Sci*, 92:1015-1021.

Atkins JA, Busch DC, Bader JF, Keisler DH, Patterson DJ, Lucy MC, Smith MF, 2008, Gonadotropin-releasing hormone-induced ovulation and luteinizing hormone release in beef heifers: effect of day of the cycle, *J Anim Sci*, 86:83-93.

Atkins JA, Smith MF, Wells KJ, Geary TW, 2010 Factors affecting pre-ovulatory follicle diameter and ovulation rate to GnRH in postpartum beef cows Part I: Cycling cows, *J Anim Sci*, 88:2300-2310.

Atkins JA, Smith MF, MacNeil MD, Jinks EM, Abreu FM, Alexander LJ, Geary TW, 2013, Pregnancy establishment and maintenance in cattle, *J Anim Sci*, 91:722-733.

Bleach, ECL, Glencross RG, Knight PG, 2004, Association between ovarian follicle development and pregnancy rates in dairy cows undergoing a spontaneous oestrus cycle, *Reproduction*, 127:621-629.

Bridges GA, Helser LA, Grum DE, Mussard ML, Gasser CL, Day ML, 2008, Decreasing the interval between GnRH and PGF2α from 7 to 5 days and lengthening proestrus increases timed-AI pregnancy rates in beef cows, *Theriogenology*, 69:843-851.

Bridges GA, Mussard ML, Burke CR, Day ML, 2010, Influence of the length of proestrus on fertility and endocrine function in female cattle, *Anim Reprod Sci*, 117:208-215.

Bridges GA, Mussard ML, Pate JL, Ott TL, Hansen TR, Day ML, 2012, Impact of preovulatory estradiol concentrations on conceptus development and uterine gene expression, *Anim Reprod Sci*,

133:16-26,

Bridges GA, Day ML, Geary TW, Cruppe LH, 2013, Triennial Reproduction Symposium: Deficiencies in the uterine environment and failure to support embryonic development, *J Anim Sci*, 91:3002-3013.

Bridges GA, Mussard ML, Helser LA, Day ML, 2014, Comparison of follicular dynamics and hormone concentrations between the 7-day and 5-day CO-Synch + CIDR program in primiparous beef cows, *Theriogenology*, 81:632-638.

Busch DC, Schafer DJ, Wilson DJ, Mallory DA, Leitman NR, Haden JK, Ellersieck MR, Smith MF, Patterson DJ, 2008, Timing of artificial insemination in postpartum beef cows following administration of the CO-Synch + controlled internal drug-release protocol, *J Anim Sci*, 86:1519-1525.

Cerri, R L, Rutigliano HM, Chebel RC, Santos JE, 2009, Period of dominance of the ovulatory follicle influences embryo quality in lactating dairy cows, *Reproduction*, 137:813-823.

Dias, HP, Kruse SG, Bird SL, Funnell BJ, Geppert T, Lundy E, Gunn PJ, Bridges GA, 2014, Incidence of ovulation to GnRH at onset of 5-d CO-Synch + CIDR protocol and impact on reproductive responses, *J Anim Sci*, 91(E-suppl, 1):698, (abstract).

Dobbins CA, Eborn DR, Tenhouse DE, Breiner RM, Johnson SK, Marston TT, Stevenson JS, 2009, Insemination timing affects pregnancy rates in beef cows treated with CO-Synch protocol including an intravaginal progesterone insert, *Theriogenology*, 72:1009-1016.

Geary TW, Whittier JC, 1998, Effects of a timed insemination following synchronization of ovulation using the Ovsynch or COSynch protocol in beef cows, *Prof Anim Sci*, 14:217-220.

Geary TW, Downing ER, Bruemmer JE, Whittier JC, 2000, Ovarian and estrous response of suckled beef cows to the select synch estrous synchronization protocol, *Prof Anim Sci*, 16:1-5.

Geary TW, Smith MF, MacNeil MD, Day ML, Bridges GA, Perry GA, Abreu FM, Atkins JA, Pohler KG, Jinks EM, Madsen CA, 2013, Triennial Reproduction Symposium: Influence of follicular characteristics at ovulation on early embryonic survival, *J Anim Sci*, 91:3014-3021.

Imakawa K, Day ML, Zalesky DD, Garcia-Winder M, Kittok RJ, Kinder JE, 1986, Regulation of pulsatile LH secretion by ovarian steroids in the heifer, *J Anim Sci*, 63:162-168.

Jinks EM, Smith MF, Atkins JA, Pohler KG, Perry GA, MacNeil MD, Roberts AJ, Waterman RC, Alexander LJ, Geary TW, 2013, Preovulatory estradiol and the establishment and maintenance of pregnancy in suckled beef cows, *J Anim Sci*, 91:1176-1185.

Kinder JE, Kojima FN, Bergfeld EGM, Wehrman ME, Fike KE, 1996, Progestin and estrogen regulation of pulsatile LH release and development of persistent ovarian follicles in cattle, *J Anim Sci*, 74:1424-1440.

Lamb GC, Stevenson JS, Kesler DJ, Garverick HA, Brown DR, Salfen BE, 2001, Inclusion of an intravaginal progesterone insert plus GnRH and prostaglandin F2α for ovulation control in postpartum suckled beef cows, *J Anim Sci*, 79:2253-2259.

Macmillan KL, Thatcher WW, 1991, Effects of an agonist of gonadotropin-releasing hormone on ovarian follicles in cattle, *Biol Reprod*, 45:883-889.

Mussard ML, Burke CR, Day ML, 2003, Ovarian follicle maturity at induced ovulation influences fertility in cattle, *Proc Annu Conf Soc Theriogenol*, 79:185-197.

Mussard ML, Burke CR, Behlke EJ, Gasser CL, Day ML, 2007, Influence of premature induction of an LH surge with GnRH on ovulation, luteal function and fertility in cattle, *J Anim Sci*, 85:937-943.

Perry GA, Smith MF, Lucy MC, Green JA, Parks TE, MacNeil MD, Roberts AJ, Geary TW, 2005, Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success, *Proc Nat Acad Sci USA*, 102:5268-5273.

Perry GA, Smith MF, Roberts AJ, MacNeil MD, Geary TW, 2007, Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers, *J Anim Sci*, 85:684-689.

Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC, 1995, Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2α and GnRH, *Theriogenology*, 44:915-923.

Rhodes FM, Fitzpatrick LA, Entwistle KW, Kinder JE, 1995, Hormone concentrations in the caudal vena cava during the first ovarian follicular wave of the oestrous cycle in heifers, *J Reprod Fertil*, 104:33-39.

Santos, J E, Narciso CD, Rivera F, Thatcher WW, Chebel RC, 2010, Effect of reducing the period of follicle dominance in a timed artificial insemination protocol on reproduction of dairy cows, *J Dairy Sci*, 93:2976-2988.

Sartori R, Haughian JM, Shaver RD, Rosa GJ, Wiltbank MC, 2004, Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows, *J Dairy Sci*, 87:905-920.

Souza AH, Cunha AP, Silva EPB, Gumen A, Ayres H, Guenther JN, Wiltbank MC, 2009, Comparison of gonadorelin products in lactating dairy cows: efficacy based on induction of ovulation of an accessory follicle and circulating luteinizing hormone profiles, *Theriogenology*, 72:271-279.

Thatcher WW, Macmillan KL, Hansen PJ, Drost M, 1989, Concepts for regulation of corpus luteum function by the conceptus and ovarian follicles to improve fertility, *Theriogenology*, 31:149-164.

Townson DH, Tsang PC, Butler WR, Frajblat M, Griel Jr LC, Johnson CJ, Milvae RA, Niksic GM, Pate JL, 2002, Relationship of fertility to ovarian follicular waves before breeding in dairy cows, *J Anim Sci*, 80:1053-1058.

Twagiramungu H, Guilbault LA, Proulx JG, Dufour JJ, 1994, Influence of corpus luteum and induced ovulation on ovarian follicular dynamics in postpartum cyclic cows treated with buserelin and cloprostenol, *J Anim Sci*, 72:1796-1805.

Twagiramungu H, Guilbault LA, Dufour JJ, 1995, Synchronization of ovarian follicular waves with a gonadotropin-releasing hormone agonist to increase the precision of estrus in cattle: a review, *J Anim Sci*,

73:3141-3151.
Valdez KE, Cuneo SP, Gorden PJ, Turzillo AM, 2005, The role of thecal androgen production in the regulation of estradiol biosynthesis by dominant bovine follicles during the first follicular wave, *J Anim Sci*, 83:597-603.

O número de folículos antrais é um bom critério de seleção para a fertilidade em bovinos?

Fábio Morotti[1], Thales Ricardo Rigo Barreiros[2]; Fernanda Zandonadi Machado[1]; Suellen Miguez González[1]; Luciana Simões Rafagnin Marinho[1]; Marcelo Marcondes Seneda[1*]

[1] Laboratório de Reprodução Animal, DCV-CCA-UEL, Londrina, Parana, Brazil
[2] Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal, DVPA, UENP, Bandeirantes, Parana, Brazil

Resumo

Estudos recentes indicam que a população folicular antral pode ser de suma importância para melhorar o desempenho reprodutivo em fêmeas bovinas. Já há consenso de que a contagem de folículos antrais (CFA; folículos ≥ 3 mm de diâmetro) é uma característica bastante variável entre animais, mas com alta repetibilidade no mesmo indivíduo. Desta forma, as fêmeas podem ser classificadas em baixa, intermediária ou alta CFA. Diversos estudos em *Bos taurus* mostram uma correlação positiva entre CFA e parâmetros de fertilidade, como maior quantidade e qualidade de embriões, melhor taxa de prenhez, níveis mais elevados de progesterona, dentre outros. No entanto, ainda não há um consenso sobre CFA em fêmeas *Bos indicus* e *indicus-taurus*. Este artigo tem como objetivo discutir os principais aspectos relacionados à população de folículos antrais e sua relação com o desempenho reprodutivo associado às bioténicas mais comuns da reprodução assistida (inseminação artificial em tempo fixo, produção *in vitro* de embriões, transferência de embriões e superovulação).

Palavras-chave: contagem de folículos antrais, ultrassonografia, dinâmica folicular, produção de embrião, taxa de prenhez.

Introdução

Animais de alta qualidade genética podem ser multiplicados de forma eficiente utilizando biotecnologias reprodutivas como a inseminação artificial e a produção de embriões. Estas biotecnologias são estratégias úteis e conhecidas em todo o mundo por melhorar a genética e a produtividade dos rebanhos em curto período de tempo (Mapletoft and Hasler, 2005; Boni, 2012; Hansen, 2014).

Recentemente houve acréscimo no interesse em estudos sobre a contagem de folículos antrais (CFA) e sua influência sobre o desempenho reprodutivo na espécie bovina, assim como na aplicação em biotecnologias reprodutivas (Ireland et al., 2011; Pontes et al., 2011; Rico et al., 2012; Silva-Santos et al., 2014a, 2014b). Tal fato pode ter imensa repercussão no atual cenário da reprodução animal, pelo aumento significativo na produção mundial de embriões. Apesar de diversos resultados favoráveis quanto à CFA em *Bos taurus*, muitos aspectos da fisiologia reprodutiva permanecem desconhecidos. Considerando-se a CFA em *Bos indicus*, existem muitos pontos a serem abordados, particularmente o impacto na fertilidade com o uso da produção *in vitro* de embriões (PIVE), inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e transferência de embriões em tempo fixo (TETF).

A alta variabilidade na população de folículos antrais é uma característica marcante em bovinos (Burns et al., 2005) com baixa, intermediária ou alta CFA (Santos et al., 2012; 2013; Mendonça et al., 2013). Apesar da alta variabilidade entre os animais, existe uma elevada repetibilidade do número de folículos observados no mesmo indivíduo em avaliações realizadas no decorrer de um período (Burns et al., 2005; Ireland et al., 2007; 2008; 2009).

Esta constância na CFA em um mesmo indivíduo torna-se um recurso estratégico, pela possibilidade de classificar um animal pela CFA com apenas um exame ultrassonográfico. Para animais *taurus*, a CFA está diretamente correlacionada com o tamanho da reserva folicular ovariana (Ireland et al., 2011), o que não foi comprovado em fêmeas *indicus*, tanto fetos como novilhas e vacas (Silva-Santos et al., 2011). No entanto, outros fatores como genética (Walsh et al., 2014), ambiente materno, estado nutricional e de higidez (Ireland et al., 2011; Evans et al., 2012) também parecem influenciar a CFA. Por exemplo, o estado nutricional e o ritmo metabólico foram apontados como fatores que afetam o crescimento folicular, a qualidade dos oócitos e a secreção de hormônios reprodutivos em bovinos (Jimenez-Krassel et al., 2009; Mossa et al., 2010; Evans et al., 2012).

A CFA também pode influenciar a produção de embriões bovinos, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, especialmente quanto ao número de embriões produzidos por doadora, mas também na eficiência do processo, com índices mais elevados para animais de alta CFA (Ireland et al., 2008; Santos et al., 2014; Silva-Santos et al., 2014a).

Destaca-se a importância da CFA e sua relação com taxas de prenhez. Estudos conduzidos com fêmeas *taurus* apresentaram melhores taxas de gestação para fêmeas de alta CFA (Cushman et al., 2009; Evans et al., 2012; Mossa et al., 2012). No

*Autor para correspondência: mseneda@uel.br

entanto, em estudos recentes com animais *indicus* e *indicus-taurus* não houve melhor desempenho para taxa de prenhez para animais de alta CFA (Mendonça et al., 2013; Santos et al., 2014). De modo surpreendente, alguns dados apontam para um melhor desempenho de vacas de baixa CFA quanto a índices de prenhez (Santos et al., 2013).

Além da ultrassonografia, a mensuração da concentração do hormônio anti-Mulleriano (AMH) também pode ser utilizada para seleção de fêmeas de acordo com o tamanho da população folicular, já que o AMH tem sido considerado como um fator de elevada correlação com o número de folículos antrais e oócitos saudáveis (Hehenkamp et al., 2006; Ireland et al., 2011).

Considerando o impacto da biotecnologia reprodutiva no melhoramente genético e as dúvidas quanto ao efeito da contagem de folículos antrais sobre o desempenho reprodutivo em animais *indicus*, a presente revisão tem como objetivo discutir os principais aspectos da CFA relacionados ao número de folículos antrais e sua relação com a dinâmica folicular, IATF, OPU/FIV e SOV.

Contagem de folículos antrais e sua repetibilidade

O número de folículos antrais ovarianos é altamente variável nas diferentes espécies (Burns et al., 2005; Ireland et al., 2007; Pontes et al., 2011, Santos et al., 2012), porém em bovinos, existe uma elevada repetibilidade no mesmo indivíduo (Burns et al., 2005). Assim, foi demonstrada a possibilidade de selecionar fêmeas *taurus* com base na CFA, pela ultrassonografia, devido ao alto grau de repetibilidade entre indivíduos, independentemente da raça, idade, estação de monta, lactação ou condições de gestação (Burns et al 2005). A mesma situação de repetibilidade da CFA foi demonstrada para animais de sangue *indicus;* avaliando os mesmos animais por vários meses foi possível identificar a alta correlação (0,90-0,92) em fêmeas *indicus-taurus* desmamadas e de sobreano (Santos et al., 2012; Silva-Santos et al., 2014). Portanto, um único exame ultrassonográfico rotineiro pode identificar fêmeas com baixa, intermediária ou alta CFA, de acordo com resultados também observados em fêmeas Nelore (Morotti et al., dados não publicados).

Contagem de folículos antrais e produção de embriões

Considerando a importância da produção de embriões para o melhoramento genético dos rebanhos, nota-se grande variabilidade no número de embriões produzidos por doadora, tanto no método *in vitro* quanto *in vivo* (Pontes et al., 2009, 2010, 2011). A alta variabilidade na taxa de recuperação de oócitos e à resposta superovulatória são fatores importantes que afetam o sucesso da produção de embriões bovinos (Taneja et al., 2000; Ireland et al., 2007; 2011; Silva-Santos et al., 2014). Neste contexto, vários estudos com animais *taurus* e alguns com animais de sangue *indicus* têm demonstrado que um número maior de folículos está relacionado a benefícios quantitativos para o sucesso da PIVE e SOV (Taneja et al., 2000; Singh et al., 2004; Ireland et al., 2008; Silva-Santos et al., 2014). Para animais *indicus-taurus*, o número médio de embriões por coleta também foi maior para as fêmeas com alta, quando comparado a animais de baixa CFA (6,9 ± 5,3 *versus* 1,9 ± 2,1; $P < 0,05$). Portanto, este estudo reforça o conceito evidente de que há benefícios quantitativos de produção de embriões conforme o tamanho da população de folículos antrais (Tabela 1).

Tabela 1 - Desempenho reprodutivo de fêmeas *Bos indicus-taurus* com alta (G-Alta, ≥ 40 folículos) ou baixa (G-Baixa, ≤ 10 folículos) contagem de folículos antrais comparando a produção de embriões *in vitro* [*ovum pickup*/produção *in vitro* (OPU/PIV)] e *in vivo* [superovulação (SOV)].

Variáveis	**G-Alta (n = 20)**	**G-Baixa (n = 20)**
Folículos antrais (n)	47 ± 6	9 ± 3
Total de oócitos recuperados	738^{a}	116^{b}
Proporção de oócitos viáveis (%)	58,94 (435/738)	55,17 (64/116)
Taxa de clivagem (%)	61,25 (452/738)	56,03 (65/116)
Taxa de blastocisto (%)	16,53 (122/738)	9,48 (11/116)
Total de embriões/ OPU/PIV (n)	$6,10 \pm 4,51^{aA}$ (122/20)	$0,55 \pm 0,83^{bB}$ (11/20)
Total de estruturas recuperadas/coletadas (n)	$8,80 \pm 6,78^{a}$ (176/20)	$2,25 \pm 2,63^{b}$ (45/20)
Total de embriões/ coletados (n)	$6,95 \pm 5,34^{aA}$ (139/20)	$1,9 \pm 2,13^{bA}$ (38/20)
Proporção congelados (%)	$78,42^{a}$ (109/139)	$89,47^{a}$ (34/38)

Os valores seguidos por letras diferentes sobrescritos (a, b) dentro da mesma linha (G-alta *vs.* G-baixa) ou (A, B) dentro da mesma coluna (de OPU/IVP *vs.* SOV) foram significativamente diferentes (P ≤ 0,05) Adaptado de Silva-Santos et al. (2014).

Resultados semelhantes com doadoras *taurus* foram obtidos por Ireland et al. (2007), com menor número médio de embriões *in vitro* para fêmeas de baixa CFA quando em comparação com animais de alta CFA (1,3 *versus* 4,9 embriões). Na produção *in vivo* de embriões, as doadoas de baixa CFA (< 15 folículos) produziram menor número de estruturas quando em comparação com fêmeas de alta CFA (> 25 folículos), com médias de 3,8 *versus* 5,4 embriões, respectivamente.

Resultados contraditórios para animais *indicus* foram encontrados em nosso grupo de trabalho. Em um experimento com doadoras Nelore (n = 66), estas foram divididas em alta CFA (CFA > 40 folículos); média CFA (18 a 25 folículos) ou baixa CFA (CFA < 7 folículos), sendo os oócitos fecundados com sêmen de um único touro. Além da superioridade quantitativa esperada, houve superioridade qualitativa conforme a CFA. Vacas de alta, média e baixa CFA apresentaram taxas de blastocisto de 42, 32 e 13%, respectivamente (P <0,05; Santos et al., 2015). No entanto, em um trabalho recém-concluído, tal situação não se confirmou. A partir de uma amostragem maior de vacas Nelore (n = 356), obteve-se oócitos de fêmeas de alta (> 92 folículos), média (46 a 76 folículos) ou baixa CFA (< 31 folículos). Todos os oócitos também foram fecundados com sêmen de um único touro. Não houve diferença nas taxas de clivagem e blastocisto, sendo 40, 36 e 38% para alta, média e baixa CFA, respectivamente (Rosa et al. dados não publicados).

Adicionalmente aos resultados de produção embrionária e prenhez, a expressão de mRNA de genes relacionados à viabilidade folicular e oocitária parece apresentar padrões semelhantes em fêmeas zebuínas de alta, média ou baixa CFA. Não foi encontrada diferença significativa na expressão de genes relacionados à esteroidogênese (CYP19, STAR), à proliferação e diferenciação celular (TGFB1, LIFRa e BMPR2) e à produção e/ou resposta hormonal (AMH, FSHr, PGR, PGRMC) em células do *cumulus* e da granulosa de fêmeas Nelore (Rosa et al. dados não publicados). A contradição de tais resultados, obtidos por um mesmo grupo de pesquisa, destaca a complexidade do tema.

Constata-se que a CFA não é o único aspecto a interferir quantitativamente na produção de embriões, havendo uma melhor resposta da doadora para a OPU/FIV ou SOV em decorrência de variáveis ainda não completamente compreendidas. Neste sentido, Pontes et al. (2009) relataram que algumas doadoras forneceram melhores resultados na técnica *in vitro* ou *in vivo*, independentemente do número de folículos (Tabela 2).

Tabela 2 - Variação nas taxas de produção de embriões de seis vacas Nelore (*Bos indicus*) obtidos por procedimentos *in vitro* (*ovum pickup*/produção *in vitro* – OPU/FIV) ou *in vivo* (superovulação e coleta de embrião - SOV).

Variáveis	Doadora					
	I	II	III	IV	V	VI
Total de procedimentos OPU/FIV	5	5	4	4	5	5
Média de oócitos por OPU	36,6	25,6	49	29,7	22,8	16
Média de oócitos viáveis por OPU	32,2	23,4	45,2	26	19,6	14,4
Média de embriões por OPU	15,6	10,4	24,1	10,3	6,8	3,8
Média de prenhez por OPU	4,8	2,8	9,25	4,3	2,2	1
Total de procedimentos SOV/coleta	2	3	2	2	2	3
Média de embriões por SOV	10	4,3	6,5	2	12,5	5,3
Média de prenhez por SOV	5,5	2	1	1,5	6,5	1,3

Adaptado de Pontes et al. (2009).

Apesar dessas variações individuais conforme a técnica utilizada, é consenso considerar-se a vantagem quantitativa das doadoras de alta CFA. Desta forma, atualmente, a variação do número de folículos por doadora é um fator muito importante para os programas comerciais de produção de embriões. Comumente utiliza-se o método de triagem para seleção de doadoras por meio de uma pré-avaliação ultrassonográfica. As doadoras selecionadas geralmente são aquelas com alta CFA ou número de oócitos, variáveis diretamente correlacionadas. O impacto no número final de prenhezes apresenta grande variação, conforme ilustrado na Tabela 3.

Tabela 3. Produção de embriões e prenhezes conforme número de oócitos obtidos por OPU/PIV (n = 656) a partir de doadoras da raça Nelore (n = 317). Os valores (média ± DP) são apresentados por doadora.

Doadoras conforme produção de oócitos	N°. oócitos viáveis	N°. embriões viáveis	N°. prenhez com 30 dias	N°. prenhez com 90 dias
Elevada (n = 78)	47,06 ± 1,6[a]	15,06 ± 0,86[a]	5,62 ± 0,54[a]	5,52 ± 0,81[a]
Alta (n = 80)	24,95 ± 0,33[b]	9,17 ± 0,63[b]	3,63 ± 0,36[b]	3,32 ± 0,33[b]
Intermediário (n= 79)	15,57 ± 0,26[c]	6,00 ± 0,39[c]	2,10 ± 0,21[c]	1,92 ± 0,20[b]
Baixa (n = 80)	6,31 ± 0,38[d]	2,42 ± 0,25[d]	0,92 ± 0,13[d]	0,85 ± 0,13[c]

a-d Dentro de uma coluna, os valores médios sem um sobrescrito comum diferem significativamente ($P \leq 0.05$).
Adaptado de Pontes et al. (2011).

Apesar das inquestionáveis vantagens quantitativas em número de embriões para o método de seleção de doadoras para OPU/FIV com basa na CFA, o impacto deste critério sobre outros aspectos de fertilidade e produção de carne ou leite ainda não é bem conhecido para animais *indicus*. Desta forma, até que mais estudos sejam realizados, a escolha de doadoras com base no número de folículos deve ser realizada somente após a avaliação do mérito genético para características de produção das doadoras.

Número de folículos antrais e hormônio anti-mülleriano

O AMH é um hormônio que pertence à família do fator de crescimento–β, e é produzido pelas células da granulosa de folículos saudáveis em crescimento. Sua expressão é elevada nas células da granulosa de folículos antrais pequenos e diminui durante o crescimento folicular. As altas concentrações de AMH estão positivamente associadas ao tamanho da população folicular em ovários de ratas, mulheres e fêmeas bovinas. Nestas últimas, a concentração de AMH está altamente correlacionada com o número de folículos antrais e oócitos saudáveis, podendo ser considerada um marcador endócrino viável de CFA em bovinos (Batista et al., 2014).

Fêmeas bovinas com CFA elevada (> 25 folículos) apresentam maiores concentrações circulantes de AMH em comparação a fêmeas com baixa CFA (< 15 folículos; $P < 0,01$), com uma alta correlação entre a concentração média de AMH e a média de CFA para gado *Bos taurus* ($r = 0,88$, $P < 0,001$; Ireland et al., 2008). Em comparação de fêmeas *taurus* e *indicus*¸ de corte e de leite, a concentração de AMH também foi positivamente correlacionada com a CFA em *indicus* (Nelore, faixa de 0,56-0,68) e *taurus* (Holandês, faixa de 0,73-0,90). Independentemente do grupo genético, fêmeas com alta CFA apresentaram maior concentração de AMH (0,57 ng/mL em *taurus versus* 1,20 ng/mL em *indicus*) do que fêmeas com baixa CFA (0,06 e 0,78 ng / mL, respectivamente). Além disso, há evidências de que a CFA em *indicus* (baixa e alta, 28 e 48 folículos, respectivamente) é maior do que a de *taurus* (baixa e alta, 13 e 34 folículos, respectivamente; Batista et al., 2014).

Atualmente, o AMH é reconhecido como um marcador fidedigno para a resposta ovariana à superovulação. Portanto, a determinação das

concentrações de AMH em doadoras pode ajudar a prever as respostas foliculares e ovulatórias para tratamentos gonadotróficos (Rico et al., 2009).

A concentração de AMH no sangue ou plasma pode ser determinada por um exame de ELISA. Em estudo com vacas Holandesas ao longo de um ano, as concentrações de AMH foram constantes e fortemente correlacionadas com a CFA. As doadoras com concentrações de AMH abaixo de 87 pg/ml apresentavam menos de 15 folículos grandes por ciclo estral e baixa eficiência na produção de embriões. Deste modo, a determinação da concentração de AMH no plasma em bovinos poderia rotineiramente ser considerada nos procedimentos de OPU/FIV e SOV, para identificação dos animais com melhor potencial de produção embrionária (Rico et al., 2012).

Número de folículos antrais e progesterona

A produção de progesterona tem sido vinculada à atividade fisiológica do corpo lúteo e funcionalidade do ovário e útero, com impacto direto sobre o desenvolvimento embrionário e prenhez em bovinos (Pohler et al., 2012). Baixas concentrações de progesterona estão associadas a altas taxas de mortalidade embrionária, menos oócitos saudáveis e crescimento mais lento do endométrio nestas fêmeas (Diskin and Morris, 2008). Fêmeas *taurus* com baixa CFA apresentaram baixas concentrações de progesterona durante o seu ciclo estral, em comparação com fêmeas de alta CFA. As menores concentrações circulantes de progesterona em vacas com baixa CFA foram atribuídas principalmente à função do corpo lúteo diminuída, possíveis alterações na capacidade de resposta das células lúteas ao LH, uma potencial redução de proteína STAR no corpo lúteo, capacidade de resposta diminuída da granulosa e células luteais a 25-hidroxicolesterol e à reduzida capacidade das células da granulosa dos folículos dominantes de se submeterem a luteinização para assim produzirem progesterona (Jimenez-Krassel et al., 2009). Não está claro o motivo pelo qual um folículo ovulado, transformado em um CL, produziria menos P4 por estar em um animal de baixa CFA. Principalmente considerando-se estudos recentes em *Bos indicus* nos quais a situação parece ser o inverso (dados não publicados). Considerando este e outros aspectos, nós acreditamos que *Bos taurus* e *Bos indicus* apresentam vias distintas, ao menos para alguns aspectos reprodutivos. Também foi demonstrado que alta CFA foi positivamente associada com espessura do endométrio. Uma maior espessura endometrial foi associada a maiores taxas de implantação embrionária (Basir et al., 2002).

Contagem de folículos antrais e parâmetros de fertilidade em novilhas e vacas de corte

A baixa CFA em fêmas taurinas de leite (raça Holandesa) foi associada a várias características negativas para fertilidade, tais como ovários menores (Ireland et al., 2008), menor chance de prenhez ao final da estação reprodutiva (Mossa et al., 2012), reduzida capacidade de resposta ao tratamento SOV, menor número de embriões viáveis (Singh et al., 2004; Ireland et al., 2007), menores concentrações circulantes de progesterona e AMH (Evans et al, 2012; Ireland et al, 2011) e reduzida espessura do endométrio (Jimenez-Krassel et al., 2009). Neste contexto, animais com alta CFA mostraram-se superiores em todos os aspectos mencionados. Assim, é assumido e fundamentado que em fêmeas da raça Holandesa existe uma correlação linear entre alta CFA e indicadores de eficiência reprodutiva.

Tal contexto, no entanto, não tem sido comprovado em animais zebuínos. Estudos recentes revelaram que características reprodutivas de fêmeas *indicus* (Nelore) e *indicus-taurus* (Braford) não apresentaram melhor desempenho associado à alta CFA (Santos et al., 2012; 2013; Mendonça et al., 2013; Morotti et al., 2014; Santos et al., no prelo). Uma maior taxa de crescimento folicular e maiores diâmetros foliculares foram descritos em fêmeas com baixa CFA *indicus-taurus* (Santos et al., 2012) e *indicus* (Morotti et al., 2014). Além disso, folículos dominantes com maior diâmetro foram descritos em fêmeas Nelore de baixa CFA (Morotti et al., dados não publicados).

Considerando a CFA bimestralmente em 137 fêmeas *indicus-taurus*, não houve diferença no peso médio corporal dos nove aos 24 meses, nem no diâmetro do corno uterino (Santos et al., 2012). Em um experimento subsequente, 71 fêmeas do mesmo rebanho foram submetidas a um protocolo de IATF para determinar os valores de certas variáveis de dinâmica folicular. Os dados estão apresentados na Tabela 4.

Table 4 - Valores médios ± SD da dinâmica folicular de fêmeas *indicus-taurus* (Braford) com diferentes contagens de folículos antrais (CFA; alta, ≥ 40 folículos; média, 17-23 folículos; e baixa, ≤ 10 folículos) após protocolo de sincronização de ovulação.

Variáveis	**Alta ≥ 40 folículos n = 24**	**Média 17-23 folículos n = 24**	**Baixa ≤ 10 folículos n = 23**
Contagem de folículos antrais no D5 (n)	47±9,9[a]	24±9,9[b]	9±3,9[c]
Diâmetro do maior folículo em D5 (cm)	0,66±0,3	0,70±0,2	0,80±0,2
Diâmetro do folículo ovulatório (cm)	1,15±0,2[a]	1,27±0,2[b]	1,32±0,2[b]
Intervalo entre remoção do dispositivo e ovulação (h)	69,33±5,1	71,25±3,0	70,50±4,1
Taxa de ovulação (%)	75 (18/24)	67 (16/24)	70 (16/23)
CL diametro (cm)	1,93±0,3	1,97±0,3	2,04±0,3

a–c Na mesma linha, os valores médios marcados com letras diferentes foram significativamente diferentes (P ≤ 0,05). Adaptado de Santos et al. (2012).

Ao contrário dos resultados obtidos com fêmeas da raça Holandesa (Ireland et al, 2011; Evans et al., 2012), os dados da Tabela 4 demonstram que fêmeas Braford de baixa e média CFA apresentaram maior diâmetro do folículo ovulatório.

Em relação à taxa de prenhez em fêmeas *indicus* (Nelore), dois estudos apresentaram dados de gestação após IATF, sendo um com vacas no puerpério (n = 691) e o outro com novilhas de 24 meses (n = 208). No D8 do protocolo de IATF, os ovários foram avaliados por ultrassonografia e as fêmeas foram classificadas em grupos de alta, média ou baixa CFA. As taxas de prenhez foram avaliadas por ultrassonografia transretal 30 dias após a IATF. Os dados, resumidos na Tabela 5, demonstram que vacas de baixa CFA foram superiores às de média CFA, enquanto que as de alta CFA foram semelhantes a ambas. Não houve diferenças para novilhas. Em suma, não foi possível estabelecer a mesma relação descrita para fêmeas *taurus*.

Tabela 5 - Desempenho reprodutivo de fêmeas Nelore (*Bos indicus*) com alta, média e baixa contagem de folículos antrais (CFA) após protocolo para inseminação artificial em tempo fixo.

Vacas (n)	Alta ≥ 25 folículos (149)	Média 11-24 folículos (400)	Baixa ≤ 10 folículos (142)	Total (691)
Folículos antrais (n)	30,70 ± 5,66[a]	17,03 ± 3,28[b]	7,83 ± 2,42[c]	17,93 ± 8,45[b]
Taxa prenhez (%)	51,67[ab]	48,00[b]	60,50[a]	51,49[ab]
Novilhas (n)	Alta ≥ 30 folículos (38)	Média 13-29 folículos (143)	Baixa ≤ 12 folículos (27)	Total (208)
Fol. antrais (n)	37,73 ± 7,05[a]	19,23 ± 4,29[b]	10,55 ± 2,17[c]	21,48 ± 9,47[b]
Taxa prenhez (%)	44,73	43,35	51,85	44,71

a-c Na mesma linha, os valores médios marcados com letras diferentes foram significativamente diferentes (P ≤ 0,05).
Os dados são apresentados como média ± DP.
Adaptado de Santos et al. (2013) e Mendonça et al. (2013).

A relação entre CFA e prenhez também foi analisada em receptoras *indicus* após a transferência de embriões produzidos *in vitro*. Novilhas Nelore cíclicas (n = 281, ECC 3,0 ± 0,5) foram submetidas a protocolo clássico de sincronização da ovulação para TETF. As novilhas receberam os embriões 17 dias após o início do tratamento hormonal. Não houve diferença na taxa de prenhez conforme a CFA (Tabela 6).

Tabela 6 - Contagem de folículos antrais e taxas de prenhez de receptoras de embriões produzidos *in vitro* da raça Nelore (*Bos indicus*) após TETF.

Novilhas (n)	Alta ≥ 25 folículos (38)	Média 11 folículos (136)	Baixa ≤ 3 folículos (75)
Folículos antrais (n)	25,8 ± 7,4[a]	11,3 ± 2,9[b]	3,8 ± 1,3[c]
Taxa de prenhez (%)	30,0	33,8	34,6

a-c Na mesma linha, os valores médios marcados com letras diferentes foram significativamente diferentes (P ≤ 0,05).

Contagem de folículos antrais, fenótipo de carcaça e características genéticas de herdabilidade

Em um estudo recente, avaliou-se a herdabilidade e o impacto dos efeitos ambientais durante a prenhez sobre CFA em bovinos. Na raça Holandesa, este parâmetro teve herdabilidade de 0,31 ± 0,14 e 0,25 ± 0,13 para vacas e novilhas, respectivamente. A CFA foi negativamente associada com mérito genético para gordura do leite. Os autores concluíram que a CFA em fêmeas da raça Holandesa é um traço genético hereditário moderadamente afetado pela idade e estado de lactação, mas não pelo nível de produção de leite da mãe durante a prenhez (Waslh et al., 2014).

Para novilhas *indicus-taurus* (Braford, n = 270), a CFA foi considerada em um modelo estatístico associado a características fenotípicas para seleção de matrizes. Foram consideradas as variáveis número médio de folículos antrais, efeito do grupo contemporâneo, idade, ganho de peso do nascimento à desmama, conformação à desmama, precocidade de acabamento à desmama, musculatura à desmama, ganho de peso do desmame ao sobreano, conformação ao sobreano, precocidade ao sobreano e musculatura ao sobreano. Para todos os parâmetros estudados, os valores de correlação foram bastante baixos (0,056 a 0,082; P > 0,05), apontando que, para animais *indicus-taurus*, a população folicular antral não possui relação com os principais critérios de seleção de matrizes para rebanhos de corte (Morotti et al., 2014, dados não publicados).

Considerações finais

Diante de todos os comentários acima, nossa conclusão geral é: até o momento, não é possível aplicar a fêmeas Bos indicus o modelo de CFA utilizado em Bos taurus. Enquanto a CFA parece ser um critério muito claro para a seleção reprodutiva em *taurus*, nós temos observado resultados contraditórios em gado *indicus*. Há resultados sinalizando para uma melhor eficiência reprodutiva para animais de baixa CFA, outros para as fêmeas de média CFA e ainda, no mesmo modelo de vacas *taurus*, dados sugerindo que há incremento na eficiência reprodutiva para fêmeas zebuínas de alta CFA.

Um dos principais desafios na análise dos artigos refere-se à ampla variação na classificação dos critérios alta, média ou baixa contagem de folículos. Há valores como sendo de baixa CFA em um artigo, que se encontram como alta CFA em outro trabalho, para uma mesma categoria e mesma raça. Esta situação torna muito crítica a comparação dos dados.

De qualquer forma, a inconstância dos resultados mostra a necessidade de se priorizar sempre o mérito genético na escolha das doadoras e não a CFA. Seguir esse critério se torna particularmente importante para doadoras de oócitos. Na produção *in vitro* de embriões, a vantagem quantitativa de número de estruturas pode levar a uma seleção tendenciosa de doadoras com alta CFA, pois estas tornam toda a cadeia da PIVE mais rentável. Considerando a estimativa de que o Brasil, como líder mundial desta biotecnologia, produz, por ano, ao redor de 300.000 embriões *in vitro* (Viana et al., 2012), há que se atentar para que um benefício imediato no número de embriões não suplante um rigoroso critério de mérito genético, aspecto mais importante a curto, médio e longo prazo na seleção de animais.

Referências

Basir, G.S., O, W-S., So, W.W.K., Ng, E.H.Y., Ho, P.C., 2002. Evaluation of cycle-tocycle variation of endometrial responsiveness using transvaginalsonography in women undergoing assisted reproduction. *Ultrasound Obstet. Gynecol*. 19, 484-489.

Batista, E.O.S., Macedo, G.G., Sala, R.V., Ortolan, M.D.D.V., Sá Filho, M.F., Del Valle, T.A., Jesus, E.F., Lopes, R.N.V.R., Renn, F.P., Baruselli, P.S., 2014. Plasma Antimullerian Hormone as a Predictor of Ovarian Antral Follicular Population in Bos indicus (Nelore) and Bos taurus (Holstein) Heifers. *Reprod. Domest. Anim.* 49, 448-52.

Boni, R., 2012. Ovum pick-up in cattle: a 25 yr retrospective analysis. *Anim. Reprod.* 9, 362-9.

Burns, D.S., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J.L.H., Knight, P.G., Ireland, J.J., 2005. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high

repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. *Biol. Reprod.* 73, 53-62.

Cushman, R.A., Allan, M.F., Kuehn, L.A., Snelling, W.M., Cupp, A.S., Freetly, H.C., 2009. Evaluation of antral follicle count and ovarian morphology in crossbred beef cows: investigation of influence of stage of the estrous cycle, age, and birth weight. *J.Anim.* 87(6), 1971-80.

Diskin, M.G., Morris, D.G., 2008. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reprod. Domest. Anim.* 43,260-267.

Evans, A.C.O., Mossa, F., Walsh, S.W., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J.L.H., Smith, G.W., Ireland, J.J., 2012. Effects of maternal environment during gestation on ovarian folliculogenesis and consequences for fertility in bovine offspring. *Reprod. Domest. Anim.* 47, 31-37.

Hansen, P., 2014. Current and Future Assisted Reproductive Technologies for Mammalian Farm Animals. In: Lamb GC, DiLorenzo N, editors. *Current and Future Reproductive Technologies and World Food Production: Springer* New York; p.1-22.

Hehenkamp, W.J.K., Looman, C.W.N., Themmen, A.P.N., De Jong, F.H., Te Velde, E.R., Broekmans, F.J.M., 2006. Anti-Mullerian hormone levels in the spontaneous menstrual cycle do not show substantial fluctuation. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 91, 4057-4063.

Ireland, J.J., Smith, G.W., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Folger, J.K., Ireland, J.L.H., Mossa, F., Lonergan, P., Evans, A.C.O., 2011. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. *Reprod. Fert. Develop*. 23, 1-14.

Ireland, J.J., Ward, F., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J.L.H., Smith, G.W., Lonergan, P., Evans, A.C.O., 2007. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Hum. Reprod*. 22, 1687-1695.

Ireland, J.J., Zielak, A.E., Jimenez-Krassel, F., Folger, J., Bettegowda, A., Scheetz, D., Walsh, S., Mossa, F., Knight, P.G., Smith, G.W., Lonergan, P., Evans, A.C.O., 2009. Variation in the ovarian reserve is linked to alterations in intrafollicular oestradiol production and ovarian biomarkers of follicular differentiation and oocyte quality in cattle. *Biol. Reprod*. 80, 954-964.

Ireland, J.L.H., Scheetz, D., Jimenez-Krasse, F., Themmen, A.P.N., Ward, F., Lonergan, P., Smith, G.W., Perez, G.I., Evans, A.C.O., Ireland, J.J., 2008. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. *Biol. Reprod.* 79, 1219-1225.

Jimenez-Krassel, F., Folger, J.K., Ireland, J.L., Smith, G.W., Hou, X., Davis, J.S., Lonergan, P., Evans, A.C., Ireland, J.J., 2009. Evidence that high variation in ovarian reserves of healthy Young adults has a negative impact on the corpus luteum and endometrium during estrous cycles in cattle. *Biol. Reprod.* 80, 1272-1281.

Mapletoft, R.J., Hasler, J.F., 2005. Assisted reproductive technologies in cattle: a review. *Rev Sci Tech.* 24, 393-403.

Mendonça, H.G.R., Santos, G.M.G., Silva-Santos, K.C., Barreiros, T.R.R., Blaschi, W., Morotti, F., Moraes, F.L.Z., Seneda, M.M., 2013. Pregnancy rates following FTAI of Nelore heifers (Bos indicus) with high, intermediate and low numbers of antral follicles. *Anim. Reprod.* 10, 452. (abstract).

Morotti, F., Santos, G.M.G., Silva-Santos, K.C., Moritz, Y., Marcantonio, T.N., Seneda, M.M. Follicular dynamics in Nelore females (*Bos indicus*) with high or low numbers of antral follicles. *Animal Reproduction*, 2014; 11: 352. (abstract).

Morotti et al. Effect of high and low antral follicle count on the behavior of ovarian follicular dynamics in Nelore cows (*Bos indicus*) submitted to synchronization of ovulation. *Unpublished data.*

Mossa, F., Walsh, S.W., Butler, S.T., Berry, D.P., Carter, F., Lonergan, P., Smith, G.W., Ireland, J.J., Evans, A.C.O., 2012. Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95, 2355-2361.

Mossa, F., Jimenez-Krassel, F., Folger, J.K., Ireland, J.L.H., Smith, G.W., Lonergan, P., et al., 2010. Evidence that high variation in antral follicle count during follicular waves is linked to alterations in ovarian androgen production in cattle. *Reprod.* 140, 713-20.

Pohler, K.G., Geary, T.W., Atkins, J.A., Perry, G.A., Jinks, E.M., Smith, M.F., 2012. Follicular determinants of pregnancy establishment and maintenance. *Cell Tissue Res*. 349,649-664.

Pontes, J.H.F., Nonato-Junior, I., Sanches, B.V., Ereno-Junior, J.C., Uvo, S., Barreiros, T.R.R., Oliveira, J.A., Hasler, J.F., Seneda, M.M., 2009. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (Bos indicus) donor cows. *Theriogenology*. 71, 690-697.

Pontes, J.H.F., Silva, K.C.F., Basso, A.C., Rigo, A.G., Ferreira, C.R., Santos, G.M.G., Sanches, B.V., Porcionato, J.P.F., Vieira, P.H.S., Faifer, F.S., Sterza, F.A.M., Schenk, J.L., Seneda, M.M., 2010: Large-scale *in vitro* embryos production and pregnancy rates from Bos taurus, Bos indicus, and indicus-taurus dairy cows using sexed sperm. *Theriogenology* 74, 1349–1355.

Pontes, J.H.F., Melo-Sterza, F.A., Basso, A.C., Ferreira, C.R., Sanches, B.V., Rubin, K.C.P., Seneda, M.M., 2011. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (Bos indicus) donors. *Theriogenology*. 75, 1640-1646.

Rico, C., Fabre, S., Médigue, C., Di Clemente, N., Clément, F., Bontoux, M., Touzé, J.L., Dupont, M., Briant, E., Rémy, B., Beckers, J.F., Monniaux, D., 2009. Antimullerian hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropin responsive follicles

and can help to predict superovulatory responses in the cow. *Biol. Reprod*. 80, 50-59.

Rico, C., Drouilhet, L., Salvetti, P., Dalbiès-Tran, R., Jarrier, P., Touzé J-L, et al., 2012. Determination of anti-Müllerian hormone concentrations in blood as a tool to select Holstein donor cows for embryo production: from the laboratory to the farm. *Reprod. Fert. Develop*. 24, 932-44.

Santos, G.M.G., Silva-Santos, K.C., Barreiros, T.R.R., Blaschi, W., Morotti, F., Silva, C.B., Moraes, F.L.Z., Giudicissi, D.P.L., Seneda, M.M., 2013. Conception rates following FTAI of Nelore cows (Bos indicus) with high, intermediate and low numbers of antral follicles. *Anim. Reprod*. 10, 451 (abstract).

Santos, G.M.G., Silva-Santos, K.C., Siloto, L.S., Morotti, F., Marcantonio, T.N., Marinho, L.S.R., Thasmo, R.L.O., Koetz, J.R.C., Cintra, D.M.L., Seneda, M.M., 2012. Dinâmica folicular em fêmeas bovinas de alta, média e baixa contagem de folículos antrais: resultados preliminares. *Acta Sci Vet*. 40, 422 (abstract).

Santos, G.M.G., Silva-Santos, K.C., Barreiros, T.R.R., Morotti, F., Sanches, B.V., Moraes, F.L.Z., et al., 2014. High numbers of antral follicles influence the *in vitro* embryo production, but not the conception rate of fixed-time artificial insemination in nelore cattle. *Reprod. Fert. Develop*. 27, 206-233.

Silva-Santos, K.C., Santos, G.M.G., Koetz Júnior, C., Morotti, F., Siloto, L.S., Marcantonio, T.N., Urbano, M.R., Oliveira, R.L., Lima, D.C.M., Seneda, M.M., 2014a. Antral follicle populations and embryo production - *in vitro* and *in vivo* - of Bos indicus-taurus donors from weaning to yearling ages. *Reprod. Domest. Anim*. 49, 228-32.

Silva-Santos, K.C., Siloto, L.S., Santos, G.M.C., Morotti, F., Marcantonio, T.N., Seneda, M.M., 2014b. Comparison of Antral and Pre-antral Ovarian Follicle Populations Between Bos indicus and Bos indicus-taurus Cows with High or Low Antral Follicles Counts. *Reprod. Domest. Anim*. 49, 48-51.

AMH e fertilidade em bovinos
Correlação entre população follicular, concentração de AMH e fertilidade em bovinos

P.S. Baruselli[1,3], E.O.S. Batista[1], L.M. Vieira[1], A.H. Souza[2]

[1]Departamento de Reprodução Animal, USP, São Paulo, SP Brasil.
[2]Ceva Saúde Animal, Paulínia, SP, Brazil.

Resumo

O tamanho da população folicular ovariana avaliado diretamente pela contagem de folículos antrais ou através de marcadores endócrinos pode ajudar a determinar o sucesso de biotecnologias reprodutivas em bovinos. Entretanto, embora a população folicular antral ovariana (AFP) apresente alta repetibilidade quando avaliada em um mesmo indivíduo, ela parece ser bastante variável entre os indíviduos. Desta forma, métodos laboratorias que possam predizer de forma segura a AFP tem importante valor na biotecnologia reprodutiva e para seleção genômica de vacas doadoras com grande potencial reprodutivo. Neste contexto, a concentração circulante de hormônio anti-Mülleriano tem sido associada com a AFP e, desse modo, tem sido identificada como um importante marcador endócrino de resposta superovulatória e produção *in vitro* de embriões em bovinos. Além disso, recentes publicações e estudos têm tido como objetivo determinar se os níveis de AMH são correlacionados com fertilidade. Esta revisão tem como objetivo apresentar informações recentes sobre o AMH e sua relação com fertilidade, a possibilidade do uso do AMH como marcador de tecnologias reprodutivas, e por fim seu uso para otimizar a fertilidade em bovinos.

Palavras-chave: folículo antral, hormônio anti – Mülleriano, vaca

Introdução

Eficiência reprodutiva e seleção genética são fatores chaves para o sucesso na pecuária de corte e leite bovina. Tecnologias reprodutivas, como a ovum-pick-up (OPU) e produção *in vitro* de embriões (IVEP) podem rapidamente aumentar o ganho genético em bovinos de corte e leite, tanto através de linhagens macho, como fêmea. Entretanto, em fêmeas, o sucesso desta técnica é altamente dependente de características do animal, tal como a população ovariana de folículos antrais (AFP). Desta forma, a eficência da IVEP pode ser comprometida pela grande variabilidade de AFP entre doadoras, apesar da alta repetibilidade no mesmo animal (Burns, 2005, Ireland et al., 2007).

O número de folículos antrais ovarianos são positivamente associados com uma variedade de medidas indiretas de fertilidade em bovinos tais como função ovariana (Ireland et al., 2008, Ireland et al., 2009, Jimenez-Krassel et al., 2009), respostas superovulatórias (Kawamata, 1994, Cushman et al., 1999, Singh et al., 2004), produção de blastocisto *in vitro* (Taneja et al., 2000, Pontes et al., 2009), fertilidade (Erickson et al., 1976, Maurer and Echternkamp, 1985, Oliveira et al., 2002, Mossa et al., 2012) e longeividade do rebanho (Jimenez-Krassel *et al*., 2015). Curiosamente, a AFP tem sido associada com vários compostos samguíneos, incluindo concentrações circulantes de insulina, fator de crescimento tipo insulina 1 (IGF-1), e anti-Müllerian hormone (AMH); (Alvarez et al., 2000, Fortune et al., 2010, Satrapa et al., 2013, Batista et al., 2014, Sales et al., 2015)

Em bovinos, a concentração circulante de AMH pode ajudar veterinários à campo predizer a AFP nos ovários (Ireland et al., 2008, Rico et al., 2009, Batista et al., 2014), resposta à tratamentos superovulatórios (Rico et al., 2009, Monniaux et al., 2010, Souza et al., 2015), e mais recentemente como um marcador endócrino de IVEP de raças *Bos taurus* (Gamarra et al., 2014, Guerreiro et al., 2014, Vernunft et al., 2015) e *Bos indicus* (Guerreiro *et al*., 2014). Ainda estudos feitos nas últimas décadas tem indicado que vacas com menos número de folículos antrais tem menor fertilidade (Mossa *et al*., 2012). Desta forma, devido o AMH ser uma medida indireta da reserve ovariana, representada pelo tamanho do *pool* follicular ovariano, estudos tem sido realizados para explorar o uso do AMH para predizer fertilidade a campo em bovinos. (Ribeiro *et al*., 2014, Jimenez-Krassel *et al*., 2015). Entretanto, a concentração de AMH para predizer fertilidade à campo pode variar de acordo com o tipo de manejo reprodutivo empregado na fazenda, parece que o AMH não está associado à fertilidade em vacas seguido o uso de inseminação artificial em tempo fixo (Ribeiro *et al*., 2014). Consequentemente, a presente revisão tem como objetivo discutir pontos relacionados ao AMH e população folicular antral, respostas superovulatórias, OPU-IVEP e fertilidade à campo.

Hormônio Anti-Mulleriano (AMH) e população folicular antral (AFP)

AMH é um membro da superfamília TGFβ de fatores de crescimento (Cate *et al*., 1986) primeiramente descrito por ter um importante papel na diferenciação sexual no início da vida fetal (Lee *et al*., 1996, Rajpert-De Meyts *et al*., 1999). Em fêmeas, AMH é produzido pelas células da granulosa principalmente de folículos pré-antrais e antrais iniciais (Durlinger *et al*., 2002). Embora o número de folículos antrais ovarianos seja variável entre as fêmeas, ele apresenta alta repetibilidade em um mesmo indíviduo, desta forma o AMH é um

Autor para correspondência: barusell@usp.br

marcador endócrino confiável da reserva ovariana (população total de folículos ovarianos) (Ireland et al., 2007, Ireland et al., 2008, Monniaux et al., 2012). Neste contexto, o AMH tem sido correlacionado com AFP em bovinos de diferentes grupos genéticos [(Fig. 1 and 2);(Batista et al., 2014, Baldrighi et al., 2013)] e categorias (Fig. 3; Batista et al., 2015, FMVZ – USP, São Paulo, SP, Brazil, unpublished data). Além disso, seguindo o padrão de AFP, a concentração de AMH parece variar muito entre os grupos genéticos bovinos (Batista et al., 2014, Ribeiro et al., 2014), e quando classificamos os animais de acordo com a população folicular (Alta vs. Baixa população folicular), o nível de AMH parece ser diferente dentro de cada grupo genético (Batista et al., 2014, Guerreiro et al., 2014). Por exemplo, em recente estudo feito com novilhas Bos indicus foi observado maior AFP e concentração de AMH em fêmeas *Bos indicus* comparada às fêmeas *Bos taurus* (Batista et al., 2014).

Uma importante vantagem prática em utilizar o AMH ao invés de contagem direta da população follicular com ultrassom para predizer AFP é que os níveis de AMH variam minimamente durante o ciclo estral (Rico et al., 2009, Ireland et al., 2010, Souza et al., 2015), desta forma amostrtas de sangue podem ser colhidas a qualquer momento durante o ciclo para avaliar a concentração circulante de AMH. Uma exceção a esta característica pode ser o período após tratamento superestimulatório com FSH, em que a concentração plasmática de AMH parece ser maior que os níveis fisiológicos normais (Rico et al., 2009, Rico et al., 2012). Acredita-se que este aumento na concentração de AMH seguido o tratamento com FSH pode ser devido ao crescimento de pequenos folículos que não são detectáveis pela imagem de ultrassom (Rico et al., 2009, Rico et al., 2012). Alternativamente, não podemos descartar a possibilidade de que o tratamento com FSH pode aumentar a secreção de AMH pelas células da granulosa. Entretanto, são necessárias investigações adicionais para esta hipótese (Rico et al., 2009, Rico et al., 2012).

Além disso, embora o AMH seja produzido em grande quantidade pelos folículos antrais iniciais, um outro intrigante aspect biológico é que o AMH está envolvido no mecanismo de inibição da ativação de folículos primordiais no *pool* de folículos na emergência folicular (Durlinger et al., 2002, Fortune et al., 2010). Embora fêmeas *Bos indicus* apresentem maior AFP e concentração de AMH (Batista et al., 2014), foi demonstrado em prévio estudo que a população de folículos primordiais foi menor em novilhas *Bos indicus* que *Bos taurus* (Silva-Santos *et al*., 2011). Além disso, ovários de camundongos *null* apresentaram maior número de folículos atréticos (Visser *et al*., 2007). Desta forma, possivelmente a alta concentração plasmática de AMH em novilhas Bos indicus contribua para menores taxas de atresia folicular.

Como citado anteriormente, o AMH pode inibir a ativação de folículos primordias para o pool de folículos na emergência follicular, isto para evitar a depleção prematura da população folicular ovariana. A concentração de AMH decresce assim como o número de folículos ovarianos conforme a idade em roedores (Kevenaar *et al*., 2006) e mulheres (Piltonen *et al*., 2005). Da mesma forma, em recente estudo do nosso grupo de pesquisa, nós encontramos maior concentração plasmática de AMH em bezerras comparada às novilhas ciclando em fêmeas *Bos indicus* e *Bos taurus* (Batista et al., 2015, FMVZ – USP, São Paulo, SP, Brazil, unpublished data).

Fatores nutricionais tais como vitamina D em humanos (Dennis *et al*., 2012) e balanço energético negativo em bovinos (Souza et al., 2014) parecem ter alguma influência no AMH circulante. Recentemente foi observado aumento no número de folículos e qualidade do blastocisto em novilhas Holandesas com alta cocentração de AMH que foram administrados *drenches* de propilenoglicol, no entanto o mesmo não foi observado para novilhas com baixa concentração de AMH (Gamarra *et al*., 2014). Desta forma, um maior número de pesquisas é necessário para tentar manipular as concentrações circulantes de AMH por meio de diferentes estratégias nutricionais.

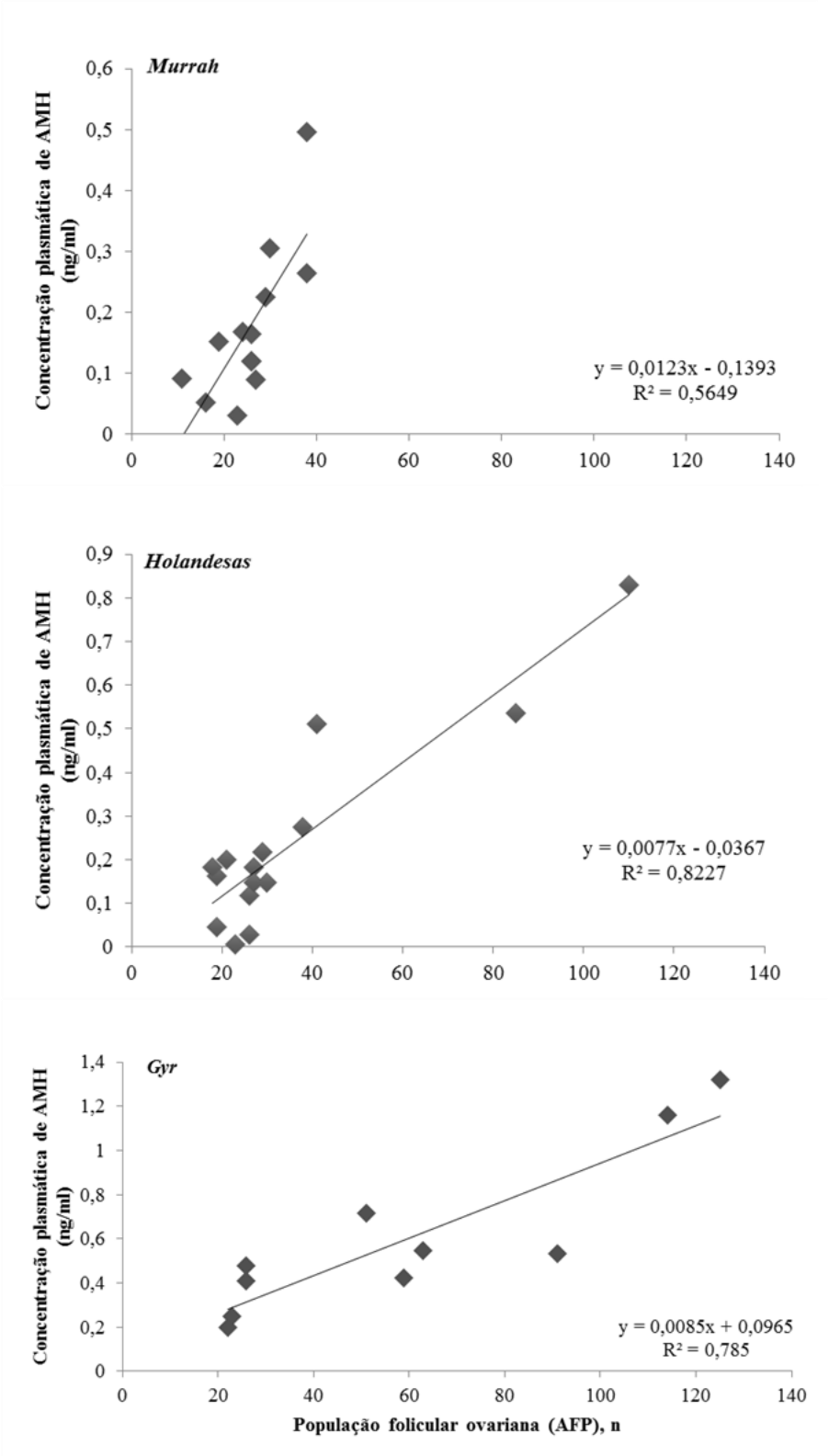

Figura 1**.** Correlação entre população follicular ovariana (AFP) no dia da ovulação e concentração de anti-Mullerian hormone (AMH) em Murrah (*Bubalus bubalis*, n = 13), Holandesas (*Bos taurus*, n = 15) e Gir (*Bos indicus*, n = 10 heifers). Adaptado de (Baldrighi et al., 2013).

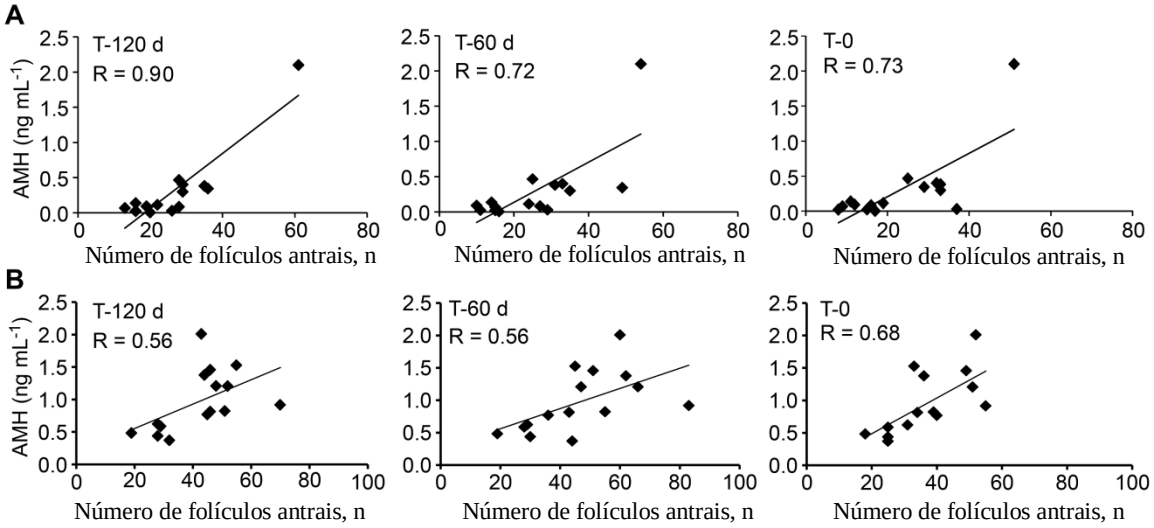

Figura 2**.** Relação entre o número de folículos T-120, T-60, e T0 e concentração plasmática de AMH (ng/ml; T0) em novilhas Holandesas (n = 16; A) e Nelore (n = 16; B). População folicular antral ovariana (AFP) foi avaliada em três períodos com 60 dias (d) de intervalo (T – 120, 120 dias antes da coleta de amostra sanguínea para posterior análise de AMH); T – 60, 60 dias antes; e T0, no momento da coleta de amostra sanguíneas para posterior análise de AMH). Amostras de sangue foram colhidas da veia jugular no dia T0 do desenho experimental. Adaptado de (Batista et al., 2014).

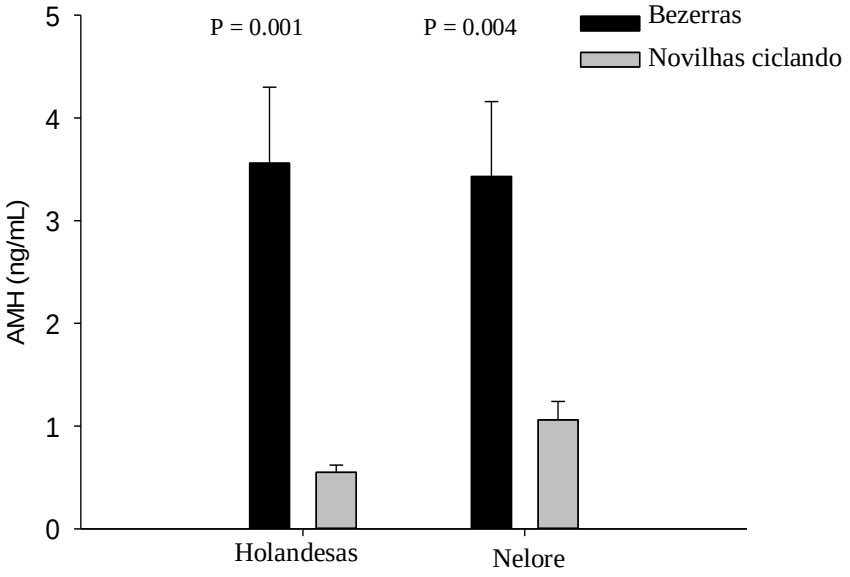

Figura 3. Concentração plasmática de AMH (ng/ml) em bezerras (2 to 4 m, Holandesas: n = 24 and Nelore: n = 30) and novilhas ciclando (Holandesa: n = 10 and Nelore: n = 12). Adaptado de Batista et al., 2015, FMVZ – USP, São Paulo, SP, Brazil, dados não publicados.

AMH e resposta superovulatória/IVF

Em prévios estudos foi observado uma forte relação positivia entre AMH circulante e produção de embriões *in vivo* seguida superovulação em bovinos de leite (Monniaux et al., 2010, Rico et al., 2012, Souza et al., 2015). AMH tem sido correlacionado com número de folículos grandes após tratamento superestimulatório, número de CL após superovulação e número de embriões produzidos (Monniaux et al., 2010, Souza et al., 2015) em vacas primíparas e multíparas [(Souza et al., 2015); (Fig.4)]. Além disso, o tipo de fator anti-coagulante pode influenciar nas medidas de AMH e isto parece ser um importante detalhe quando interpretamos resultados de AMH. Atualmente, um nível de 87 pg/mL (amostras colhidas com heparina) e 123 pg/mL (amostras com EDTA) tem sido proposto para identificar vacas leiteiras produzindo menos que 15 folículos ovulatórios após tratamento com FSH e próximo ao momento do estro. Desta forma, coletar amostras para posterior análise de AMH antes de agrupar as vacas em programas reprodutivos que utilizem FSH irá provavelmente permitir melhor número de embriões produzidos e, assim, reduzir os custos por embrião produzido.

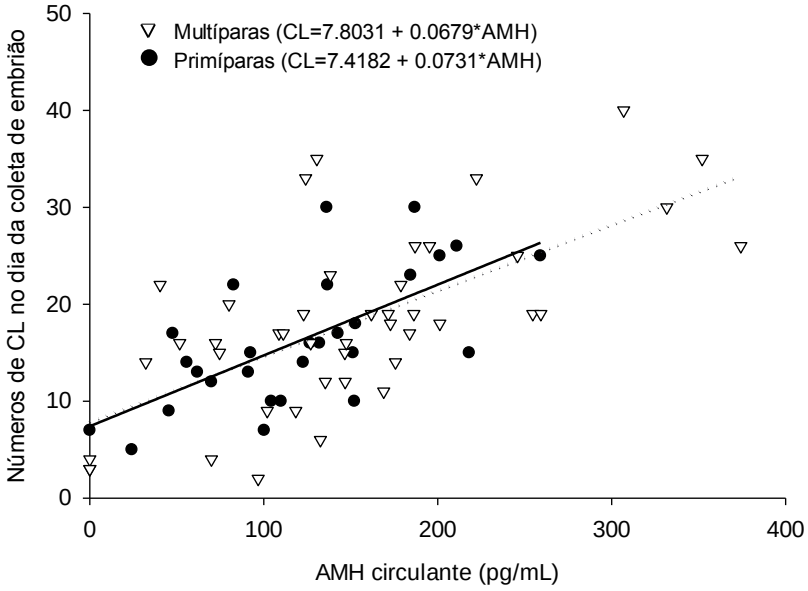

Figura 4. Concentração média de AMH circulante (pg/mL) e número de corpos lúteos (CL) no dia da coleta de embrião para vacas leiteiras primíparas e multíparas. Adaptado de Souza *et al.* (2015).

A produção *in vitro* de embriões têm aumentado muito nas últimas décadas. Atualmente, 40,6% do total de embriões produzidos no mundo (1,275,874 embryos) são provenientes da produção *in vitro* de embriões (IETS, 2014). Desta forma, a ovum pick-up (OPU) e a produção *in vitro* de embriões (IVEP) são importantes ferramentas que podem ser usadas para direcionar o progresso genético. Entretanto, o sucesso da tecnologia de IVF pode ser limitado em animais com baixo número de folículos nos ovários. Neste contexto, recentes estudos tem identificado o AMH como um marcador endócrino para selecionar doadoras com maior potencial para IVEP (Gamarra et al., 2014, Guerreiro et al., 2014, Vernunft et al., 2015). De acordo com estes achados, a concentração plasmática de AMH tem sido positivamente correlacionada com total de folículos aspirados, complexos de cumulus oócitos recuperados (COCs), número de COCs viáveis, e número de embriões produzidos por sessão de OPU em novilhas *Bos indicus* e *Bos taurus* (Fig. 5 e 6, e Tabela 1). Entretanto, algumas variáveis relacionadas ao desenvolvimento *in vitro* (taxas de clivagem e blastocisto) não parecem ter correlação com AMH circulante (Fig. 5, e 6 e Tabela 1;(Guerreiro et al., 2014).

A informação genômica permite que os produtores tenham conhecimento do mérito genético dos seus animais precocemente. Desta forma, tem sido recentemente explorado a possibilidade de produzir embriões de bezerras com 2 a 4 meses de idade. Preliminares estudos de nosso grupo de pesquisa indicam que a concentração de AMH circulante é também um útil marcador endócrino para predizer IVEP de bezerras *Bos taurus* e *Bos indicus* (Batista et al., 2015, FMVZ – USP, São Paulo, SP, Brazil, unpublished data). O exame dos ovários de bezerras com ultrassom pode ser difícil e não prático. Assim, avaliar a concentração de AMH circulante nesta categoria animal pode ser uma importante ferramenta para selecionar as melhores doadoras de oócitos para IVEP, superando algumas limitações técnicas envolvendo a utilização de ultrasson em bezerras. Desta forma, com a disponibilidade da tecnologia genômica para identificação de animais superiores geneticamente e a análise de AMH para facilitar a identificação das melhores doadoras para IVEP, há o uso potencial de bezerras como doadoras de oócitos em programas de IVEP. Isto permitirá um ganho genético acelerado pela redução do interval entre gerações (Armstrong et al., 1992, Lohuis, 1995, Camargo et al., 2005).

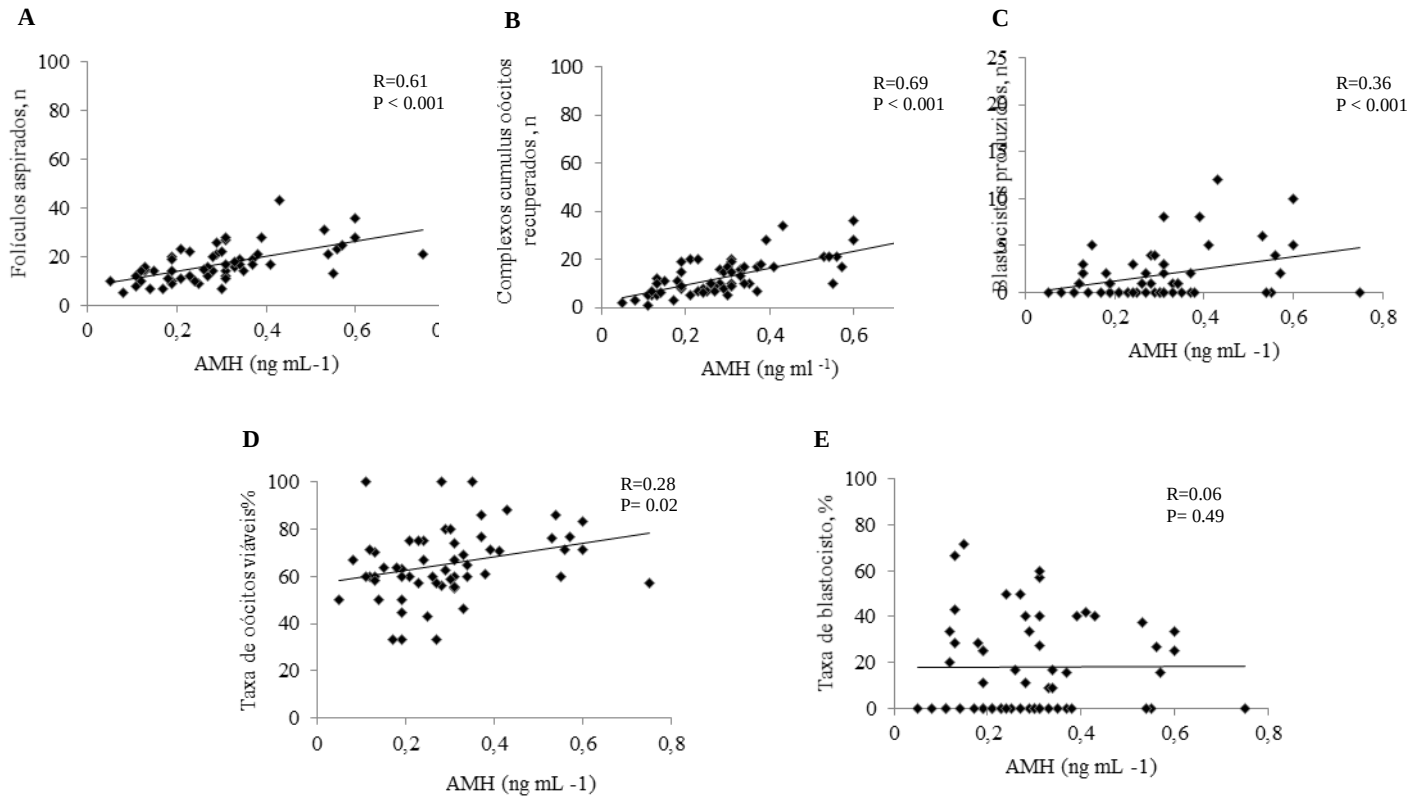

Figura 5. Correlação entre concentração plasmática de AMH e variáveis relacionadas a ovum pick-up (OPU) e produção *in vitro* de embriões (IVEP) em doadoras *Bos taurus*. Correlação entre o número de folículos aspirados (A), total de oócitos recuperados (B), número de blastocistos produzidos (C), taxa de oócitos viáveis (%, D) e taxa de blastocisto (%, E) e concentração plasmática de AMH em doadoras Holandesas (*Bos taurus*). Amostras de sangue para determinação de AMH plasmático foram coletadas da veia coccigea imediatamente antes da sessão de OPU. Adaptado de Guerreiro *et al.* (2014).

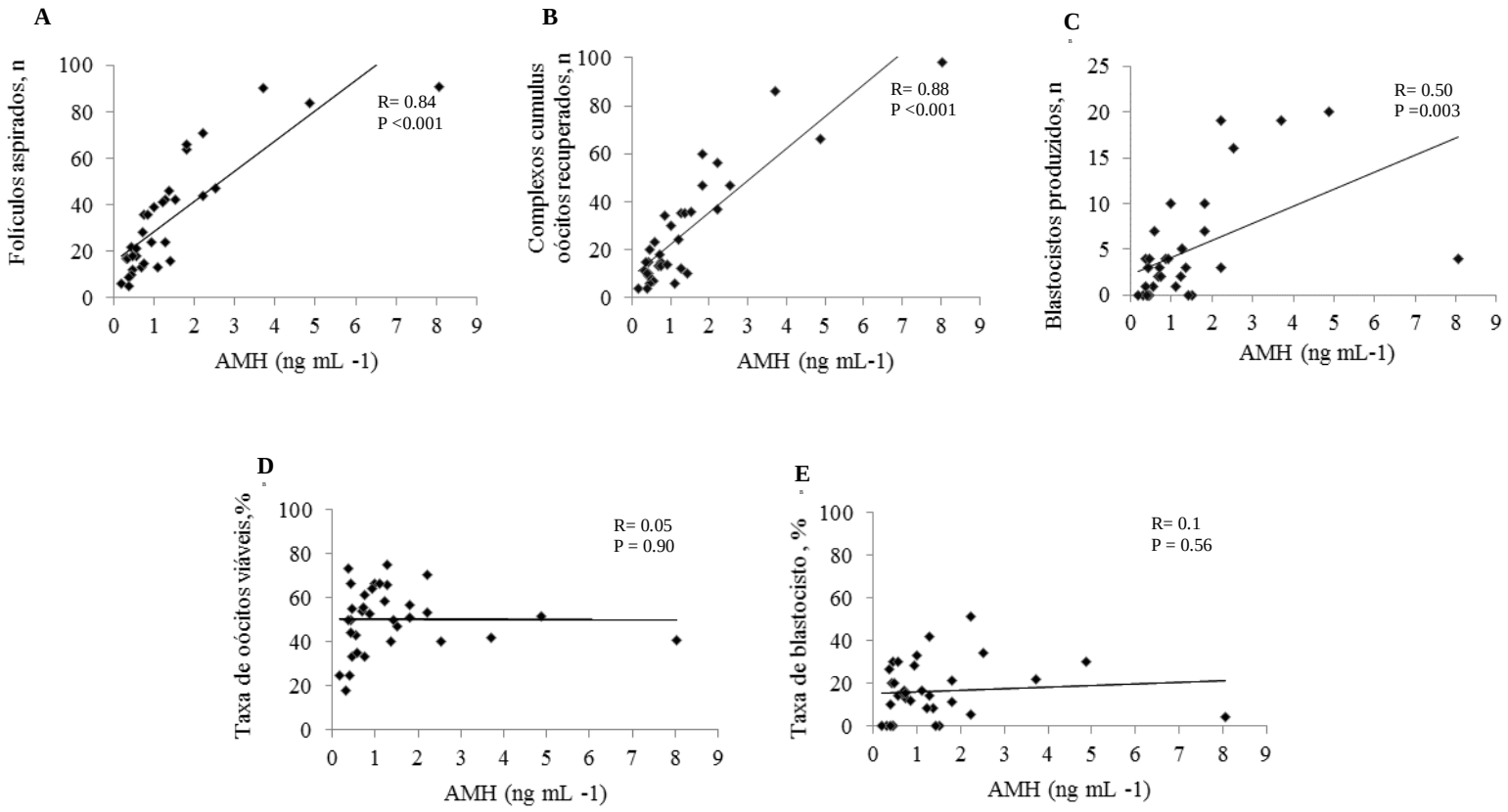

Figura 6. Correlação entre concenração plasmática de AMH e variáveis relacionadas a ovum pick-up (OPU) e produção *in vitro* de embriões (IVEP) em doadoras *Bos indicus*. Correlação entre número de folículos aspirados (A), totaol de oócitos recuperados (B), número de blastocistos produzidos (C), taxa de oócitos viáveis (%, D) e taxa de blastocisto (%, E) e concentração plasmática de hormônio anti-Mulleriano (AMH) em doadoras Nelore (*Bos indicus*). Amostras de sangue para determinar AMH plasmático foram coletadas pela coccígea imediatamente antes da sessão de OPU. Adaptado de Guerreiro *et al*. (2014).

Tabela 1. Concentração plasmática de AMH e embriões produzidos (média ± EPM) após OPU-IVEP em doadoras *Bos indicus* (Nelore) e *Bos taurus* (Holandesas) classificadas em duas categorais de AMH**.**

	Concentração plasmática de AMH		*P*
	Baixo	Alto	
Bos taurus			
Número de animais	32	27	-
AMH plasmático(ng/mL)	0.2 ± 0.01	0.4 ± 0.02	<0.0001
Taxa de clivagem (%)	54.5 ± 5.6	58.6 ± 5.3	0.98
Blastocistos produzidos por OPU	1.2 ± 0.3	3.0 ± 0.7	0.04
Taxa de blastocisto (%)	19.8 ± 4.2	20.6 ± 4.0	0.60
Bos indicus			
Número de animais	18	16	-
AMH plasmático (ng/mL)	0.5 ± 0.05	2.0 ± 0.3	<0.0001
Taxa de clivagem (%)	76.0 ± 8.2	89.8 ± 4.0	0.14
Blastocistos produzidos por OPU	2.2 ± 0.5	7.0 ± 1.7	0.0067
Taxa de blastocisto (%)	27.4 ± 5.5	33.7 ± 6.5	0.41

Adaptado de Guerreiro *et al*. (2014).

Estes dados têm mostrado uma alta correlação ente AFP e AMH, e desta forma o AMH parece ser um interessante marcador endócrino para identificar as melhores doadoras para IVEP, independente do genótipo de idade do animal.

AMH e fertilidade

Recentemente foi observado relação positiva entre AMH e fertilidade em vacas leiteiras (Ribeiro et al., 2014, Jimenez-Krassel et al., 2015). Por exemplo, uma grande estudo feito na Flórida- USA relatou que vacas com baixas concentrações de AMH tem menores taxas de prenhez seguido o primeiro serviço e maior incidência de perda de prenhez com 30 e 65 dias de gestação (Ribeiro *et al*., 2014). Além disso, vacas leiteiras com relative baixa concentração de AMH como novilhas também tem tido menor taxa de sobrevivência após parto para o primeiro serviço comparado com novilhas de mesma idade, mas com maior concentração de AMH (Jimenez-Krassel *et al*., 2015). Interessantemente, parece que o tipo de manejo reprodutivo empregado em um programa reprodutivo pode determinar a possibilidade do uso do AMH para predizer fertilidade. Por exemplo, em estudo realizado por Ribeiro *et al*. (2014) foi observado associação ente concentração circulante de AMH e P/AI em vacas inseminadas após detecção de estro. Entretanto, não foi encontrada associação entre AMH circulante e P/AI quando as vacas tiveram sua ovulação sincronizada por IATF (Ribeiro et al., 2014). Desta forma, parece que o uso de protocolos de IATF podem influenciar em possíveis associações de AMH com fertilidade e podem ajudar a expplicar alguns resultados observados recentemente com vacas Nelore. Como observado em outros estudos (Santos *et al*., 2014), nós não encontramos correlação de população de folículos antrais (animais provavelmente com maior concentração de AMH) e resultados de concepção seguido protocolos de IATF em vacas Nelore maduras, (n = 758) ou novilhas (n = 1,113, Tabela 2; Baruselli *et al*., USP/FMVZ, São Paulo, SP, Brazil; dados não publicados). Além disso, não foi observado efeito da população follicular da doadora no estabelecimento da prenhez após transferência de embriões produzidos, embora a população folicular tenha sido associada com a produção de embriões. (Fig. 7; Bragança *et al*., 2014; Fig. 8; Guerreiro *et al*., USP/FMVZ, São Paulo, SP, Brasil; dados não publicados).

Tabela 2. Números de animais agrupados no teste, escore de condição corporal (ECC), idade (meses), ovulação e/ou taxa de prenhez após IATF em novilhas Nelore ou vacas de acordo com a população de folículos antrais (AFP; avaliada no D4 do protocolo de IATF; o momento esperado da emergência folicular) de acordo com cada categoria. Dados apresentados como porcentagem ou média ± EPM.

	Categorias de população de folículos antrais			Total	P
	Baixo	Médio	Alto		
VACAS					
Número de animais	255	250	253	758	-
ECC (1 – 5)	3,00 ± 0,02	3,02 ± 0,02	3,02 ± 0,02	3,01 ± 0.,1	0,29
População de folículos antrais, n	24,5 ± 0,5^{C}	39,2 ± 0,9^{B}	56,3 ± 1,4^{A}	40,0 ± 0,7	< 0,0001
Taxa de prenhez, %	47,1	53,6	45,5	48,7	0,89
NOVILHAS					
Número de animais	371	371	371	1,113	-
Idade, meses	15,0 ± 0,1	14,9 ± 0,1	14,8 ± 0,1	14,9 ± 0,1	0,22
ECC (1 – 5)	3,27 ± 0,02	3,27 ± 0,02	3,31 ± 0,02	3,28 ± 0,01	0,74
População de folículos antrais, n	7,1 ± 0,1^{C}	11,3 ± 0.1 ^{B}	17,2 ± 0,2 ^{A}	11,8 ± 0,2	< 0,0001
Taxa de ovulação, %	82,5	78,3	79,8	80,2	0,56
Taxa de prenhez, %	39,6	36,4	36,7	37,6	0,57

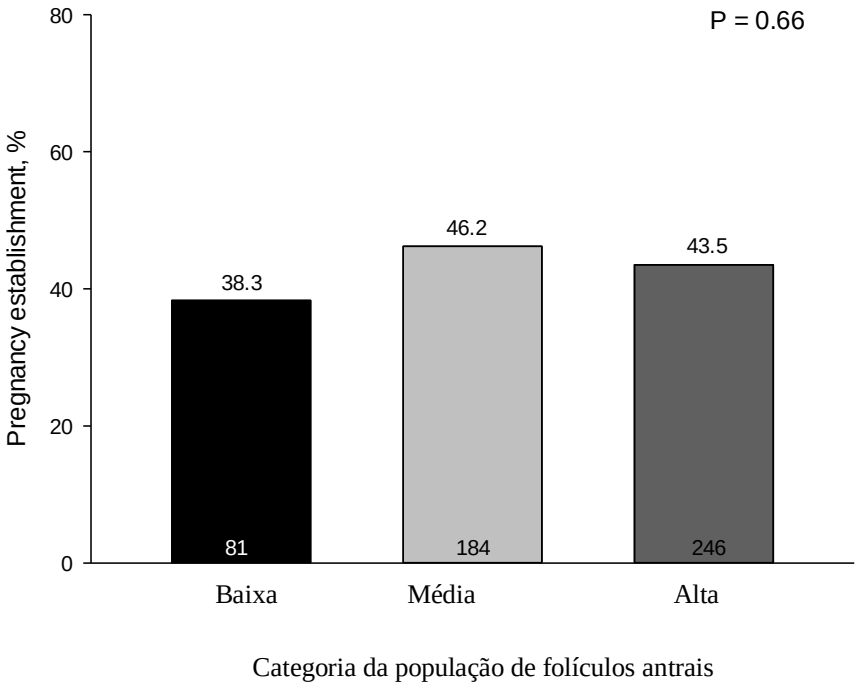

Figura 7. Estabelecimento de prenhez em receptoras cruzadas (*Bos indicus x Bos taurus*) de acordo com categoria de população folicular (baixa, média ou alta) para doadoras Holandesas não lactantes. Adaptado de após a transferência de embriões produzidos *in vitro* Bragança *et al*. (2014).

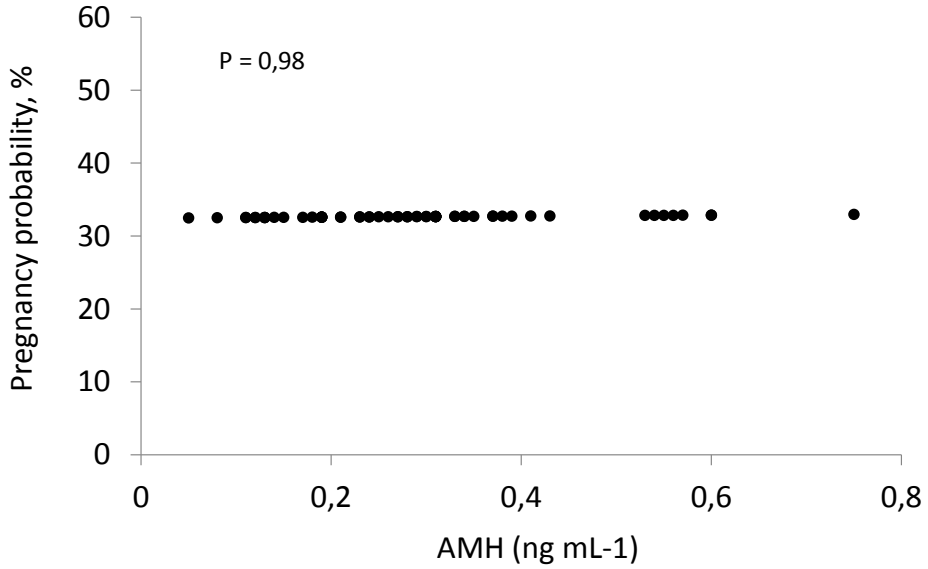

Figura 8. Correlação entre níveis circulantes de AMH (ng/mL) e probabilidade de prenhez em receptoras cruzadas após transferência de embriões produzidos *in vitro* de doadoras Holandesas (n = 107). Adaptado de Guerreiro et al., USP/FMVZ, São Paulo, SP, Brasil, dados não publicados.

Em trabalho realizado pelo nosso grupo de pesquisa, também não foi observado associação entre as concentrações circulantes de AMH e idade à concepção em novilhs Holandesas ou intervalos do parto a concepção em vacas Holandesas lactantes. (Carvalho *et al*. 2015, University of Wisconsin-Madison, Wisconsin, Madison, USA, Fig.9). Um importante aspecto a ser discutido sobre este estudo é que não foi levado em consideração novilhas e ou vacas que tenham sido abatidas antes da confirmação de prenhez. Além disso, esta é uma análise restropectiva.

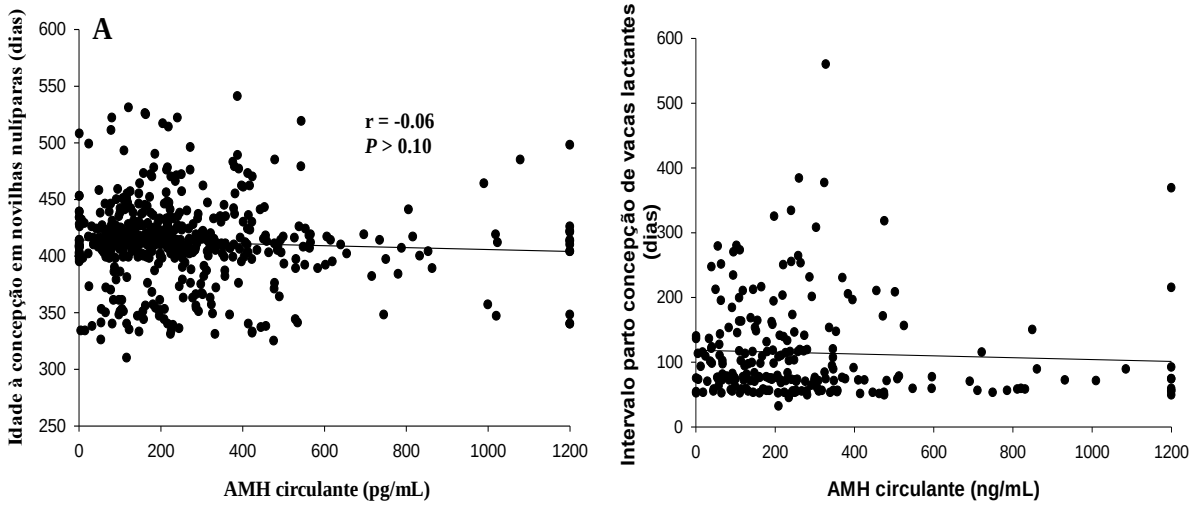

Figura 9. Correlação entre os níveis de AMH circulante (pg/ml) e idade (dias) à concepção em novilhas (n = 528; painel A); e intervalo de parto-concepção (dias abertos) em vacas lactantes (n = 223; painel B).

Além disso, devido ao número de folículos antrais ovarianos parece ter uma correlação mãe-filha (Walsh *et al*., 2014), e que pode permitir a seleção de animais de maior AFP, temos recentemente avaliado possíveis associações entre AMH circulante e sua relação entre mãe e filha nas raças Holandesas e Jersey (Fig. 10; Batista *et al*., 2015; USP/FMVZ, São Paulo, SP, Brazil). A correlação de AMH circulante entre mãe e filha embora significante, foi baixa (r = 0.18). Embora a AFP em bovinos seja moderadamente herdáve [0.31; (Walsh et al., 2014)], fatores epigenéticos tais como níveis de balanço energético negativo no inicio da vida fetal (Evans et al., 2012) tal como idade da mãe e status lactacional (Walsh *et al*., 2014) devem provavelmente influenciar a contagem de folículos antrais da prole. Estes fatores epigenéticos devem explicar a baixa correlação encontrada no AMH circulante entre mãe e filha. Geralmente, o valor usado para medir AMH para predizer fertilidade é ainda controverso e mais estudos usando grande numero de animais são necessários para conclusões finais.

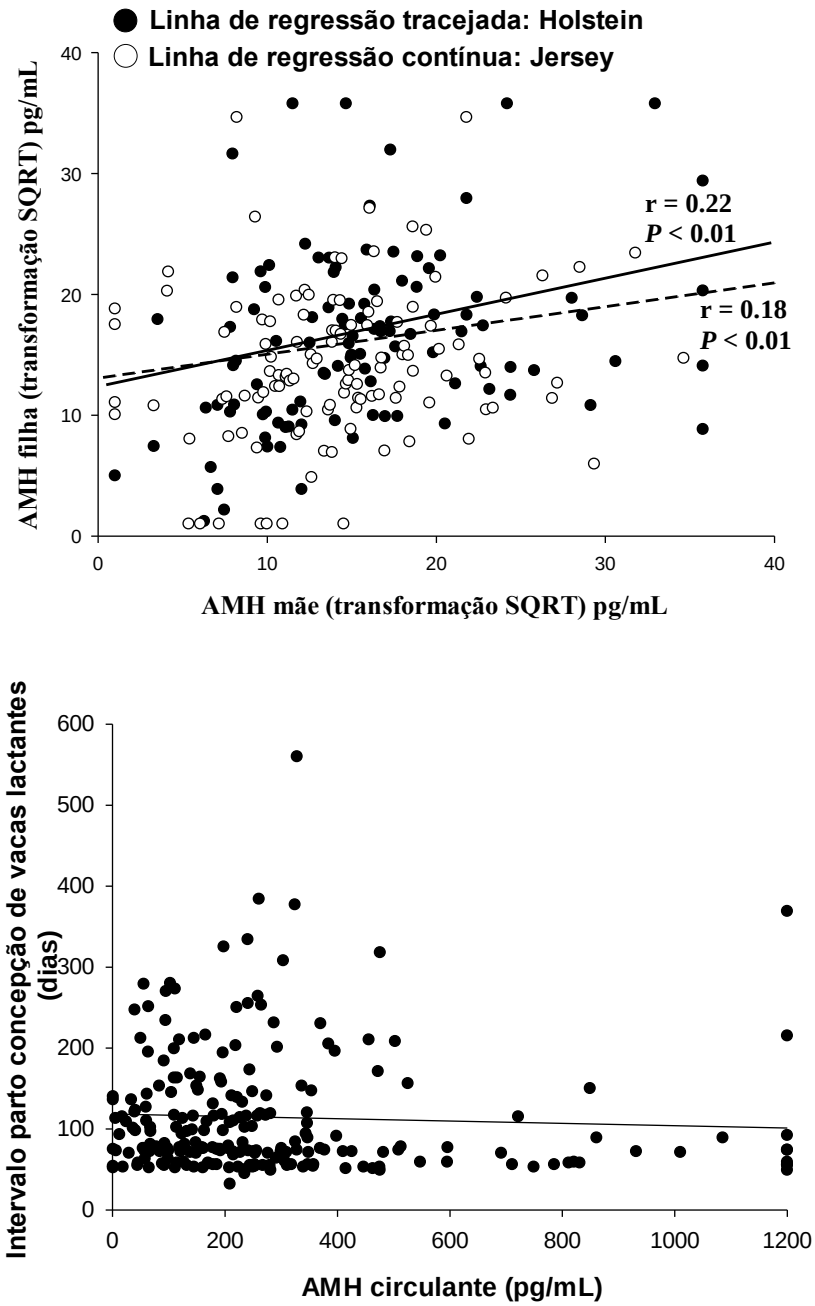

Figura 10. Correlação entre níveis de AMH circulante (pg/ml) in em Holandesas (n=116) e Jersey (n =106) mãe-filha. Valores de AMH foram transformados em raiz quadrad. Dados de Batista *et al.*, 2015; USP/FMVZ, São Paulo, SP, Brasil; dados não publicados.

Conclusões e futuras direções

Medidas de AMH circulante em bovinos pode ser útil para identificar animais mais propensos a ter melhor resposta superovulatória com tratamentos com gonadotrofinas tão como melhores doadoras de oócitos para produção de embriões *in vitro*. Além disso, embora não se possa excluir a possibilidade de utilização de AMH para selecionar vacas com maior fertilidade; mais pesquisas básicas e aplicadas são necessárias para elucidar se o AMH pode ser usado por bovinos de corte e de leite para identificar animais com maior fertilidade e vida produtiva.

References

Alvarez, P., L. J. Spicer, C. C. Chase, M. E. Payton, T. D. Hamilton, R. E. Stewart, A. C. Hammond, T. A. Olson, and R. P. Wettemann. 2000. Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. *Journal of Animal Science* 78(5):1291-1302.

Armstrong, D. T., P. Holm, B. Irvine, B. A. Petersen, R. B. Stubbings, D. McLean, G. Stevens, and R. F. Seamark. 1992. Pregnancies and live birth from *in vitro* fertilization of calf oocytes collected by

laparoscopic follicular aspiration. *Theriogenology* 38(4):667-678.

Baldrighi, J. M., A. F. Siqueira, P. M. Assis, M. F. Sá Filho, J. A. Visintin, G. P. Nogueira, P. S. Baruselli, and M. E. O. A. Assumpção. 2013. Hormonal evaluation during the ovulatory cycle of Holstein, Gir and Buffalo heifers at the same environment and nutritional management. Page 415 in *Proc. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões. Animal Reproduction*, Praia do Forte -BA- Brazil.

Batista, E., G. Macedo, R. Sala, M. Ortolan, M. Sá Filho, T. Del Valle, E. Jesus, R. Lopes, F. Rennó, and P. Baruselli. 2014. Plasma Antimullerian Hormone as a Predictor of Ovarian Antral Follicular Population in Bos indicus (Nelore) and Bos taurus (Holstein) Heifers. *Reproduction in Domestic Animals* 49(3):448-452.

Bragança, L. G. M., K. N. G. Marques, L. M. Vieira, C. R. A. Silveira, L. G. Picado, B. M. Monteiro, M. F. Sá Filho, and P. S. Baruselli. 2014. The number of oocytes recovered from Holstein donors has no effect on the pregnancy establishment of *in vitro* embryo programs. *Animal Reproduction* 11(3):433.

Burns, D. S. 2005. Numbers of Antral Follicles During Follicular Waves in Cattle: Evidence for High Variation Among Animals, Very High Repeatability in Individuals, and an Inverse Association with Serum Follicle-Stimulating Hormone Concentrations. *Biology of Reproduction* 73(1):54-62.

Camargo, L. S. A., J. H. M. Viana, W. F. Sá, A. M. Ferreira, and V. R. Vale Filho. 2005. Developmental competence of oocytes from prepubertal Bos indicus crossbred cattle. *Anim. Reprod. Sci*. 85(1–2):53-59.

Cate, R. L., R. J. Mattaliano, C. Hession, R. Tizard, N. M. Farber, A. Cheung, E. G. Ninfa, A. Z. Frey, D. J. Gash, E. P. Chow, R. A. Fisher, J. M. Bertonis, G. Torres, B. P. Wallner, K. L. Ramachandran, R. C. Ragin, T. F. Manganaro, D. T. MacLaughlin, and P. K. Donahoe. 1986. Isolation of the bovine and human genes for müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell* 45(5):685-698.

Cushman, R. A., J. C. DeSouza, V. S. Hedgpeth, and J. H. Britt. 1999. Superovulatory Response of One Ovary Is Related to the Micro- and Macroscopic Population of Follicles in the Contralateral Ovary of the Cow. *Biology of Reproduction* 60(2):349-354.

Dennis, N. A., L. A. Houghton, G. T. Jones, A. M. van Rij, K. Morgan, and I. S. McLennan. 2012. The level of serum anti-Müllerian hormone correlates with vitamin D status in men and women but not in boys. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 97(7):2450-2455.

Durlinger, A., J. Visser, and A. Themmen. 2002. Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone. *Reproduction* 124(5):601-609.

Erickson, B., R. Reynolds, and R. Murphree. 1976. Ovarian characteristics and reproductive performance of the aged cow. *Biology of Reproduction* 15(4):555-560.

Evans, A., F. Mossa, S. Walsh, D. Scheetz, F. Jimenez-Krassel, J. Ireland, G. Smith, and J. Ireland. 2012. Effects of maternal environment during gestation on ovarian folliculogenesis and consequences for fertility in bovine offspring. *Reproduction in Domestic Animals* 47(s4):31-37.

Fortune, J. E., M. Y. Yang, and W. Muruvi. 2010. *In vitro* and *in vivo* regulation of follicular formation and activation in cattle. *Reproduction, Fertility and Development* 23(1):15-22.

Gamarra, G., C. Ponsart, S. Lacaze, B. Le Guienne, P. Humblot, M.-C. Deloche, D. Monniaux, and A. A. Ponter. 2014. Dietary propylene glycol and *in vitro* embryo production after ovum pick-up in heifers with different anti-Müllerian hormone profiles. *Reproduction, Fertility and Development.*

Guerreiro, B. M., E. O. S. Batista, L. M. Vieira, M. F. Sá Filho, C. A. Rodrigues, A. Castro Netto, C. R. A. Silveira, B. M. Bayeux, E. A. R. Dias, F. M. Monteiro, M. Accorsi, R. N. V. R. Lopes, and P. S. Baruselli. 2014. Plasma anti-mullerian hormone: an endocrine marker for *in vitro* embryo production from Bos taurus and Bos indicus donors. *Domest. Anim. Endocrinol.* 49(0):96-104.

IETS. 2014. International embryo transfer society. *Statistics and data retrieval commite report.* 32(4).

Ireland, J., F. Ward, F. Jimenez-Krassel, J. L. H. Ireland, G. W. Smith, P. Lonergan, and A. C. O. Evans. 2007. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Human Reproduction* 22(6):1687-1695.

Ireland, J., A. Zielak-Steciwko, F. Jimenez-Krassel, J. Folger, A. Bettegowda, D. Scheetz, S. Walsh, F. Mossa, P. Knight, and G. Smith. 2009. Variation in the ovarian reserve is linked to alterations in intrafollicular estradiol production and ovarian biomarkers of follicular differentiation and oocyte quality in cattle. *Biology of reproduction* 80(5):954-964.

Ireland, J. J., G. W. Smith, D. Scheetz, F. Jimenez-Krassel, J. K. Folger, J. L. H. Ireland, F. Mossa, P. Lonergan, and A. C. O. Evans. 2010. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. Reproduction, Fertility and Development 23(1):1-14.

Ireland, J. L. H., D. Scheetz, F. Jimenez-Krassel, A. P. N. Themmen, F. Ward, P. Lonergan, G. W. Smith, G. I. Perez, A. C. O. Evans, and J. J. Ireland. 2008. Antral Follicle Count Reliably Predicts Number of Morphologically Healthy Oocytes and Follicles in Ovaries of Young Adult Cattle. Biology of Reproduction 79(6):1219-1225.

Jimenez-Krassel, F., J. Folger, J. Ireland, G. Smith, X. Hou, J. Davis, P. Lonergan, A. Evans, and J. Ireland. 2009. Evidence that high variation in ovarian reserves of healthy young adults has a negative impact on the corpus luteum and endometrium during estrous cycles in cattle. Biology of reproduction 80(6):1272-1281.

Jimenez-Krassel, F., D. Scheetz, L. Neuder, J. Ireland, J. Pursley, G. Smith, R. Tempelman, T. Ferris, W. Roudebush, and F. Mossa. 2015. Concentration of anti-Müllerian hormone in dairy heifers is positively associated with productive herd life. J. Dairy Sci. 98(5):3036-3045.

Kawamata, M. 1994. Relationships between the number of small follicles prior to superovulatory treatment and superovulatory response in Holstein cows. Journal Veteterinay Medicine Science 56(5):965-967.

Kevenaar, M. E., M. F. Meerasahib, P. Kramer, B. M. van de Lang-Born, F. H. de Jong, N. P. Groome, A. P. Themmen, and J. A. Visser. 2006. Serum anti-mullerian hormone levels reflect the size of the primordial follicle pool in mice. Endocrinology 147(7):3228-3234.

Lee, M. M., P. K. Donahoe, T. Hasegawa, B. Silverman, G. B. Crist, S. Best, Y. Hasegawa, R. A. Noto, D. Schoenfeld, and D. T. MacLaughlin. 1996. Mullerian inhibiting substance in humans: normal levels from infancy to adulthood. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 81(2):571-576.

Lohuis, M. M. 1995. Potential benefits of bovine embryo-manipulation technologies to genetic improvement programs. Theriogenology 43(1):51-60.

Maurer, R. and S. Echternkamp. 1985. Repeat-breeder females in beef cattle: Influences and causes. J. Anim. Sci. 61(3):624-636.

Monniaux, D., S. Barbey, C. Rico, S. Fabre, Y. Gallard, and H. Larroque. 2010. Anti-Müllerian hormone: a predictive marker of embryo production in cattle? Reproduction, Fertility and Development 22(7):1083-1091.

Monniaux, D., L. Drouilhet, C. Rico, A. Estienne, P. Jarrier, J.-L. Touzé, J. Sapa, F. Phocas, J. Dupont, R. Dalbiès-Tran, and S. Fabre. 2012. Regulation of anti-Müllerian hormone production in domestic animals. Reproduction, Fertility and Development 25(1):1-16.

Mossa, F., S. Walsh, S. Butler, D. Berry, F. Carter, P. Lonergan, G. Smith, J. Ireland, and A. Evans. 2012. Low numbers of ovarian follicles≥ 3mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. Journal of dairy science 95(5):2355-2361.

Oliveira, J., J. Neves, J. Moraes, P. Gonçalves, J. Bahr, A. Hernandez, and L. Costa. 2002. Follicular development and steroid concentrations in cows with different levels of fertility raised under nutritional stress. Anim. Reprod. Sci. 73(1):1-10.

Piltonen, T., L. Morin-Papunen, R. Koivunen, A. Perheentupa, A. Ruokonen, and J. S. Tapanainen. 2005. Serum anti-Müllerian hormone levels remain high until late reproductive age and decrease during metformin therapy in women with polycystic ovary syndrome. Human Reproduction 20(7):1820-1826.

Pontes, J. H. F., I. Nonato-Junior, B. V. Sanches, J. C. Ereno-Junior, S. Uvo, T. R. R. Barreiros, J. A. Oliveira, J. F. Hasler, and M. M. Seneda. 2009. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (Bos indicus) donor cows. Theriogenology 71(4):690-697.

Rajpert-De Meyts, E., N. Jørgensen, N. Græm, J. Müller, R. L. Cate, and N. E. Skakkebæk. 1999. Expression of Anti-Müllerian Hormone during Normal and Pathological Gonadal Development: Association with Differentiation of Sertoli and Granulosa Cells 1. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 84(10):3836-3844.

Ribeiro, E. S., R. S. Bisinotto, F. S. Lima, L. F. Greco, A. Morrison, A. Kumar, W. W. Thatcher, and J. E. P. Santos. 2014. Plasma anti-Müllerian hormone in adult dairy cows and associations with fertility. J. Dairy Sci. 97(11):6888-6900.

Rico, C., L. Drouilhet, P. Salvetti, R. Dalbiès-Tran, P. Jarrier, J.-L. Touzé, E. Pillet, C. Ponsart, S. Fabre, and D. Monniaux. 2012. Determination of anti-Müllerian hormone concentrations in blood as a tool to select Holstein donor cows for embryo production: from the laboratory to the farm. Reproduction, Fertility and Development 24(7):932-944.

Rico, C., S. Fabre, C. Médigue, N. d. Clemente, F. Clément, M. Bontoux, J.-L. Touzé, M. Dupont, E. Briant, B. Rémy, J.-F. Beckers, and D. Monniaux. 2009. Anti-Müllerian Hormone Is an Endocrine Marker of Ovarian Gonadotropin-Responsive Follicles and Can Help to Predict Superovulatory Responses in the Cow. Biology of Reproduction 80(1):50-59.

Sales, J. N. S., L. T. Iguma, R. I. T. P. Batista, C. C. R. Quintão, M. A. S. Gama, C. Freitas, M. M. Pereira, L. S. A. Camargo, J. H. M. Viana, J. C. Souza, and P. S. Baruselli. 2015. Effects of a high-energy diet on oocyte quality and *in vitro* embryo production in Bos indicus and Bos taurus cows. Journal of Dairy Science (0).

Santos, G. M. G., K. C. Silva-Santos, T. R. R. Barreiros, F. Morotti, B. V. Sanches, F. L. Z. Moraes, W. Blaschi, and M. M. Seneda. 2014. 233 High numbers of antral follicles influence the *in vitro* embryo production, but not the conception rate of fixed-time artificial insemination in nelore cattle. Reproduction, Fertility and Development 27(1):206-206.

Satrapa, R. A., A. S. Castilho, E. M. Razza, M. F. Pegorer, R. Puelker, and C. M. Barros. 2013. Differential expression of members of the IGF system in OPU-derived oocytes from Nelore (Bos indicus) and Holstein (Bos taurus) cows. Animal reproduction science 138(3):155-158.

Silva-Santos, K. C., G. M. G. Santos, L. S. Siloto, M. F. Hertel, E. R. Andrade, M. I. B. Rubin, L.

Sturion, F. A. Melo-Sterza, and M. M. Seneda. 2011. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of Bos taurus indicus and Bos taurus taurus cattle. Theriogenology 76(6):1051-1057.

Singh, J., M. Domínguez, R. Jaiswal, and G. P. Adams. 2004. A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. Theriogenology 62(1–2):227-243.

Souza, A., P. Carvalho, A. Rozner, L. Vieira, K. Hackbart, R. Bender, A. Dresch, J. Verstegen, R. Shaver, and M. Wiltbank. 2015. Relationship between circulating anti-Müllerian hormone (AMH) and superovulatory response of high-producing dairy cows. Journal of dairy science 98(1):169-178.

Souza, A. H., J. P. Verstegen, E. Batista, C. Collar, P. S. Baruselli, and M. C. Wiltbank. 2014. Using information on circulating levels of Anti-Mullerian hormone (AMH) to enhance embryo production and fertility in cattle. American Embryo Transfer Association (AETA) - proceedings:12-15.

Taneja, M., P. E. J. Bols, A. V. de Velde, J.-C. Ju, D. Schreiber, M. W. Tripp, H. Levine, Y. Echelard, J. Riesen, and X. Yang. 2000. Developmental Competence of Juvenile Calf Oocytes In Vitro and In Vivo: Influence of Donor Animal Variation and Repeated Gonadotropin Stimulation. Biology of Reproduction 62(1):206-213.

Vernunft, A., M. Schwerhoff, T. Viergutz, M. Diederich, and A. Kuwer. 2015. Anti-Muellerian hormone levels in plasma of Holstein-Friesian heifers as a predictive parameter for ovum pick-up and embryo production outcomes. The Journal of reproduction and development 61(1):74-79.

Visser, J. A., A. L. L. Durlinger, I. J. J. Peters, E. R. v. d. Heuvel, U. M. Rose, P. Kramer, F. H. d. Jong, and A. P. N. Themmen. 2007. Increased Oocyte Degeneration and Follicular Atresia during the Estrous Cycle in Anti-Müllerian Hormone Null Mice. Endocrinology 148(5):2301-2308.

Walsh, S., F. Mossa, S. T. Butler, D. P. Berry, D. Scheetz, F. Jimenez-Krassel, R. J. Tempelman, F. Carter, P. Lonergan, and A. C. Evans. 2014. Heritability and impact of environmental effects during pregnancy on antral follicle count in cattle. J. Dairy Sci. 97(7):4503-4511.

SBTE 001 Fisiologia da reprodução do macho e tecnologia do sêmen

Alterações morfológicas das células espermáticas de garanhões da raça nordestina após descongelamento

Maria Alice Maranhão Santos; Adriana Gradela; Elenice Andrade Moraes
[1]*Univasf.*

Palavras-chave: Equino; defeitos maiores; defeitos menores

A despeito de sua importância para a região Nordeste do Brasil, a raça Nordestina está reduzida a uns poucos animais, tornando os estudos sobre características seminais, resposta à criopreservação e fertilidade pós-descongelação necessários para os programas de preservação da raça. Este estudo avaliou a morfologia espermática pós-descongelação em garanhões da raça Nordestina visando estimar sua fertilidade e viabilidade para comercialização. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Experimental em Humanos e Animais (CEDEP) da UNIVASF (Protocolo nº 0006/161012). Foram avaliados 19 ejaculados de dois garanhões (N= 10 e N= 9 ejaculados, respectivamente), clinicamente saudáveis, férteis e com média de 9,5 anos. Dois dias após o término do esgotamento das reservas espermáticas extragonadais os ejaculados foram coletados, diluídos (1:1) com Botu-Semen® (Biotech Botucatu, Botucatu, SP, Brasil), mantidos a 37ºC e encaminhados ao CPSENS protegidos da luz, onde foram centrifugados em tubos cônicos (50 mL) a 2200 rpm por 15 min. Os sobrenadantes foram descartados e os peletes resuspendidos no Botu-crio® (Biotech Botucatu, Botucatu, SP, Brasil) até a concentração de 10^6 espermatozoides por mL e avaliados quanto a motilidade total (MT) e progressiva (MP) no CASA. Cada ejaculado apresentou MT >70,0% e foi congelado pelo método tradicional e armazenado à -196ºC. Após descongelação em banho-maria a 37°C, por trinta segundos, uma alíquota de 10 µL de sêmen foi adicionada a 1,0 mL de formol-salino tamponado, aquecido a 37°C, e estocada à temperatura ambiente para análise da morfologia espermática pelo método da câmara úmida. Uma gota desta mistura foi colocada entre lâmina e lamínula e 200 células foram avaliadas no aumento de 1000x em microscópio de contraste de fase. Os defeitos espermáticos totais foram subdivididos em defeitos maiores e menores (CBRA 2013). A média do percentual total de defeitos foi 5,86 ± 4,22%, sendo a média dos defeitos maiores de 2,12 ± 1,93% e de defeitos menores 3,74 ± 2,29%. Os defeitos maiores se dividiram em: cauda fortemente dobrada (4,14 ± 2,31%), gota citoplasmática proximal (2,58 ± 1,63%), cabeça isolada (1,69 ± 1,49%), acrossoma incompleto (1,31 ± 1,19%) e cauda dobrada com gota (0,89 ± 0,82%). Os defeitos menores foram cauda dobrada simples (5,14 ± 1,93%), cabeça delgada (4,58 ± 2,09%), cabeça alongada (3,86 ± 1,78%) e gota citoplasmática distal (1,39 ± 1,34%). Os resultados indicam que os ejaculados analisados destes garanhões da raça Nordestina apresentam excelente qualidade morfológica.

Agradecimentos: À FACEPE (APQ-1072-5.04/12), UNIVASF.

SBTE 002 Fisiologia da reprodução do macho e tecnologia do sêmen

Avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal e do potencial mitocondrial de espermatozoides bovinos criopreservados com ou sem a presença do plasma seminal

Suzane Peres Campanholi[1]; Fabio Morato Monteiro[2]; Claudia Cristina Paz[2]; Erika Aline Ribeiro Dias[2]; José Antonio Junior Dell`Aqua[3]; Frederico Ozanam Papa[3]; Camila Paula Freitas-Dell`Aqua[3]; Guilherme Fazan Rossi[1]
1.FCAV/UNESP; 2.Centro Apta Bovinos De Corte; 3.FMVZ/UNESP.

Palavras-chave: Centrifugação; filtragem; nelore

As taxas de sobrevivência espermática pós-criopreservação não são ótimas para a maioria das espécies. Em bovinos, em média, cerca da metade de todos os espermatozoides são danificados ou destruídos pela congelação, limitando a total eficácia da preservação de sêmen. Por consequência, novas estratégias de criopreservação são necessárias para aumentar o número de espermatozoides vivos e a qualidade destes pós-descongelação. Uma das estratégias muito utilizada em diversas espécies é a retirada do plasma seminal antes da criopreservação, que pode ser feita por centrifugação ou filtragem do sêmen. Com isso, o objetivo deste estudo foi avaliar a integridade das membranas plasmática e acrossomal e o potencial mitocondrial dos espermatozoides de sêmen criopreservado de 38 touros Nelore com ou sem a presença do plasma seminal. Após a colheita pelo método de eletroejaculação, o sêmen obtido foi fracionado em três alíquotas iguais e realizado os tratamentos conforme Campanholi et al. (VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica (CIIC), Campinas, São Paulo, Brasil, 2013, p.1-8). O tratamento T1 (Tradicional) constitui-se na diluição do semên para a concentração final de $60x10^6$ espermatozoides/mL com o diluidor BotuBov® (BotuPharma®, Botucatu, Brasil). O tratamento T2 (Centrifugado) envolveu a centrifugação por 10 minutos a 600xg (2200 rpm) para a remoção do plasma seminal. O tratamento T3 (Filtrado) se caracterizou pela filtração do sêmen pelo dispositivo Sperm Filter® (BotuPharma®, Botucatu, Brasil). Após a centrifugação e filtração do sêmen, os espermatozoides foram ressuspendidos com diluidor BotuBov® na mesma concentração do tratamento T1. Após os tratamentos o sêmen foi envasado à temperatura ambiente em palhetas de 0,5 mL e congelado utilizando a máquina TK 4000® (TK®, Uberaba, Brasil). Para avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal foram utilizadas as sondas iodeto de propídio (Sigma®), FITC-PSA (Sigma®) e Hoescht 33342 (Sigma®) e para avaliação do potencial mitocondrial a sonda JC-1 (Molecular Probes®) e H33342. As análises foram realizadas por citometria de fluxo através do equipamento BD® LSR II (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) e os dados foram avaliados pelo programa BD FACSDiva™ Software v6.1. As análises estatísticas foram feitas no PROC GLM do SAS. Foi considerado nível de significância de 5% de probabilidade. O T2 e T3 apresentaram maior porcentagem de células com membranas plasmática e acrossomal lesionadas (T1=30,61±0,98, T2=38,46±0,98 e T3=39,34±0,98; P<0,05). Não houve diferença entre os tratamentos quanto à porcentagem de espermatozoides com alto (T1=24,28±1,68, T2=28,22±1,68 e T3=27,38±1,68; P=0,23) e baixo (T1=33,32±2,06, T2=34,03±2,06 e T3=33,70±2,06; P=0,97) potencial mitocondrial. Com isso, foi concluído que a remoção do plasma seminal aumentou a porcentagem de lesão em membranas plasmática e acrossomal.
Agradecimentos: FAPESP nº 2012/05555-8, 2014/11304-3 e BotuPharma®.

SBTE 003 Fisiologia da reprodução do macho e tecnologia do sêmen

Avaliação de sistemas de refrigeração na cinética espermática e integridade de membrana plasmática e acrossomal de sêmen bovino

Erika Aline Ribeiro Dias[1]; Fabio Morato Monteiro[1]; Suzane Peres Campanholi[2]; Guilherme Fazan Rossi[2]; Mariana Furtado Zorzetto[3]; Frederico Ozanam Papa[3]; José Antonio Junior Dell`Aqua[3]; Maria Eugenia Zerlotti Mercadante[1]
1.Instituto De Zootecnia; 2.FCAV/UNESP; 3.FMVZ/UNESP.

Palavras-chave: Casa; nelore; qualidade espermática

Uma das principais etapas no processo de criopreservação do sêmen é a curva de refrigeração. O ritmo de refrigeração pode diminuir o choque térmico e seus danos às células espermáticas, e melhores resultados na criopreservação podem ser obtidos utilizando curvas de refrigeração mais lentas e homogêneas. Neste contexto, o objetivo do trabalho foi confrontar simultaneamente diferentes sistemas de refrigeração de sêmen bovino e avaliar seus efeitos na qualidade espermática. Foram utilizados 38 ejaculados pertencentes a 12 touros da raça Nelore com 3,02 ± 0,5 anos de idade, 631 ± 119 kg de peso corporal e 33,8 ± 1,89 cm de perímetro escrotal, colhidos por meio de eletroejaculador. Os ejaculados foram diluídos em meio de fração única BotuBov® (Botupharma®, Botucatu, Brasil) para concentração final de $60x10^6$ sptz/mL. Após a diluição, foram envasados em palhetas de 0,5 mL e refrigerados por 5 horas em 5 diferentes sistemas de refrigeração: Sistema 1 [S1, curva de resfriamento de 0,25ºC/minuto na máquina de congelar TK 4000® (Tetakon®, Uberaba, Brasil)]; Sistema 2 [S2, curva de resfriamento de 0,5ºC/minuto na máquina de congelar TK 4000®]; Sistema 3 [S3, refrigerador Minitube® (Minitüb®, Tiefenbach, Alemanha)]; Sistema 4 [S4, BotuTainer® (Botupharma®, Botucatu, Brasil)], e Sistema 5 [S5, refrigerador doméstico comum]. A cinética espermática foi realizada pelo CASA (Sistema de análise computadorizada de sêmen - IVOS® versão 14) em dois momentos: no sêmen diluído (sem glicerol) antes da refrigeração (S0) e após 5 horas de refrigeração nos 5 tratamentos. As variáveis avaliadas foram: motilidade total (MOT), motilidade progressiva (PROG) e rápidos (RAP). Para a avaliação da integridade de membrana plasmática e acrossomal foi utilizada associação das sondas fluorescentes: Iodeto de Propídio e Diacetato de 6-carboxiflurescéína (Sigma®, St Louis, USA). Os dados foram submetidos à análise de variância pelo proc MIXED (SAS Inst., Cary, USA), e a significância foi declarada quando P<0,05. Foi observada diferença dos 5 sistemas de refrigeração na cinética espermática e na integridade de membrana plasmática e acrossomal quando comparada com o sêmen avaliado antes da refrigeração (S0) (P<0,001), mas não foi observada diferença entre os tratamentos após a refrigeração. Para MOT, os resultados obtidos em cada tratamento foram: S0=88,2; S1= 82,0; S2=81,1; S3=78,6; S4=79,8; e S5=78,7 (± 2,60). Para PROG: S0=70,7; S1=54,8; S2=56,9; S3=56,9; S4=57,0; e S5=57,2 (± 3,48). Para RAP: S0=84,6; S1=79,4; S2=78,9; S3=75,7; S4=77,2; e S5=76,0 (± 2,64). Para lesão de membrana plasmática e acrossomal, os resultados obtidos foram: S0=46,2%; S1=52,9%; S2=53,5%; S3=55,3%; S4=54,6%; e S5=58,2% (± 6,27%). Não há diferença entre os 5 sistemas de refrigeração avaliados na cinética espermática e na integridade de membrana plasmática e acrossomal, após 5 horas de refrigeração.

SBTE 004 Fisiologia da reprodução do macho e tecnologia do sêmen

Avaliação termográfica escrotal e qualidade seminal de touros bubalinos *(Bubalus bubalis)* mantidos em ambiente tropical úmido

Daniel Vale Barros[1]; Lílian Ximenes Silva[1]; Priscila Reis Kahwage[1]; Aluízio Otávio Silva[1]; André Guimarães Silva[1]; Irving Montanar Franco[1]; Lucieta Guerreiro Martorano[2]; José De Brito Lourenço Junior[1]; Narian Romanello[1]; Alexandre Rossetto Garcia[3]
1.Universidade Federal Do Pará; 2.Embrapa Amzônia Oriental; 3.Embrapa Pecuária Sudeste.

Palavras-chave: Andrologia; termografia infravermelha; búfalo

O objetivo foi avaliar as temperaturas de superfície de globo ocular e de escroto de búfalos domésticos por termografia infravermelha, monitorar sua qualidade seminal ao longo do tempo e correlacioná-las a índices bioclimatológicos de conforto térmico. O ensaio foi realizado em região de clima tropical úmido, de abril a agosto de 2013, com médias de temperatura máxima diária de 31,5±0,8ºC, e umidade relativa do ar de 81,3±3,8%. Dez touros búfalos (Bubalus bubalis; n=10) foram mantidos em Central de Inseminação Artificial (Cebran/UFPA, Castanhal-PA) e avaliados a cada 25 dias, de manhã (06h00-09h00) e de tarde (12h00-15h00), quanto às temperaturas retal (TR, ºC) por termometria, e de superfície do globo ocular (GLO, ºC) e escroto (ESC, ºC) por termografia infravermelha. As colheitas de sêmen foram realizadas semanalmente por vagina artificial e o sêmen foi avaliado quanto ao volume, concentração, turbilhonamento, vigor, motilidade progressiva, morfologia espermática e integridade de membrana plasmática, pela técnica de eosina-nigrosina. Os dados climatológicos foram ininterruptamente monitorados e foram calculados o Índice de Temperatura e Umidade (ITU) e o Índice de Conforto de Benezra (ICB). As variáveis com distribuição não normal foram transformadas para escala logarítmica. Foi realizada análise de variância pelo GLM do SAS, versão 9.3 (SAS, 2011). Considerou-se no modelo os efeitos de turno (manhã e tarde) e de mês (abril a agosto). Para as comparações de médias entre turnos usou-se o teste F e para comparação múltipla das médias mensais adotou-se o teste de Tukey. As correlações foram calculadas pelo Teste de Pearson. Em todas as análises, foi adotado P<0,05. O ITU foi sempre ≥78, com diferença entre turnos (P<0,05). Já o ICB médio mensal dos animais variou de 1,96 a 2,25, com diferenças ao longo dos meses e entre turnos (P<0,05). As temperaturas médias observadas foram TR=38,2±0,5ºC, GLO=36,1±0,8ºC, e ESC=33,3±1,1ºC, as quais variaram ao longo dos meses e entre turnos (P<0,05). O turbilhonamento e o vigor espermático apresentaram diferença significativa (P<0,05), com decréscimo nos meses mais quentes e de maior ITU. Os defeitos espermáticos totais oscilaram entre 17,6±6,2% e 21,2±8,2%, mas sem diferenças significativas (P>0,05). O ITU apresentou correlações positivas com GLO (0,72) e ESC (0,41) (P<0,0001), enquanto o ICB apresentou correlação positiva com ESC (0,25; P<0,0001). Correlação negativa e significativa foi encontrada entre ITU e integridade de membrana plasmática dos espermatozoides (-0,17; P<0,05). Portanto, as temperaturas superficiais dos animais e a qualidade seminal estão associadas às oscilações de temperatura e umidade do ar e sofrem interferências das variações climáticas, justificando a necessidade de conferir conforto térmico aos animais para elevação da qualidade seminal.
Agradecimento: Embrapa (Biotec #01.13.06.001.05.01, Pecus # 01.10.06.001.07.03), Universidade Federal do Pará (CEBRAN e LADEC), CAPES e CNPq.

SBTE 005 Fisiologia da reprodução do macho e tecnologia do sêmen

Capacidade de termólise testicular de ovinos morada nova submetidos a teste de termotolerância ao calor: resultados preliminares

Priscila Reis Kahwage[1]; Sergio N. Esteves[2]; Manoel A.C Jacinto[2]; Rui Machado[2]; Messy Hannear De Andrade Pantoja[3]; Narian Romanello[3]; Leticia F. Passeri[2]; Caio A Volante[4]; Kaue Mahlmeister[2]; Alexandre Rossetto Garcia[2]
1.Universidade Federal Do Pará; 2.Embrapa Pecuaria Sudeste; 3.Universidadefederal Do Pará; 4.Universidade Camilo Castelo Branco.

Palavras-chave: Andrologia; termorregulação; ovinos deslanados

O objetivo do trabalho foi avaliar a capacidade de termorregulação da bolsa testicular de ovinos Morada Nova, submetidos ao teste de tolerância ao calor, com uso da termografia de infravermelho como ferramenta para análise. O estudo foi conduzido no período de janeiro a fevereiro de 2015, na unidade experimental da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos-SP, região de clima tropical de altitude (Cwa de Köppen), caracterizado como tropical de altitude. Para verificar suas respostas termolíticas, sete machos adulto da raça Morada Nova foram submetidos ao teste de tolerância ao calor (Baccari Júnior et al. 1986, Reunião Anual da Sociedade de Zootecnia, 23, p. 316), o qual consistiu na avaliação durante três períodos distintos (T1, T2 e T3), com exposição animal à sombra e ao sol. Em T1, os animais foram mantidos à sombra por duas horas (11h00 às 13h00), em seguida, os mesmos foram expostos à radiação solar direta, durante um período de uma hora de desafio (13h00 às 14h00), caracterizando T2. Em T3, os animais retornaram à sombra, onde permaneceram por uma hora (14:00 às 15:00). Ao final de cada um dos três períodos, foram aferidas as temperaturas retais (ºC), com auxílio de termômetro clínico, e temperaturas superficiais (ºC), quais sejam, temperatura de polo dorsal (TPD), temperatura de polo ventral (TPV) e temperatura testicular média (TTM). Foram calculados os gradientes de temperatura entre os polos dorsal e ventral (GDV) e entre a temperatura retal e testicular média (GRT). As referidas mensurações foram realizadas com termógrafo de infravermelho (Testo875i, Testo®, Lenzkirch, Alemanha). A análise estatística foi composta de avaliação da normalidade dos dados, seguida da análise de variância (ANOVA). Foram avaliados os efeitos de período, sendo os resultados expressos em média±DP. O nível de significância adotado foi de 5%. As temperaturas retal e de superfície testicular aferidas em T2 (TR=39,0±0,3ºC, TPD=34,0±1,2ºC, TPV=33,5±1,4ºC, TTM=34,0±1,1ºC e GRT=4,9±1,0ºC) foram significativamente mais elevadas que as observadas em T1 (TR=38,3±0,3ºC, TPD=33,0±0,3ºC, TPV=32,1±1,0ºC, TTM=32,6±1,0ºC e GRT=5,7±0,9ºC) e em T3 (TR=38,4±0,3ºC, TPD=32,5±1,8ºC, TPV=31,4±2,0ºC, TTM=32,1±1,7ºC e GRT=6,3±1,6ºC). Assim, não houve diferença estatística entre os valores observados nos períodos pré e pós desafio. Somente o gradiente entre polos testiculares (GDV) apresentou comportamento diferenciado das demais, com diferença estatística entre T2 (0,48±0,63ºC) e T3 (1,1±0,79ºC). Esses resultados demonstram a eficiência termorregulatória de ovinos Morada Nova, uma vez que, mesmo após submissão à situação de estresse calórico, suas temperaturas testiculares superficiais são retomadas ao padrão basal observado previamente ao desafio. Isso garante a manutenção do gradiente fisiológico de temperatura entre o núcleo corpóreo e os testículos, vital para a normalidade da espermatogênese.

SBTE 006 Fisiologia da reprodução do macho e tecnologia do sêmen

Cellrox deep red® é eficiente para detecção de estresse oxidativo em espermatozoide bovino: estudos preliminares

Maíra Rodrigues Bianchi-Alves[1]; Sâmara Cristine Costa Pinto[2]; Diego Santos Almeida[2]; Rubens Paes De Arruda[1]; Andre Furugen Cesar De Andrade[1]; Eneiva Carla Carvalho Celeghini[1]
1.FMVZ/USP; 2.UEMA.

Palavras-chave: Sondas fluorescentes; sêmen; espécies reativas de oxigênio

As espécies reativas de oxigênio (EROS) são produzidas fisiologicamente pela célula espermática sendo a criopreservação capaz de aumentar esta produção, o que faz com que muitos diluidores possuam agentes antioxidantes. A sonda CellROX Deep Red® (Molecular Probes) foi validada por nossa equipe para a identificação de EROS em espermatozoides ovinos. Porém, não foi avaliada eficiência em espermatozoides criopreservados de bovinos, sendo este o objetivo do estudo. Para isso foram utilizados ejaculados criopreservados de quatro touros disponíveis comercialmente. Foram descongeladas (37ºC/30 segundos) duas palhetas de cada touro (n=4). A amostra foi centrifugada a 500g/10 minutos para a retirada do sobrenadante (diluidor livre de espermatozoides), armazenado a 5ºC. O precipitado foi suspendido em 200 µL de Tyrode's albumin lactate pyruvate (TALP) e adicionou-se 50 µL de sulfato de ferro e 50 µL de ácido ascórbico mantidos à 37ºC/90 minutos com a tampa do tubo aberta para indução de estresse oxidativo. A amostra foi centrifugada a 500 g/10 minutos. O sobrenadante foi retirado e o precipitado suspendido em 300 µL de TALP. A concentração foi ajustada para $20x10^6$ espermatozoides/mL diluindo uma amostra em TALP (grupo controle) e outra no diluidor armazenado, isso para verificar se a sonda seria capaz de identificar espermatozoides com EROS no grupo controle, visto que no grupo com diluidor provavelmente haveria reversão do estresse oxidativo induzido. Foram adicionados a 200 µL das amostras (controle x diluidor), 4 µL de CellROX Deep Red® 1 mM e 1 µL de Hoescht 33342 0,5 mg/mL (Molecular Probes) e incubadas a 37ºC/30 minutos. As amostras foram centrifugadas a 5000 g/5 minutos, o sobrenadante foi desprezado e as amostras foram suspendidas em 200 µL de TALP. Foi preparada câmara úmida com 4 µL das amostras e foram contadas 200 células por lâmina. As células foram classificadas em ausência ou leve presença de EROS (LEV), nível moderado de EROS (MOD) e nível intenso de EROS (INT). As variáveis LEV e INT foram transformadas e submetidas à análise de variância (ANOVA). Para a variável MOD, foi feita a avaliação por estatística não paramétrica. Foi utilizado o programa SAS (SAS Institute Inc., 2004) e o nível de significância considerado foi de 5%. Após a indução, o controle apresentou menor (p=0,005) número de células LEV (5,0±3,84%) do que o grupo tratado com diluidor (74,87±18,54%). Não houve diferença (p=0,24) entre os grupos controle (68,87±4,14%) e diluidor (24,50±18,26%) no tocante às células MOD. Porém, o grupo controle (26,12±1,86%) apresentou maior (p<0,0001) quantidade de células INT do que o grupo diluidor (0,62±0,31%). Dessa forma, pode-se concluir que a sonda CellROX® é capaz de identificar EROS em espermatozoides bovinos e que a presença de diluidor é capaz de neutralizar essas espécies. Entretanto, mais estudos estão sendo feitos pelo grupo para confirmar a eficiência desta na avaliação de EROS em espermatozoides criopreservados de bovinos.

SBTE 007 Fisiologia da reprodução do macho e tecnologia do sêmen

Centrifugação em camada única melhora motilidade espermática de garanhões após refrigeração a 15ºC

Márcio Menezes Nunes[1]; Fernanda Carlini Cunha Santos[2]; Amauri Anselmo[3]; José Domingos Guimaraes[1]
1.Universidade Federal De Viçosa; 2.Universidade Federal De Pelotas; 3.Médico Veterinário - Cabanha Do Parque.

Palavras-chave: Coloide; espermatozoide; resfriamento

O resfriamento de sêmen equino para transporte e inseminação artificial é um procedimento de rotina na reprodução equina. O armazenamento refrigerado prolonga a vida útil do espermatozoide, no entanto, também pode induzir danos irreversíveis na integridade estrutural, bioquímica e biofísica da célula espermática (Aurich C, Anim Repro Sci, 107:268-275, 2008). Além disso, existe uma considerável variabilidade individual em relação à sobrevivência da célula a este processo. A centrifugação em camada única (SLC) é uma técnica de centrifugação com coloide específico para seleção de espermatozoide com motilidade, membrana íntegra, morfologia normal e cromatina intacta do restante do ejaculado (Morrell JM & Rodriguez-Martinez H, Open Andro J, 1:1–9, 2009), melhorando a qualidade do ejaculado. O objetivo deste experimento foi avaliar o efeito da SLC na motilidade espermática de garanhões após 8h de refrigeração a 15ºC. Durante a estação reprodutiva e após dois dias de repouso sexual, foram coletados ejaculados de dez garanhões da raça Crioula (n=10) com auxílio de vagina artificial e uma égua em estro. Após a coleta, os ejaculados foram filtrados e adicionados de diluente comercial (EquiPlus®, Minitüb GmbH, Tiefenbach – Germany) até a concentração de $50x10^6$ sptz/mL. As amostras foram refrigeradas por 8h a 15ºC e submetidas a dois tratamentos: centrifugação convencional (600G x 20') e SLC (Androcoll Equine®, Minitüb GmbH, Tiefenbach – Germany) (300G x 20'), sendo em ambos os tratamentos, o pellet ressuspendido com o mesmo diluente anteriormente utilizado. A motilidade progressiva (%) foi avaliada por Análise Computadorizada de Movimento Espermático (AndroVision® Minitüb GmbH, Tiefenbach – Germany) em três momentos: 1) após coleta e diluilção, 2) após resfriamento (pré-centrifugação) e 3) após centrifugação e ressuspensão (pós-centrifugação). Foi realizada estatística descritiva e comparação de médias pelo teste Kruskal-Wallis com auxílio do programa Statistix9® ($p<0.05$). Após coleta e diluição, o percentual de motilidade progressiva foi de 68.7±4.2. Após refrigeração, a motilidade espermática reduziu significativamente ($p<0,05$) para 48.7±6.2 (centrifugação convencional) e 49.9±6 (SLC). Não houve diferença após a centrifugação convencional e ressuspensão (45.2±5.6) em comparação ao momento anterior, resultado diferente do obtido com a SLC (58.5±5.7), no qual a média de motilidade pós-centrifugação foi significativamente maior ($p<0,05$) quando comparada ao momento pré-centrifugação. No SLC, não foi observada diferença significativa entre o momento pós-centrifugação quando comparado à motilidade avaliada no momento inicial pré-refrigeração, demonstrando que esta técnica recupera a qualidade do ejaculado pós-refrigeração por eliminar as células lesionadas ao longo do período de estocagem refrigerada . No momento pós-centrifugação, foi observada uma superioridade de 29.4% na motilidade das amostras pós-SLC em relação à centrifugação convencional. Amostras com melhor qualidade espermática pós-refrigeração podem resultar em melhores índices na inseminação artificial de éguas ou serem submetidas a subsequentes procedimentos de preservação. No presente experimento foi demonstrado o efeito benéfico da SLC na motilidade após refrigeração a 15º C por um curto período de tempo.

SBTE 008 Fisiologia da reprodução do macho e tecnologia do sêmen

Comparação da perfusão sanguínea da artéria testicular, dosagem hormonal e qualidade espermática entre carneiros da raça texel e santa inês

Yamê Fabres Robaina Sancler-Silva; Lorenzo Garrido Segabinazzi; Rubia Alves Schimith; Carlos Ramires Neto; Gabriela Mothe; Luis Fernando Mercês Chaves Silva; Endrigo Adonis Braga De Araujo; Sidnei Nunes De Oliveira; Frederico Ozanam Papa; Eunice Oba
UNESP - Botucatu.

Palavras-chave: Doppler espectral; dosagem hormonal; carneiros

Os objetivos do presente estudo foram avaliar e comparar parâmetros testiculares, qualidade seminal e dosagem hormonal entre carneiros das raças Texel e Santa Inês. Para isso, foram utilizados 25 animais (12 Texel e 13 Santa Inês) sadios com idade variando entre 2 e 4 anos, pertencentes ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da UNESP – Botucatu. Inicialmente foi realizada a morfometria testicular (comprimento - COMP e largura – LARG em cm) dos animais através de paquímetro e em seguida o exame ultrassonográfico modo doppler espectral da artéria testicular (índice de pulsatilidade – PI e índice de resistividade – RI) na região do cordão espermático. Posteriormente, uma amostra de sangue de cada animal foi coletada no período da manhã, através de punção da veia jugular externa, para dosagem dos níveis séricos de testosterona (DT em mg/dL) e em seguida realizada a coleta de sêmen através de eletroejaculação. Os parâmetros de cinética espermática foram analisados pelo método computadorizado CASA (%MT- motilidade total, %MP - motilidade progressiva, µm/s VAP - velocidade média de trajeto, µm/s VCL- velocidade curvilinear, µm/s VSL - velocidade linear progressiva e %RAP- espermatozoides rápidos) e a análise de integridade de membrana plasmática (IMP) por microscopia de epifluorescência. Para dosagem de testosterona foram utilizados kits de fase sólida e a análise realizada por radioimunoensaio. Os dados gerados foram avaliados pelo teste t de Student e diferenças foram consideradas significativas quando $p<0,05$. Os valores médios e desvios padrão encontrados para os parâmetros avaliados para as raças Texel e Santa Inês estão colocados a seguir, respectivamente: MT (81±7,4 e 84±17,8); MP (57,4±10,1 e 62,1±17,4); VAP (130,4±19,6 e 131,6±18,3); VCL (195,2±38,1 e 181,0±22,3); VSL (123,4±29,4 e 111,6±8,9); RAP (70,0±10,2 e 74,4±18,3); IMP (64,8±11,4 e 61,2±12,9); COMP testículo esquerdo (9±1,11 e 9,5±1,2); LARG testículo esquerdo (6,2±0,6 e 6,3±0,5); COMP testículo direito (9,1±0,9 e 9,7±1,2); LARG testículo direito (6,1±0,7 e 6,2±0,5); DT (1,08±0,65 e 2,97±5,6); PI testículo esquerdo (0,99±0,27 e 1,16±0,33); RI testículo esquerdo (0,63±011 e 0,68±0,12); PI testículo direito (1,16±0,46 e 1,17±0,47) e RI testículo direito (0,67±0,17 e 0,68±0,16). Em conclusão não houve diferença em nenhum dos parâmetros avaliados entre as raças.

SBTE 009 Fisiologia da reprodução do macho e tecnologia do sêmen

Diferentes desafios espermáticos *in vitro* e sua relação com a fertilidade *in vivo* do sêmen bovino

Leticia Zoccolaro Oliveira[1]; Lucas Bernardes Ribeiro[2]; Fabio Morato Monteiro[3]; Erika Aline Ribeiro Dias[3]; Suzane Peres Campanholi[3]; José Mario Pozetti Filho[4]; Marcelo Zoccolaro Costa[4]; Carla Braga Martins[5]; Clara Slade Oliveira[6]; Halim Atique Netto[2]
1.USP; 2.UNIRP; 3.Instituto De Zootecnia; 4.Agropecuária Sanyo; 5.Universidade Federal Espirito Santo; 6.EMBRAPA.

Palavras-chave: Brangus; desafio laboratorial do sêmen; fertilidade

O objetivo do trabalho foi desafiar laboratorialmente a qualidade do sêmen descongelado e comparar os resultados obtidos *in vitro* com a fertilidade *in vivo*. Foram utilizadas doses de sêmen de 4 diferentes partidas de um mesmo touro Brangus, as quais foram previamente utilizadas em um programa de IATF, no qual foram inseminadas 332 vacas Brangus. Realizou-se 3 repetições da etapa laboratorial para cada partida. Para cada dose de sêmen, adotou-se o seguinte procedimento: inicialmente, a amostra de sêmen foi descongelada à 37ºC por 30 seg (Controle) sendo realizada avaliação de motilidade pelo CASA e de integridade de membrana plasmática pela sonda IP. Em seguida, uma alíquota de 150 µL da amostra foi incubada em banho-maria (bm) a 45ºC por 40 min (Grupo desafio térmico; GDT) e outra alíquota de 150 µL da amostra foi centrifugada a 500 x g, em gradiente de Percoll 45%/90%, por 15 min (Grupo desafio centrifugação; GDC). O sêmen centrifugado foi ainda submetido a um outro desafio térmico, sendo incubado (bm) a 45ºC por 40 min (Grupo centrifugação + desafio térmico; GCDT). Ao final de cada desafio (GDT, GDC e GCDT), os mesmos testes laboratoriais realizados para o grupo controle foram repetidos. Os dados de campo foram analisados pelo GLIMMIX do SAS e os dados laboratoriais por análise de variância pelo GraphPad Instat. Estabeleceu-se grau de significância de 5%. Não foi observada diferença (P>0,05) entre inseminadores, ECC ou partidas (Pt) para taxa de concepção (TC). Os seguintes resultados de TC foram observados para cada partida: Pt1 = 48,9% (44/90); Pt2 = 44,2% (23/52); Pt3 = 55,5% (40/72); Pt4 = 43,2% (51/118). Embora não tenha sido observada diferença estatística entre partidas, houve numericamente maior TC da Pt3 com relação a Pt4. De acordo com os resultados do CASA, foi interessante notar que Pt4 foi a partida que apresentou menores (P<0,05) porcentagens de Motilidade Progressiva (MP) tanto após descongelação (Controle: 47,2 ± 8,5) como após todos os desafios espermáticos (GDT: 40,0 ± 4,6; GDC:45,7 ± 7,3; GCDT: 4,7 ± 7,2) quando comparado a Pt3 (Controle: 63,0 ± 5,3; GDT: 56,0 ± 1,7; GDC: 64,2 ± 12,5; GCDT: 7,7 ± 3,8). Adicionalmente, embora Pt3 e Pt4 tenham apresentado semelhantes percentuais de membrana plasmática íntegra (MPI) no Controle (Pt3 = 66,7 ± 1,3 e Pt4 = 65,2 ± 3,3), o sêmen da Pt3 apresentou maior (P<0,05) porcentagem de MPI (37,2 ± 2,5) do que Pt4 (26,7 ± 3,3) após passar pelo maior desafio *in vitro* do presente experimento (GCDT). De acordo com os resultados obtidos, concluiu-se que a partida 3 se apresentou como o sêmen mais resistente aos desafios laboratoriais propostos, principalmente quando comparado a partida 4. Portanto, o presente estudo sugere que desafiar laboratorialmente as amostras seminais antes de submetê-las aos testes de avaliação seminal parece ser uma alternativa interessante para definir partidas que podem apresentar maior desempenho reprodutivo de fertilidade a campo.
Agradecimentos: FAPESP (2014/07606-4) e Agro SANYO

SBTE 010 Fisiologia da reprodução do macho e tecnologia do sêmen

Efeito da criopreservação na viabilidade e longevidade de espermatozoides do epidídimo de touros expostos ou não ao plasma seminal

Andrielle Mendes Cunha[1]; José Oliveira Carvalho[2]; Margot Alves Nunes Dode[3]
1.UNB; 2.UNESP; 3.EMBRAPA CENARGEN.

Palavras-chave: Cinética; sêmen; bovinos

A recuperação de espermatozoides epididimários, sua criopreservação e seu uso em técnicas de reprodução assistida, é uma ferramenta importante para a multiplicação de material genético de animais que morrem subitamente, ou que apresentam incapacidade reprodutiva adquirida. Entretanto, para que se possa maximizar o seu uso *in vivo* e *in vitro*, um melhor conhecimento sobre o comportamento fisiológico destes espermatozoides é necessário. O objetivo deste estudo foi caracterizar a viabilidade e longevidade de espermatozoides criopreservados da cauda do epidídimo por um período de 24 h. Espermatozoides do ejaculado (EJ) e do epidídimo (EP) foram coletados dos mesmos animais da raça Gir (n=7) e, posteriormente criopreservados. Três grupos foram comparados: espermatozoides do ejaculado (EJ), espermatozoides do epidídimo (EP) e, espermatozoides do epidídimo expostos, após descongelamento, a um pool de plasma seminal por 10 min a 39 ºC (EPP). Espermatozoides dos três grupos foram selecionados em gradiente de Percoll 45:90% e incubados a 39 ºC por 24 h, em meio SP-TALP na concentração de $2x10^6$ espermatozoides/mL. Amostras dos três grupos (EJ, EP e EPP) foram retiradas às 0, 3, 6 e 24 h de incubação e avaliadas quanto à motilidade total (MT) e progressiva [(MP) (CASA)], morfologia (contraste de fase), capacitação espermática (hidroclorido de clortetraciclina-CTC), integridade de membrana plasmática [(IMP) (diacetato de 6-carboxifluoresceína e iodeto de propídio-FDA-IP)] e integridade acrossomal [(IA) (isotiocianato de fluoresceína conjugado à lecitina de amendoim e iodeto de propídio-PNA-FITC-IP)]. Os dados foram analisados usando procedimento GLIMMIX do programa SAS ($P \leq 0,05$). Com o decorrer dos momentos de incubação, todos os grupos apresentaram queda gradual nos parâmetros avaliados. Às 6 h de incubação o grupo EJ apresentou maior queda na MT (33,9±8,8), MP (23,3±8,1), IMP (16,4±3,4), IA (19,9±3,2), e porcentagem de espermatozoides não capacitados (70,3±3,7) em relação aos grupos EP e EPP. Os grupos EP e EPP, às 6 h apresentaram MT (56,7±9,3 e 40,6±9,2), MP (47±9,6 e 35±9,2), IMP (29±4,3 e 28,2±4,2), IA (31,6±3,8 e 31,6±3,8), e porcentagem de espermatozoides não capacitados (80,9±3,5 e 81±3,5) semelhantes àquelas observadas às 0 h. Já as 24 h de incubação, todos os grupos foram semelhantes quanto à MT (EJ 0,5±1,4, EP 9,8±5,7, EPP 10,6±5,9), MP (EJ 0,4±1,3, EP 6,5±4,9 e EPP 8,2±5,5), IMP (EJ 6,7±2,3, EP 10,3±2,8 e EPP 10,7±2,8) e IA (EJ 7,1±2, EP 10,3±2,4 EPP11, 1±2,5). Entretanto, a quantidade de espermatozoides não capacitados foi menor no grupo EJ (68±4,6) quando comparado aos grupos EP (76±3,8) e EPP (80,5±3,5). Pode-se concluir que após o descongelamento, os espermatozoides do epidídimo mantiveram por mais tempo a sua qualidade, mostrando serem mais resistentes, do que os do ejaculado. Além disto, a adição do plasma seminal não afetou a viabilidade e/ou longevidade destes espermatozoides. Apoio financeiro: CNPq (Processo: 474607/2013-5), CAPES e Embrapa.

SBTE 011 Fisiologia da reprodução do macho e tecnologia do sêmen

Efeito da criopreservação sobre a motilidade espermática de garanhões da raça nordestina

Elenice Andrade Moraes; Maria Alice Maranhão Santos; Adriana Gradela
UNIVASF.

Palavras-chave: Casa; cinemática; equino

Estudos mostram que o fator racial interfere diretamente na resistência da célula espermática a criopreservação. Além disso, em alguns garanhões, a baixa qualidade do sêmen congelado parece estar relacionada à presença do glicerol nos meios de congelamento (Alvarenga; Papa 2011, Spermova 1:7-10). Embora a raça Nordestina seja essencial na caatinga, estudos sobre a criopreservação do sêmen de garanhões desta raça são escassos. Objetivou-se analisar a motilidade do espermatozoide de garanhões da raça nordestina após criopreservação. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Experimental em Humanos e Animais da UNIVASF (Protocolo nº 0006/161012). Dezenove ejaculados utilizados de dois garanhões (N= 10 e N= 9 ejaculados, respectivamente) foram coletados através de vagina artificial e com fêmea em estro. Os ejaculados apresentaram aspecto leitoso, coloração branca-acinzentada, odor sui generis, e motilidade espermática total (MT, %) de 80,91 ± 9,29 e progressiva (MP, %) de 59,24 + 11,45. Após coleta, os ejaculados foram diluídos (1:1) com Botu-Semen® (Botupharma, Botucatu, SP), centrifugados em tubos de 50 mL a 2200 rpm durante 15 min, e o pelete resuspenso com Botu-crio® (Botupharma, Botucatu, SP) para determinar a concentração espermática utilizando o fotômetro Spermacue® (Minitube, Berlim, Alemanha). O sêmen diluído foi envasado em palhetas de 0,5 mL e mantido a 5°C por 90 min e em seguida submerso em nitrogênio líquido. O sêmen foi descongelado em banho-maria a 37°C por 30s. A MT e MP foram determinadas utilizando o CASA® (Minitube, Alemanha, Berlim). Alíquotas (8 µL) do sêmen descongelado foram retiradas, colocadas entre lâmina e lamínula, pré-aquecidas a 37°C, e avaliadas quanto a motilidade espermática. Os dados foram analisados através da ANOVA e teste de SNK ($P<0,05$; SAEG, UFV 1997). A MT e MP após descongelação do sêmen foi de 34,08 + 12,57 e 20,53 + 12,82, respectivamente. Resultados preliminares indicam que os garanhões da raça Nordestina analisados apresentam sêmen de boa congelabilidade e mantiveram os parâmetros de motilidade espermática total e progressiva após a criopresevação.
Agradecimentos: À FACEPE (APQ-1072-5.04/12), UNIVASF.

SBTE 012 Fisiologia da reprodução do macho e tecnologia do sêmen

Efeito do choque térmico sobre a motilidade e o citoesqueleto de espermatozoides de bovinos

Bárbara Do Do Carmo Simões Da Silva[1]; Daniela Franco Da Silva[2]; Thaís Alves Rodrigues[1]; Fabiola Freitas De Paula Lopes[1]
1.Universidade Federal De São Paulo; 2.Universidade Estadual Paulista "Julio De Mesquita Filho".

Palavras-chave: Espermatozoide; choque térmico; imunofluorescência

O estresse térmico em touros causa aumento da temperatura escrotal e testicular, reduzindo a qualidade do sêmen, a motilidade e a capacidade fecundante do espermatozoide. Uma vez que as alterações na motilidade espermática estão associadas diretamente à organização das proteínas do citoesqueleto, o objetivo deste estudo foi determinar o efeito do choque térmico sobre a motilidade e a organização do citoesqueleto em espermatozoides bovinos. Para tanto, foi utilizado um pool de três palhetas de sêmen *Bos indicus* por réplica (N= 6 réplicas). O sêmen foi purificado em gradiente de percoll e a amostra (1 x 10^6 espermatozoides/mL) submetida a determinação da motilidade espermática e a imunofluorescência para localização dos microtúbulos e do motor molecular dineína imediatamente após o gradiente de percoll (Controle 0 hora) e após incubação em SP-TALP nas temperaturas Controle (38,5 °C) e Choque Térmico (41 °C) por 4 horas. A motilidade espermática foi avaliada a cada hora durante o período de incubação. As amostras do Controle 0 hora e após as 4 horas de incubação foram processadas com anticorpo anti-α-tubulina mouse IgG monoclonal, anti-dineína citoplasmática rabbit IgG policlonal, Alexa Fluor 488®, Alexa Fluor 555® e Hoechst 33342 para localização dos microtúbulos, dineína e DNA espermático. A localização morfológica e a intensidade de pixel para tubulina (N= 600 espermatozoides/tratamento) e dineína (N= 300 espermatozoides/tratamento) foram determinadas com o programa Image J. Os dados não paramétricos foram avaliados pelo teste de Wilcoxon do pacote estatístico SAS. A motilidade espermática do grupo 0 hora (não incubado) foi mais alta que todos os demais grupos (73,12 + 3,6%, P< 0,05). A incubação de espermatozoides a 38,5 °C afetou (P< 0,05) a motilidade nos diferentes momentos de incubação (68,12 + 3,6%, 53,75 + 3,6%, 41,25 + 3,6% e 27,12 + 3,6% para 1, 2, 3 e 4 horas, respectivamente). Similarmente, a incubação de espermatozoides a 41°C reduziu a motilidade ao longo do tempo (52,5 + 3,6%, 43,75 + 3,6%, 20,62 + 3,6% e 3,62 + 3,6% para 1, 2, 3 e 4 horas, respectivamente). O Choque Térmico de 41°C reduziu (P< 0,05) a motilidade espermática em relação ao Controle 38,5°C em todos os tempos de incubação. A proteína tubulina foi localizada na região de inserção da cauda e ao longo da cauda do espermatozoide. A intensidade de pixel da tubulina aumentou (P< 0,01) com a incubação e a temperatura (13,6 ± 0,29; 15,2 ± 0,28, 15,4 ± 0,28 unidades arbitrárias (UA) para os tratamentos 0 hora, 38,5°C e 41°C, respectivamente). A proteína dineína foi localizada por toda a célula espermática. De maneira similar, a intensidade de pixel da dineína aumentou (P< 0,0001) com a incubação (4,2 ± 0,5; 26,8 ± 0,5; 26,2 ± 0,5 UA para os tratamentos 0 hora, 38,5°C e 41°C, respectivamente). Concluiu-se que a incubação e o aumento da temperatura reduz a motilidade espermática e altera o padrão de organização das proteínas do citoesqueleto em espermatozoides bovinos.

SBTE 013 Fisiologia da reprodução do macho e tecnologia do sêmen

Efeitos da concentração de testosterona plasmática e de proteína total do plasma seminal sobre os parâmetros espermáticos de touros doadores de sêmen da raça nelore

Renata Barbosa Faria[1]; Renata Sanches Calegari[2]; Fernanda Nunes Marqui[2]; Diego Gouvêa Souza[2]; Tairini Erica Cruz[3]; Alício Martins Jr[3]
1.FMVA-UNESP; 2.FMVZ; 3.FMVA.

Palavras-chave: Testosterona; plasma seminal; proteína total

Pesquisas objetivando relacionar a concentração de testosterona (T) e as frações proteicas do plasma seminal (PS) são comuns, especialmente aquelas relacionadas com a produção e congelabilidade do sêmen, respectivamente. Contudo, poucos estudos têm procurado estabelecer uma associação entre T ou proteína total (PT) do PS e as variáveis do sêmen, comumente utilizadas para avaliar a qualidade do ejaculado em Centros de Coleta e Processamento de Sêmen. Assim, o objetivo deste estudo foi verificar a influência da T plasmática e da PT do PS sobre os parâmetros espermáticos de touros doadores de sêmen. No total, 40 ejaculados, de oito touros da raça Nelore, foram coletados através de vagina artificial. As amostras seminais foram avaliadas quanto à motilidade (M, %), vigor (V, 0-5), concentração (C; espermatozoides/mL) e morfologia espermática (%; defeitos maiores [DM], menores, [Dm] e normais [N]), antes da congelação. O plasma seminal foi obtido através de centrifugação do sêmen a 700 x g/10 min. O sangue (cinco amostras por animal) foi coletado imediatamente após a coleta do sêmen, através de punção venosa na jugular. Amostras de T e a PT (mantidas a -86º C até o momento da dosagem) foram mensuradas utilizando "kits" comerciais (DPC- Diagnostic Products Co®., EUA e Pierce, EUA, respectivamente), conforme instruções do fabricante. Os resultados de T e de PT foram expressos em valores da média±desvio padrão. O coeficiente de correlação de Spearman foi utilizado para verificar possíveis correlações entre as variáveis espermáticas e T e, ainda, PT, com P<0,05 aceito como significativo. Dados de T e de PT foram de 684,46±212,01 e de 37,30±1,7, respectivamente. Correlações significativas apenas foram observadas entre PT e as variáveis espermáticas, tais como: vigor (r = 0,3818; p<0,015), DM (-0,5004; p<0,001), Dm (r = -0,3240; p<0,041) e N (r = 0,443; P<0,005). Por outro lado, houve tendência de correlação entre PT e M (r = 0,266; p<0,08). Porém, nenhuma correlação significativa foi constatada entre as variáveis espermáticas e a concentração de T. Concluindo, sob as condições experimentais adotadas, a concentração de PT no PS foi efetiva em determinar melhores resultados de qualidade espermática para variáveis importantes (V, DM, Dm e N), sugerindo que a PT atue como agente modulador dessas variáveis, através de um mecanismo ainda não estabelecido. Contudo, outros experimentos, com maior número de animais, precisam ser efetuados para confirmação desses achados, os quais podem levar à determinação de marcador útil para monitorar a qualidade de touros doadores de sêmen.

SBTE 014 Fisiologia da reprodução do macho e tecnologia do sêmen

Eficácia da água destilada para o teste hiposmótico em sêmen congelado de ovino

Walkíria M Barreto; Rodrigo Freitas Bittencourt; Mariana Santos Ribeiro De Barros; Edivânia Oliveira De Jesus; Antonio De Lisboa Ribeiro Filho; Marcos Chalhoub; Fernando De Lima Cardoso; Jéssica De Jesus Pinheiro; Tiago Oliveira Brandão; Alair Daiana Da Paixão Sampaio
Universidade Federal Da Bahia.

Palavras-chave: Ovino; sêmen congelado; teste hiposmótico

O hipoosmotic swelling test (HOST) tem sido utilizado como protocolo de avaliação da viabilidade espermática de diversas espécies; entretanto, a utilização da água destilada como solução hiposmótica ainda não foi padronizada para espécie ovina. Como também, não foi comparada a eficácia da água destilada e de soluções hiposmóticas consagradas, como a de citrato-frutose. O objetivo deste estudo foi analisar a reatividade da célula espermática pós-descongelação de ovinos da raça Santa Inês e Dorper, em solução hiposmótica de água destilada e solução citrato-frutose (100mOsmol/L), ambas com diferentes taxas de diluição. Para este estudo foram utilizadas 30 amostras de sêmen (20 reprodutores Santa Inês e 10 Dorper). Após descongeladas as amostras foram avaliadas quanto a cinética espermática (motilidade total-MT, motilidade progressiva-MP, vigor espermático-VIG). Alíquotas foram coletadas para realização do teste supravital com corante eosina (EOS) e observação da morfologia espermática, classificando-se separadamente o percentual de caudas dobradas (CD).O HOST com citrato-frutose seguiu a seguinte diluição: uma parte de sêmen para 10 (HOST G1), 20 (HOST G2) e 50 (HOST G3) partes de solução. As mesmas proporções foram mantidas para a água destilada como a seguir: uma parte de sêmen para 10 (HOST G4), 20 (HOST G5) e 50 (HOST G6). O percentual de espermatozoides reativos ao choque osmótico foi determinado através da subtração do percentual de espermatozoides com cauda dobrada, verificados após o HOST, do obtido na morfologia espermática logo após a descongelação. Estas avaliações foram feitas em microscopia de contraste de fase com aumento de 1000x e contagem de 100 espermatozoides por grupo. Para a análise estatística das características avaliadas, foi empregado o pacote estatístico Statistical Analysis System (SAS), versão 5.0 (1996) (Procedimento MEANS e GLM – teste SNK, com P<0,05). O valores encontrados pós-descongelação foram para motilidade total: 63,3%; motilidade progressiva: 58,3%; vigor: 3,1; percentual de caudas dobradas: 18,4%; espermatozoides viáveis pelo supravital: 42,9% e HOST: 32,4%. As médias obtidas do teste hiposmótico foram: HOST G1 (36,1%); HOST G2 (34,5%); HOST G3 (34,6%); HOST G4 (27,2%); HOST G5 (30,0%) e HOST G6 (32,2). Apesar da variação numérica observada entre os grupos de HOST, estas não diferiram significativas (P>0,05). Os resultados obtidos demonstram que o HOST com água destilada é eficaz e pode ser empregado para a avaliação da viabilidade do sêmen ovino pós-descongelação.

SBTE 015 Fisiologia da reprodução do macho e tecnologia do sêmen

Estimativa da capacidade fecundante de espermatozoides de catetos (*Pecari tajacu*) por análise de interação com oócitos suínos

Lívia Batista Campos; Ana Liza Paz Souza; Alexsandra Fernandes Pereira; Alexandre Rodrigues Silva
LCGA - UFERSA.

Palavras-chave: Sêmen; porco-do-mato; tayassu tajacu

Os testes convencionais que avaliam a qualidade seminal não possuem a capacidade de mensurar o potencial fertilizante de uma amostra. Os objetivos deste trabalho foram determinar a capacidade de espermatozoides de catetos (Pecari tajacu) em promover interações com oócitos suínos recuperados de folículos antrais, bem como identificar relações entre essas interações e parâmetros espermáticos. Para tanto, um total de 11 ejaculados provenientes de indivíduos adultos coletados por eletroejaculação foram avaliados quanto à motilidade, vigor, viabilidade, morfologia, parâmetros cinéticos por análise computadorizada (CASA), integridade e funcionalidade da membrana. Além disso, as 11 amostras de sêmen foram analisadas pelo teste de interação *in vitro* com oócitos suínos a 38,5°C e a 5% de CO_2, por 18 h. Após esse período, os oócitos foram lavados e marcados com Hoechst 33258 (10 µg/mL) e visualizados sob microscopia de fluorescência. A estimativa da capacidade fecundante foi analisada de acordo com o número de espermatozoides ligados e/ou penetrados à zona pelúcida. Todos os dados foram expressos como média ± SD e um modelo de regressão linear simples foi usado para identificar a associação entre interações espermatozoide-oócitos (variável dependente) e parâmetros espermáticos (variável independente). Assim, verificou-se que as médias dos parâmetros seminais, determinadas por análises convencionais e CASA, estavam de acordo com a espécie. No teste de interação *in vitro*, foi verificado que todos os oócitos avaliados (100%) apresentaram espermatozoides ligados à zona pelúcida, mas apenas 19,9 ± 5,5% dos oócitos apresentaram espermatozoides penetrados. Adicionalmente, verificou-se uma média de 39,4 ± 4,6 espermatozoides ligados/oócito e 2,5 ± 0,7 espermatozoides penetrados/oócito. Possivelmente, a composição da zona pelúcida de suínos seja similar a composição da zona pelúcida dos catetos, sugerindo que oócitos suínos podem ser utilizados como substrato heterólogo em avaliações de penetração espermática *in vitro* em catetos. Dentre as características espermáticas, apenas o índice de progressão espermática – STR apresentou associação com o número de espermatozoides ligados ($R = 61,7\%$; $P < 0,05$). Esse parâmetro é marcado por espermatozoides progressivos, indicando hiperativação e, possivelmente, tais características estão relacionadas com a fertilidade. Em conclusão, o teste de interação *in vitro* utilizando oócitos suínos não apresenta relações marcantes com as características espermáticas avaliadas rotineiramente em catetos. Outros estudos são necessários para viabilizar o uso de substratos heterólogos como indicador preciso da fertilidade na espécie.
Agradecimento: CAPES

SBTE 016 Fisiologia da reprodução do macho e tecnologia do sêmen

Estudo comparativo da qualidade seminal em cães de companhia e trabalho da raça australian cattle dog

Pamela Cristina Batista Gomes[1]; Graziela Martins De Souza Luciano[1]; Joice Caroliny Candeias[1]; Julio Cesar Carvalho Balieiro[2]; Priscila Carvalho De Oliveira[1]
1.UNIFEOB; 2.USP.

Palavras-chave: Australian cattle dog; cão; sêmen

O objetivo deste estudo foi de avaliar características seminais em cães da raça Australian Cattle Dog. Os animais foram divididos em dois grupos: Grupo I (GI) animais de companhia que não exercem atividades físicas regulares (N1=4) e Grupo II (GII) animais utilizados diariamente em trabalhos de manejo animal (pastoreio), em propriedades rurais (N2=3). Foram avaliados dados de biometria testicular e características seminais dos sete cães e foram avaliados três ejaculados de cada animal, totalizando 21 ejaculados. A colheita do sêmen foi realizada por meio de manipulação digital, sendo utilizada somente a segunda fração do ejaculado para a avaliação. Os ejaculados foram avaliados quanto às características macroscópicas: volume (VOL) e microscópicas: motilidade progressiva (MOT), vigor (VIG), concentração (CONC) e morfologia espermática (MORF). Para biometria testicular foram realizadas medidas de circunferência escrotal (CE), comprimento de testículo direito (CTD) e esquerdo (CTE) e largura de testículo direito (LTD) e esquerdo (LTE), com auxílio de uma trena e paquímetro, respectivamente. A média e desvio padrão para as variáveis peso e idade dos animais foram de 22,18±3,43 kg e 4,57±2,63 anos, respectivamente. Para a avaliação das variáveis relacionadas às características seminais utilizou-se o modelo estatístico que contemplou o efeito fixo de grupo (GI vs. GII), além dos efeitos aleatórios de animal e resíduo. As análises foram realizadas considerando estrutura de medidas repetidas nos mesmos animais, sendo utilizado o procedimento PROC MIXED do programa SAS (SAS Inc, 2004). Para a variável CONC, os dados foram submetidos à transformação logarítmica. Para as variáveis CE, CTD, CTE, LTD e LTE as estimativas de média, e desvio padrão encontrados foram respectivamente de 16,31±0,95 cm, 1,75±0,27 cm, 1,85±0,25 cm, 2,30±0,36 cm e 2,64±0,57 cm. Para as variáveis relacionadas à qualidade seminal, foram observadas estimativas médias e erro padrão considerando os GI e GII, respectivamente: VOL, 1,11±0,21mL e 2,01±0,25mL; MOT, 82,08±4,32% e 73,33±4,99%; VIG, 4,00±0,15 e 3,22±0,19; PATOL, 7,08±0,91% e 6,1± 1,05 CONC, 8,43±0,09 e 8,36±0,11 sptz/ejaculado. As análises de variância revelaram efeitos significativos (P<0,05) para as variáveis VOL (GI: 1,12±0,22b mL; GII: 2,01±0,25a mL; P=0,0441) e VIG (GI: 4,0±0,17a; GII: 3,22±0,19b; P=0,03). Os resultados deste estudo sugerem que, embora os dois grupos apresentem sêmen de boa qualidade, os animais de companhia (GI) exibiram maiores valores para vigor, quando comparados com animais utilizados em trabalho (GII). Já para a variável VOL, os animais de trabalho (GII) apresentaram maiores valores que os animais de companhia (GI).

SBTE 017 Fisiologia da reprodução do macho e tecnologia do sêmen

Importância da avaliação morfológica e funcional do sêmen de búfalos para o sucesso de programas de iatf

Giulia Kiyomi Vechiato Kawai; João Diego De Agostini Losano; Andressa Dalmazzo; Diego Cavalcante De Souza; Bruno Moura Monteiro; Nelcio Antonio Tonizza De Carvalho; Pietro Sampaio Baruselli; Marcilio Nichi
FMVZ/USP.

Palavras-chave: Bubalinos; testes funcionais; criopreservação

Estima-se uma perda de aproximadamente 50% dos espermatozoides de bovinos criopreservados pós-descongelamento (Arruda, R.P. Biotecnologia da reprodução em bovinos. 1º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, p.166-179). Nesse sentido, o desenvolvimento de provas laboratoriais visando avaliar, com maior acurácia, os resultados do processo de congelamento de partidas de sêmen tem sido meta para programas de pesquisa no campo da IA (Arruda, R. L. Ver. Bras. Reprod. Anim., v.34, p.168-184, 2010). Objetivou-se demonstrar a influência da análise morfológica e funcional do sêmen de búfalos pós-descongelamento no sucesso de programas de IATF. Cento e cinco búfalas leiteiras [59,1±2,4 dias pós-parto e escore de condição corporal de 3,7±0,0 (1-5)] foram sincronizadas para IATF em dias aleatórios do ciclo estral (D0; 16:00), recebendo um dispositivo intravaginal liberador de P4 (1g de progesterona; Sincrogest®, Ourofino) e 2,0mg de benzoato de estradiol i.m. (Sincrodiol®, Ourofino). No D9 (16:00), as fêmeas receberam 0,53mg de PGF2α i.m. (Cloprostenol, Sincrocio®, Ourofino) e 400 IU de eCG i.m. (Novormon®, MSD Saúde Animal), seguido de remoção do dispositivo de progesterona. No D11 (16:00), 10µg de acetado de buserelina (GnRH, Sincroforte®, Ourofino) foram administrados i.m. A IATF foi realizada 16 horas após a aplicação do GnRH (D12; 8:00). Foram utilizadas 64 doses de uma única partida do touro 1 e 41 doses de uma única partida do touro 2 no mesmo protocolo de IATF. Para a escolha dos touros de centrais de coleta de sêmen padronizamos: motilidade>50%, vigor>3, concentração maior que 10 milhões/palheta e defeitos totais<30%. Apesar de aprovados nos nossos critérios, houve diferença de 8,5% entre as taxas de prenhez dos touros (touro 1: 71,9%; touro 2: 63,4%). Três palhetas de cada partida foram descongeladas e submetidas à avaliação funcional do sêmen (integridade de membrana plasmática - Eosina-Nigrosina; e integridade acrossomal - Fast-Green/Rosa Bengala; atividade mitocondrial – Diaminobenzidina; fragmentação de DNA – SCSA; peroxidação lipídica - TBARS). Apesar de menor motilidade (touro 1: 56,7±3,3% vs. touro 2: 65,0±2,9%), o touro de maior fertilidade apresentou números semelhantes de células móveis por palheta (18,5%vs. 18,4%). No entanto, o touro de maior fertilidade apresentou menor porcentagem de defeitos maiores (7,0±0,6% vs. 20,3±0,9%,). Houve também, uma maior porcentagem de células com membranas plasmática e acrossomal íntegras, respectivamente, para o touro de maior fertilidade (80,7±4,1% vs. 63,7±2,4%; 95.3±0,3% vs. 76,7±0,9%). Não foram observadas diferenças significativas na avaliação da atividade mitocondrial, fragmentação de DNA e peroxidação lipídica. Os resultados preliminares obtidos indicam que não somente a análise física, mas as análises morfológica e funcional das células espermáticas pós-descongelamento podem ser imprescindíveis para o sucesso de programas de IATF de bubalinos.

SBTE 018 Fisiologia da reprodução do macho e tecnologia do sêmen

Influência de diferentes métodos de seleção de espermatozoides ovinos congelados sobre a capacitação e vitalidade espermática após incubação

Carolina Cerqueira Sarmento Olivares[1]; Joanna Maria Gonçalves De Souza Fabjan[1]; Anna Beatriz Veltri Peneiras[1]; Mário Felipe Alvarez Balaro[1]; Vicente José De Figueirêdo Freitas[2]; Jeferson Ferreira Da Fonseca[3]; Felipe Zandonadi Brandao[1]
1.Universidade Federal Fluminense; 2.Universidade Estadual Do Ceara; 3.EMBRAPA CAPRINOS E OVINOS.

Palavras-chave: Carneiro; seleção espermática; longevidade espermática

Apesar de necessária para a fecundação, a capacitação espermática diminui a longevidade e vitalidade dos espermatozoides. Objetivou-se analisar os efeitos de quatro métodos de seleção espermática sobre a capacitação e vitalidade dos espermatozoides após incubação. Foi utilizado pool de sêmen congelado comercial de 10 carneiros da raça Santa Inês. As amostras foram submetidas aos diferentes métodos de seleção: lavagem por centrifugação, gradiente de Percoll, mini-Percoll, Swim-up e grupo controle. Na técnica de mini-Percoll, foi utilizado 400 microlitros dos gradientes de 90% e 45% e a amostra foi submetida a centrifugação por 5 minutos a 5000 xg. Para a técnica de Percoll, foi utilizado 1 mL de cada gradiente e os espermatozoides foram submetidos à força de 700 xg por 10 minutos. Durante o Swim-up, os espermatozoides foram incubados em 1 mL de SPERM-TALP por 45 minutos em atmosfera humidificada a 37,5ºC. Já na lavagem por centrifugação, a amostra foi submetida a centrifugação por 8 minutos a 300 x g em SPERM-TALP. Posteriormente, os espermatozoides selecionados foram incubados a 37º C por 1 h, 2 h e 3 h. Foi avaliada a vitalidade por meio de iodedo de propídeo e laranja de acridina pelo sistema de avaliação seminal computadorizada. A capacitação espermática foi analisada pela coloração de hidroclorido de clortetraciclina em microscópio de epifluorescência. O efeito do método sobre os parâmetros foi avaliado pela ANOVA, seguido pelo teste de Tukey ($P<0,05$). Após 3 h, houve decréscimo da taxa de espermatozoides capacitados ($P<0,05$) em todos os métodos de seleção. Independente do momento de incubação, a taxa de capacitados foi similar ($P>0,05$) entre Percoll (36%), mini-Percoll (34%) e Swim-up (30%), as quais foram inferiores ($P<0,05$) ao grupo controle (47%) e lavagem por centrifugação (41%). A taxa de espermatozoides não capacitados foi superior ($P<0,05$) no momento 0 h (12%) e diminuiu após 3 h (1,5%), independentemente do método. Houve interação ($P<0,05$) entre intervalo de incubação e método na taxa de espermatozoides reagidos. O índice de reagidos foi menor ($P<0,05$) em 0 h (50%) e 1 h (53%) e maior após 3 h (64%). Percoll (60%) e mini-Percoll (61%) apresentaram maiores valores para reagidos ($P<0,05$) enquanto o controle apresentou o menor (49%). Observou-se interação ($P<0,05$) entre intervalo de incubação e método na vitalidade espermática. A taxa de íntegros em 0 h foi a maior (17,5%; $P<0,05$), após os diferentes métodos. O Swim-up apresentou maior taxa de íntegros (17,4%; $P<0,05$), independentemente do intervalo de incubação. Em conclusão, o intervalo de incubação interfere nos padrões de capacitação e vitalidade de espermatozoides ovinos congelados. A seleção espermática aumenta a taxa de células reagidas e o Swim-up permite maior vitalidade durante a incubação.
Suporte financeiro: Faperj (E-26/111.694/2013)

SBTE 019 Fisiologia da reprodução do macho e tecnologia do sêmen

Influência do sêmen bovino congelado com ou sem a presença do plasma seminal na produção *in vitro* de embriões bovinos

Fabio Morato Monteiro[1]; Claudia Cristina Paz[1]; José Antonio Junior Dell`Aqua[2]; Frederico Ozanam Papa[2]; Camila Paula Freitas-Dell`Aqua[2]; Erika Aline Ribeiro Dias[1]; Suzane Peres Campanholi[3]; Guilherme Fazan Rossi[3]; Roberta Vantini[3]; Joaquim Mansano Garcia[3]
1.Instituto De Zootecnia; 2.UNESP - FMVZ; 3.UNESP - FCAV.

Palavras-chave: Centrifugação; filtragem; nelore

O plasma seminal, que se mistura com os espermatozoides na ejaculação, e serve como meio de transporte para o trato genital feminino, já foi descrito como benéfico e prejudicial. Há também relatos de influência negativa do plasma seminal no armazenamento do sêmen, por conter componentes prejudiciais à viabilidade espermática. Uma alternativa para reduzir as concentrações de plasma seminal do ejaculado é a centrifugação do sêmen ou sua filtragem. Entretanto, vários trabalhos relatam aparente injúria ao espermatozoide bovino prejudicando a fertilização pelo método de centrifugação. Com isso, o objetivo do trabalho foi avaliar taxa de embriões bovinos produzidos *in vitro* (PIV) utilizando sêmen congelado com ou sem a presença de plasma seminal. O sêmen utilizado para a PIV foi obtido de 31 touros da raça Nelore colhidos por eletroejaculação. Após a colheita, o sêmen obtido foi fracionado em três alíquotas iguais e realizados os tratamentos conforme Campanholi et al. (VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica (CIIC), Campinas, São Paulo, Brasil, 2013, p.1-8). O tratamento T1 (Convencional) constitui-se na diluição do semên para a concentração final de $60x10^6$ espermatozoides/mL com o diluidor BotuBov® (BotuPharma®, Botucatu, Brasil). O tratamento T2 (Centrifugado) envolveu a centrifugação por 10 minutos a 600xg (2200 rpm) para a remoção do plasma seminal. O tratamento T3 (Filtrado) se caracterizou pela filtração do sêmen pelo dispositivo Sperm Filter® (BotuPharma®, Botucatu, Brasil). Após a centrifugação e filtração do sêmen, os espermatozoides foram ressuspendidos com diluidor BotuBov® na mesma concentração do tratamento T1. Após os tratamentos o sêmen foi envasado à temperatura ambiente em palhetas de 0,5 mL e congelado utilizando a máquina TK 4000® (Tetakon®, Uberaba, Brasil). Oócitos bovinos para PIV foram obtidos a partir de aspiração folicular de ovários provenientes de abatedouro. As análises estatísticas foram feitas no PROC GLM do SAS, usando 5% de significância. A taxa de clivagem sobre a quantidade total de oócitos não foi diferente entre os três tratamentos, sendo T1 = 82,1 ± 0,83% (3748/4570), T2 = 82,05 ± 0,83% (3719/4535) e T3 = 84,01 ± 0,83% (3786/4507). A taxa de embriões avaliado no D7 foi maior (P<0,001) nos tratamentos T1 (31,30 ± 1,07%; 1430/4570) e T3 (32,7 ± 1,07%; 1476/4507) quando comparado com o tratamento T2 (26,55 ± 1,07%; 1204/4535). A taxa de blastocistos eclodidos avaliados no D9 do T3 (24,0 ± 1,05%; 1082/4507) foi maior (P<0,001) que T2 (18,8 ± 1,05%; 854/4535) e semelhante ao T1 (21,22 ± 1,05%; 970/4570). Com isso, a utilização de sêmen congelado retirando o plasma seminal com o SpermFilter® (T3) não altera a PIV nos dias D7 e D9, quando comparado ao sêmen congelado convencional.
Agradecimentos: FAPESP pelo apoio financeiro (Processo: 2012/05555-8).

SBTE 020 Fisiologia da reprodução do macho e tecnologia do sêmen

Inseminação cervical profunda por cateterização da cérvix em ovelhas leiteiras

Renata Casali[1]; Larissa G. Silva[1]; Maicon Lorena Gaissler Pinto[2]; Fabricio D. Mozzaquatro[1]; Alceu Mezzalira[1]
1.UDESC; 2.EPAGRI / SC.

Palavras-chave: Ovinos; cateterismo cervical; pinçamento

A inseminação artificial (AI) transcervical em ovelhas é limitada em função da morfologia dos anéis cervicais, que impedem ou dificultam a passagem da pipeta. A correlação positiva entre a penetração cervical e a taxa de prenhez justifica a busca de técnicas que permitam a deposição do sêmen de forma mais profunda na cérvix. Este estudo comparou as taxas de prenhez após IA por via cervical superficial ou profunda em ovelhas leiteiras, onde na IA profunda empregou-se o pinçamento do fundo de saco vaginal e a tração da cérvix. Cinquenta ovelhas foram sincronizadas utilizando-se implantes de progesterona por 12 dias e aplicação de 350 UI de eCG e 0,125 mg de prostaglandina, no momento da retirada do mesmo. As ovelhas foram rufiadas 12 h após a retirada do implante, e inseminadas 12 h após a observação do cio, sendo alocadas nos dois tratamentos de forma aleatória. Vinte e sete ovelhas foram inseminadas por via cervical superficial e 23 por via cervical profunda, sendo esta considerada a partir da transposição do terceiro anel cervical pelo aplicador (Alta genética®). As fêmeas eram posicionadas com os membros posteriores elevados num ângulo de 45º em relação ao solo e com auxílio de espéculo vaginal a cérvix era localizada (em ambas as técnicas). Na técnica superficial, o sêmen era depositado diretamente. Já na técnica de deposição profunda, após anestesia tópica os tecidos adjacentes eram pinçados para a tração e cateterização da cérvix com o aplicador. O sêmen utilizado foi coletado de 4 carneiros Lacaune e Milchshaff, diluído na proporção 1+3 em Tris gema, envasado em palhetas de 0,25 mL e resfriado até 5 ºC. A curva de resfriamento consista na queda de 0,5 ºC por minuto, desde a temperatura ambiente. O diagnóstico de prenhez foi realizado por ultrassonografia transretal, 30 dias após a IA. Os dados obtidos foram comparados por qui-quadrado (planilha Excel, Microsoft®), com 5% de significância. Foi observada grande variação na progressão do cateter após o pinçamento cervical. Das 23 fêmeas do grupo IA profunda, foi possível transpor totalmente a cérvix em 9 animais. Nas 14 restantes foi possível a inseminação profunda (após o terceiro anel cervical), evitando assim o refluxo de sêmen. As taxas de prenhez foram 33,3% na inseminação superficial e 52,2% na inseminação cervical profunda. Os dados não diferiram com o nível de significância de 5%, porém constatou-se diferença com o nível de significância de 9%, evidenciando uma tendência de melhor desempenho com a inseminação profunda. Novos ensaios serão conduzidos com o objetivo de aumentar o número de animais e permitir conclusões mais robustas.

SBTE 021 Fisiologia da reprodução do macho e tecnologia do sêmen

Modelo de estresse térmico *in vitro* para espermatozoides *Bos taurus taurus*

Daniela Franco Da Silva[1]; Juliana Vieira Lopes[2]; Thaís Alves Rodrigues[2]; Cássia Maria Barroso Orlandi[2]; Fabiola Freitas De Paula Lopes[2]
1.UNESP; 2.UNIFESP.

Palavras-chave: Sp-talp; tl-sêmen; estresse térmico *in vitro*

O aumento da temperatura testicular em touros reduz a produção espermática, os padrões de motilidade e aumenta a porcentagem de espermatozoides anormais. O modelo de estresse térmico *in vitro* para espermatozoides bovinos requer validação de meio adequado para incubações e avaliação da funcionalidade celular a partir da motilidade e da atividade mitocondrial do espermatozoide. A composição química dos meios SP-TALP (Tyrode-albumina-lactato-piruvato) e TL-sêmen são semelhantes, exceto pela suplementação de BSA (albumina sérica bovina), lactato e piruvato no meio SP-TALP (Bavister, Biol Reprod, 16:228-237,1977). O objetivo deste estudo foi estabelecer um modelo de estresse térmico *in vitro* avaliando a motilidade e a atividade mitocondrial em espermatozoides de touros *Bos taurus taurus*. Foram utilizadas palhetas de sêmen (n=30) provenientes de quatro touros da raça Holandesa (N= pool de 3 palhetas/réplica). As amostras foram avaliadas imediatamente após gradiente de percoll (0 h) e incubadas em SP-TALP e TL-sêmen à 35 °C, 38,5 °C e 41 °C durante 4 h. A motilidade espermática foi avaliada nos tempos 0, 1, 2, 3 e 4 h e a atividade mitocondrial (Mitotracker Red/Hoechst 33342) nos tempos 0 e 4 h. Os dados foram submetidos a ANOVA e quando não paramétricos analisados pelo teste de Wilcoxon pelo SAS 9.0. A incubação de espermatozoides em SP-TALP à temperatura de 35 °C (54 ± 4,07%); 38,5 °C (53 ± 4,07%) e 41 °C (47 ± 4,07%) por 2 h não afetou a motilidade em comparação à 0 h (64 ± 4,07%). No entanto, a partir de 3 h à 41 °C (34 ± 4,07%) a motilidade diminui (P< 0,02) em relação ao controle 0 h (64 ± 4,07%). Por outro lado, os espermatozoides incubados em meio TL-sêmen apresentaram redução da motilidade a partir da primeira hora de incubação à 41 °C (22 ± 3,87%; P< 0,05) em relação à temperatura de 35 °C (43 ± 3,87%; P< 0,05) e ao controle 0 h (46 ± 3,87%). A incubação de espermatozoides à 38,5 °C (1,42 ± 0,017 unidades arbitrárias UA; P< 0,05) e 41 °C (1,41 ± 0,017 UA; P< 0,05) por 4 h diminuiu a atividade mitocondrial quando comparado à 35 °C (1,48 ± 0,017 UA; P< 0,05) independente do meio. A atividade mitocondrial em meio SP-TALP (1,44 ± 0,014 UA) foi superior (P< 0,05) à atividade em meio TL-sêmen (1,43 ± 0,014%) independente da temperatura. Estas observações sugerem que componentes importantes para a funcionalidade espermática são perdidos em espermatozoides incubados em meio TL-sêmen, porém mantidos, se incorporados em meio SP-TALP. Conclui-se que o modelo de estresse térmico *in vitro* com meio SP-TALP forneceu maior aporte de substrato energético aos espermatozoides refletindo positivamente na motilidade e atividade mitocondrial.

SBTE 022 Fisiologia da reprodução do macho e tecnologia do sêmen

O uso de uma solução de amortecimento durante a seleção espermática *in vitro* reduz o estresse oxidativo

Cecília Isabel Inês Urquiza Falcão Machado; Daniele Missio; Natália Picoli Folchini; Karine De Mattos; Francielli Weber Santos; Fábio Gallas Leivas; Daniela Dos Santos Brum
Universidade Federal Do Pampa.

Palavras-chave: Piv; espermatozoide; cunshionfluid

Apesar dos avanços e modificações realizadas no método de gradiente descontínuo de Percoll para a seleção espermática *in vitro*, a etapa de centrifugação presente nesta técnica é responsável por causar danos aos espermatozoides. Este processo pode desencadear a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e diminuição das defesas antioxidantes. Com o intuito de amenizar possíveis danos causados pela centrifugação foi desenvolvida uma técnica com amortecimento, utilizando um colóide para o processamento do sêmen equino e suíno pré-congelamento. No entanto, trabalhos utilizando essa técnica para a seleção de espermatozoides bovinos destinados a PIV são inexistentes. Este trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade dos espermatozoides submetidos ao processo de seleção espermática pelo método de gradiente de mini-Percoll modificado (Guimarães et al., Anim Reprod Sci, v.146, p.103-10, 2014), utilizando uma solução de amortecimento durante a centrifugação, através da análise dos níveis de ERO bem como a capacidade antioxidante total. Foram realizadas 6 repetições, onde palhetas de sêmen de touro *Bos taurus* foram descongeladas e divididas em 4 tratamentos: Controle (C), sendo utilizado o método de gradiente de mini-Percoll com 300µL de cada concentração de Percoll (90, 60 e 30%), na primeira centrifugação, e 300µL de meio FERT-TALP para lavagem na segunda centrifugação; C1, onde foi adicionado 150µL do meio de amortecimento (CushionFluid® - Minitube, Tiefenbach, Germany) sob o gradiente na primeira centrifugação; C2: com a adição da mesma quantidade do colóide na segunda centrifugação e C1-2 com adição do colóide em ambas as centrifugações. Após o processo de seleção, as amostras de sêmen foram avaliadas quanto aos níveis de ERO por um método espectrofluorimétrico usando 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCF-DA), sendo os resultados expressos em unidades de fluorescência (UF; Loetchutinat et al.,Radiat. Phys. Chem., v.72, p.323–31, 2005); e a capacidade antioxidante total, que foi determinada através do potencial antioxidante redutor férrico (FRAP), utilizando uma curva padrão de um composto com atividade antioxidante conhecida, sendo os resultados expressos em µg de equivalente ao ácido ascórbico (Benzie e Strain, Anal Biochem, v.239, p.70-6, 1996). Os dados foram avaliados pelo teste ANOVA e comparados com teste Duncan ($P<0,05$). Os grupos que continham a solução de amortecimento tiveram menor produção de ERO quando comparado ao grupo Controle (C1: 0,270, C2: 0,267, C1-2: 0,258 e C: 0,352 UF). A capacidade antioxidante total do grupo C2 (44,27) foi inferior ao Controle (58,6) e C1 (58,84) e semelhante ao C1-2 (50,4). Estes resultados indicam que quando a seleção espermática por gradiente descontínuo de Percoll é realizada com uma solução de amortecimento ocorre redução do níveis de ERO, enquanto a capacidade antioxidante total dos espermatozoides é reduzida com a utilização do Cushion Fluid® na segunda centrifugação.

SBTE 023 Fisiologia da reprodução do macho e tecnologia do sêmen

Uso da melatonina e do ácido ferúlico como promotores da função do espermatozoide criopreservado equino

Renata Lançoni; Eneiva Carla Carvalho Celeghini; Maíra Rodrigues Bianchi-Alves; Gabriel De Carli Dos Santos; Shirley Andrea Florez-Rodriguez; Ticiano Guimarães Leite; Rubens Paes De Arruda
FMVZ-USP.

Palavras-chave: Antioxidantes; estresse oxidativo; garanhão

As espécies reativas de oxigênio podem ser responsáveis por causar danos às membranas dos espermatozoides, fragmentação de DNA, entre outros fatores, influenciando assim na fertilidade principalmente no processo de criopreservação do sêmen. A melatonina (MEL) é um potente antioxidante anfifílico (hidro e lipossolúvel), o que a torna capaz de penetrar qualquer compartimento celular. O ácido ferúlico (AF) é um composto fenólico que exibe uma ampla gama de efeitos terapêuticos contra diversas doenças devido sua potente ação antioxidante. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito dos antioxidantes MEL e AF na criopreservação do sêmen equino. Foram utilizados 5 ejaculados de 4 garanhões. Dentre os tratamentos aplicados, foram utilizadas duas concentrações de cada antioxidante (MEL 2mM, MEL 1µM, AF 0,5mM e AF 1,2mM) além do controle (diluidor de congelação convencional BotuCrio®-Botupharma, Botucatu, Brasil), totalizando 5 tratamentos. As variáveis analisadas foram cinética espermática por meio do sistema CASA (programa SCA - Sperm Class Analyser®), morfologia espermática por DIC, integridade de membranas plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial, com o uso das sondas fluorescentes PI, Hoescht 33342, FITC-PSA e JC-1 além da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelo espermatozoide com a sonda fluorescente CellRox Deep Red®. Comparações entre os tratamentos foram realizadas pelo modelo linear generalizado (PROC GLM) do SAS (Versão 9.3) e as diferenças entre eles foram localizadas através do teste de Duncan. A probabilidade de $P \leq 0,05$ foi considerada como diferença significativa. Os resultados para características da motilidade tiveram diferença significativa em alguns aspectos, porém nenhum tratamento foi superior ao controle. A avaliação da morfologia espermática apresentou uma diminuição nos defeitos maiores nas amostras tratadas com MEL 2mM, MEL 1µM e AF 1,2mM. No que diz respeito à integridade das membranas, o tratamento MEL 1µM apresentou porcentagens significativamente melhores nas células íntegras (membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e alto potencial de membrana mitocondrial). As células em estresse oxidativo não se diferenciaram entre os tratamentos. Baseados nas análises realizadas, pode-se concluir que o tratamento MEL 1µM melhora a integridade de membranas espermáticas no processo de criopreservação do sêmen equino.

SBTE 024 Fisiologia da reprodução do macho e tecnologia do sêmen

Vitrificação de sêmen epididimário de cabra montés *(Capra pyrenaica)*

Jorgea Pradieé; Emma O`Brien; Milagros Cristina Esteso; Cristina Castaño; Adolfo Toledano Diaz; Antonio Lopez Sebastian; Julian Santiago Moreno
INIA.

Palavras-chave: Vitrificação de sêmen; cabra montés; criopreservação

A vitrificação é um processo em que células são submetidas a solidificação vítrea, é um método de criopreservação relativamente novo que pode preservar com sucesso embriões, óvulos, e até mesmo sêmen de determinadas espécies. Para sêmen, pelo menos nas espécies estudadas até agora, a vitrificação cinética parece ser uma melhor alternativa. A simplicidade da técnica de criopreservação de sêmen pode ser útil em laboratórios de campo para as espécies selvagens porque requer menos equipamento, é muito mais rápido, mais simples e rentável do que congelação convencional. O objetivo deste trabalho foi avaliar comparativamente a efetividade da vitrificação cinética e congelamento convencional de sêmen epididimário de Cabra Montés (Capra pyrenaica). Os testículos foram obtidos a partir de machos adultos legalmente caçados na Reserva de Tejeda e Almijara no sul da Espanha (36ºN latitude, Província de Málaga, Espanha) durante a estação reprodutiva (Novembro/Dezembro de 2013/2014). O sêmen proveniente do epidídimo foi coletado pelo método de lavagem retrógrada, utilizando 1 mL de meio de glicose-tris-ácido cítrico (TCG) à temperatura ambiente (11-13ºC no laboratório de campo). O sêmen do epidídimo esquerdo foi congelado com TCG-6% de gema de ovo e glicerol a 5%, e o sêmen do epidídimo direito foi vitrificados com TCG-6% de gema de ovo com 100 mM de sacarose. Não houve diferenças entre os tratamentos (sêmen congelado-descongelado vs vitrificados-reaquecido) para a porcentagem de espermatozoides móveis, porcentagem de espermatozoides com a integridade da membrana determinado pelo teste hipo-osmótico, e porcentagem de espermatozoides com anormalidades morfológicas (%). No entanto, não foram observadas diferenças significativas para a qualidade (pontuação 0-4) da motilidade (2,4 ± 0,2 e 1,4 ± 0,2), porcentagem de motilidade progressiva (22,7 ± 4,3 e 7,0 ± 1,6%), porcentagem de acrossoma intacto (73,8 ± 4,0 e 55,9 ± 2,5%), porcentagem de espermatozoides viáveis de acordo com a coloração nigrosina-eosina (45,5 ± 4,1 e 29, 2 ± 4,1%), porcentagem de espermatozoides mortos com acrossoma danificado (5,5 ± 1,0 e 17,3 ± 2,3%) e porcentagem de espermatozoides vivos com acrossoma intacto (45,1 ± 5,5 e 26, 5 ± 4,6%), respectivamente. Embora os melhores resultados foram encontrados utilizando o método de congelação convencional, tendo em conta a simplicidade da vitrificação de sêmen a sua utilização em certas condições de campo pode ser recomendado para esta espécie. O aprimoramento da técnica pode, no entanto, fornecer melhores resultados pós-vitrificação; novas soluções de vitrificação e aditivos devem ser avaliados em trabalhos futuros.

SBTE 032 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Associação da via de sinalização PI3K-AKT com competência de oócitos bovinos através de perfis de expressão de miRNA e avaliação da capacidade de desenvolvimento

Gabriella Mamede Andrade[1]; Juliano Coelho Da Silveira[1]; Marcelo Fabio Gouveia Nogueira[2]; Flavio Vieira Meirelles[1]; Felipe Perecin[1]
1.FZEA - Universidade De São Paulo; 2.FCL - Universidade Estadual Paulista.

Palavras-chave: Competência oocitária; microrna; pten e akt

Em mamíferos, miRNAs controlam a atividade de mais de 60% dos genes codificadores de proteína, e portanto, regulam diversas vias de sinalização e processos celulares. A hipótese do trabalho é que vias intracelulares altamente reguladas por miRNAs nas células foliculares estão envolvidas na aquisição da competência oocitária. Para testar esta hipótese ovários de abatedouro (3-6mm) foram dissecados e rompidos para recuperação das células da granulosa (GC) e dos complexos cumulus-oócitos (COC). Essas células foram contadas e colocadas em cultivo por 96 horas e depois utilizadas para a extração de RNA. Foram investigados os níveis de expressão de 351 miRNAs em CGs e COCs a fim de identificar vias reguladas por miRNAs atuando no microambiente folicular. Foram identificados 305 miRNAs presentes em ambos os tipos celulares, GCs e COCs, 8 exclusivos nas GCs e 13 exclusivos nos COCs. As análises de bioinformática dos miRNAs exclusivos de cada tipo celular demonstraram que 69 e 85 vias, respectivamente, estão preditas de serem reguladas por esses miRNAs. Uma das vias de sinalização identificadas, tanto em CG como em COC, foi a via do PI3K-Akt. Para testar sua associação com a competência oocitária nós dissecamos folículos ovarianos entre 3-6mm e recuperamos as células foliculares (granulosa e cumulus) e os oócitos; sendo os primeiros armazenados e os últimos destinados à maturação *in vitro* (MIV), ativação partenogenética e cultivo *in vitro* (CIV) até o estágio de blastocisto. A MIV, ativação e CIV individual permitiram agrupar as células foliculares, obtidas após dissecção, com a capacidade de desenvolvimento dos oócitos, como segue: oócitos que não clivaram (Grupo NCliv), oócitos maturos que clivaram mas não chegaram a blastocisto (Grupo Cliv) e oócitos que chegaram a blastocisto (Blast). Células foliculares destes três grupos foram usadas para identificar os seguintes componentes da via de sinalização do PI3K-Akt: níveis proteicos da Akt-fosforilada (p-Akt; um regulador positivo da via PI3K-Akt) e níveis de RNAm do PTEN (um regulador negativo da via PI3K-Akt). Os níveis de p-Akt foram maiores ($p=0,06$) no grupo Blast ($0,74 \pm 0,33$) comparado ao grupo Cliv ($0,45 \pm 0,39$), e ambos foram iguais ao grupo Ncliv ($0,59 \pm 0,43$). A expressão do PTEN nas células foliculares do grupo Blast ($0,60 \pm 0,10$) foi menor ($p<0,05$) do que no grupo Cliv ($2,42 \pm 1,55$) e Ncliv ($2,23 \pm 0,47$). Em conjunto estes resultados demonstram que o perfil de expressão de miRNAs nas células foliculares consiste numa ferramenta útil para indicar prováveis vias moleculares relacionadas à aquisição de competência oocitária. Este princípio foi demonstrado pela determinação dos níveis de p-Akt e PTEN em células foliculares associadas à oócitos com diferentes capacidades de desenvolvimento, os quais indicaram a ativação da via de sinalização da PI3K-Akt em amostras do grupo de maior competência oocitária.
Apoio financeiro FAPESP: 2012/50533-2; 2013/08135-2; 2013/10473-3 e 2014/21034-3.

SBTE 033 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Avaliação da produção de glicose e lactato pelas células lúteais caninas no início do diestro cíclico e gestacional

Ana Augusta Pagnano Derussi[1]; Flavia Caroline Destro[1]; Carlos Renato De Freitas Guatolini[1]; Rodrigo Volpato[1]; Gabriela Amorim Campos[1]; Nathalia Celeita Rodriguez[1]; Angie Lagos-Carvajal[1]; Mateus José Sudano[2]; Carla Regina Barbieri Simoes[1]; Maria Denise Lopes[1]
1.Universidade Estadual Paulista; 2.Universidade Federal Do Pampa.

Palavras-chave: Luteal; canina; glicose

Existe grande similaridade em vários aspectos entre a fase lúteal cíclica e gestacional canina. A fim de investigar as vias metabólicas das células luteais no início do diestro cíclico e gestacional, tivemos como objetivo analisar o consumo de glicose e produção de lactato destas células cultivadas *in vitro*. Realizou-se ovariohisterectomia em 6 fêmeas, sendo 3 em diestro gestacional inicial e 3 em diestro cíclico inicial. Desta maneira obtivemos os corpos lúteos (CL), os quais foram digeridos enzimaticamente em solução contendo 5 ml de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose, Sigma- Aldrich, Alemanha) e 0,0075g de colagenase tipo 1 (Collagenase from Clostridium histolyticum Type I, Sigma -Aldrich, Germany). Uma hora após esta solução permanecer a 37,5ºC, passando por agitação em vortex a cada 15 minutos, realizou-se a filtragem (Filtro 70 µm, BD Falcon®,USA), centrifugação por três vezes (340G, 220G e 100G, respectivamente a 20°C por 10 min) e ressuspenção em 12 ml de DMEM suplementado com antibiótico, antifúngico , L-glutamina (Sigma -Aldrich, USA) e soro fetal bovino (Sigma -Aldrich, EUA). Esta solução contendo as células luteais (solução experimental) foi distribuídas em placa de 24 poços e incubada em atmosfera controlada (contendo 5% de CO2 e 95% de ar). Após 24 horas, realizou-se a lavagem dos poços com HBSS (14175079; Gibco BRL), seguido da troca do meio de cultivo. Uma placa contendo apenas meio de cultura foi usada como controle (solução controle). A solução controle e experimental foram coletadas 36 (momento 1), 48 (momento 2) e 60 (momento 3) horas após o inicio de cultivo, sendo estas acondicionados em tubos plásticos e armazenados em freezer -80C. A análise de glicose e lactato destes meios foi realizada utilizando VITROS Chemistry Products Calibrator kits (Products Vitro Chemistry, Reino Unido). A análise estatística realizada foi ANOVA ($p < 0,05$) no SAS PROC GLM. Observou-se que o consumo de glicose e a produção de lactato aumentaram durante o cultivo *in vitro* tanto nas células lúteas gestacionais quanto cíclicas, no entanto, o consumo de glicose e produção de lactato no CL gestacional foi maior do que no CL cíclico na fase inicial (glicose no momento 1, $p = 0,0328$ e lactato no momento 2, $p = 0,0221$) e final (glicose e lactato no momento 3, $p = 0,0085$- e $p = 0,0009$, respectivamente) do cultivo celular. De acordo com estes resultados, acreditamos que não há diferença nas vias metabólicas utilizados pela célula lúteal cíclica e gestacional, no entanto no diestro inicial o metabolismo energético parece ser maior no CL gestacional quando comparado ao cíclico
Apoio financeiro: FAPESP (PROCESSO 2014-00739-9 e 2013-15358-8)

SBTE 034 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Avaliação do ciclo estral de ratas submetidas à atividade física e ao hormônio do crescimento

Francislaine Anelize Garcia Santos[1]; Cesar Augusto Zanfolim Bariani[1]; Gabriela Azenha Soriano[1]; Paula De Carvalho Papa[2]; Caliê Castilho[1]; Ronaldo Sena E Silva[1]; Ines Cristina Giometti[1]
1.UNOESTE; 2.Universidade De São Paulo.

Palavras-chave: Citologia vaginal; exercício físico; hormônio do crescimento

O hormônio do crescimento (GH) é utilizado algumas vezes de forma indiscriminada por praticantes de atividades físicas com o intuito de aumentar a massa muscular. Considerando que o GH pode atuar em diferentes células do organismo, incluindo os órgãos reprodutivos, este trabalho teve como objetivo verificar o uso do GH, associado ou não à atividade física, no ciclo estral de ratas Wistar. Para tanto, 40 ratas de 9 semanas de idade foram distribuídas em 4 grupos experimentais: CT (controle); Ex (grupo submetido ao treinamento resistido); GH (grupo em que foi administrado GH); e ExGH (grupo que foi submetido ao treinamento resistido e em que foi administrado GH). O GH foi administrado na dosagem de 0,2 UI/Kg a cada dois dias, enquanto que o grupo controle recebeu solução salina. O treinamento resistido foi realizado 3 vezes por semana, e consistiu em quatro séries de 10 saltos na água com colete com 50% do peso do animal e intervalo entre as séries de 1 minuto. Foram realizadas citologias vaginais em todas as ratas Wistar diariamente durante 29 dias. Todas as ratas foram submetidas a citologia vaginal por 7 dias antes do experimento para confirmar ciclicidade. As fases do ciclo estral das ratas foram determinadas pela avaliação dos esfregaços vaginais corados com Panótico® rápido em microscópio óptico. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, seguido de ANOVA e teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando $p<0,05$. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos experimentais na duração das fases luteínicas e foliculares do ciclo estral. Porém, observou-se um maior número de ciclos no mês das ratas do grupo CT (7,10 ± 0,88) em relação aos demais grupos: GH (6,10 ± 0,99, p=0,04); Ex (6,10±0,57, p=0,02) e ExGH (6,00±0,67, p=0,01). Portanto, conclui-se que o GH e o treinamento resistido interferem na ciclicidade reprodutiva das fêmeas, diminuindo a frequência de ciclos estrais em 29 dias.

SBTE 035 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Avaliação ultrassonográfica da dinâmica ovariana em vacas da raça indubrasil submetidas a dois manejos nutricionais.

Paula De Oliveira Figueiredo[1]; Guilherme Gostinhak Azambuja[2]; Luana Custódio Barros[3]; Carolina Gonzales Da Silva[1]; Heidi Christina Bessler[4]; Álvaro Moraes Da Fonseca Neto[4]; Ivo Pivato[1]; Carlos Frederico Martins[4]
1.Universidade De Brasília; 2.Faculdades Unificadas Do Oeste Do Paraná; 3.Faculdades Associadas De Uberaba; 4.Embrapa Cerrados.

Palavras-chave: Ciclo estral; alimentação; reprodução

O objetivo deste estudo foi comparar a dinâmica ovariana de vacas da raça Indubrasil quando submetidas ao regime de pastejo ou de confinamento. Para isso, o padrão de crescimento folicular de sete vacas adultas, não lactantes e com escore corporal 4 (classificação de 1 a 5), foi monitorado diariamente a partir do dia do estro, durante dois ciclos consecutivos em experimento 2x7. A primeira avaliação foi em regime de pastejo, onde os animais foram mantidos em Brachiária brizantha cv Marandu, consorciado com Leucaena leococephala, com água e sal mineral ad libitum. A segunda avaliação foi realizada no ciclo posterior sob o regime de confinamento, onde os animais receberam silagem de milho, sal mineral proteinado e água ad libitum. Para o acompanhamento da dinâmica ovariana foi utilizado um aparelho de ultrassonografia modelo HS 1500 (Honda®, Japão) equipado com probe linear retal de 7.5MHZ. Os dados obtidos foram registrados em função do dia do ciclo e apresentados na forma de média e desvio padrão. As médias foram comparadas pelo Teste T com significância de 5%. A duração do primeiro ciclo estral no regime de pastejo foi de 20±1,6 dias, e no regime de confinamento de 21±1,22 dias. Os animais em regime de pastejo apresentaram 2±0,49 ondas foliculares e os animais em confinamento 3±0,40 ondas foliculares, com duração de 9±1,99 e 9±1,65 dias, respectivamente. O diâmetro máximo do folículo ovulatório foi maior nos animais confinados (15±0,51mm; $p<0,05$) em relação aos animais em pastejo (13±0,87mm). Quanto aos folículos subordinados, o diâmetro máximo foi de 9±1,13mm para os animais em pastejo e 9±0,82mm para os animais confinados. A persistência do folículo dominante foi de 7±1,41 e 6±0,82 dias para animais em pastejo e em confinamento, respectivamente. Finalmente, a persistência do corpo lúteo nas imagens ultrassonográficas foi de 14±1,59 dias para os animais em pastejo e 15±1,06 dias para os animais confinados. Esses dados sugerem que a dieta influencia a taxa de crescimento e o tamanho do folículo ovulatório em vacas Indubrasil. Especula-se que a maior ingestão de matéria seca no regime de confinamento tenha promovido aumento no metabolismo dos hormônios esteroides, influenciando o crescimento do folículo dominante. Este resumo descreve pela primeira vez a dinâmica folicular na raça Indubrasil, que se mostrou muito semelhante à de outras raças zebuínas.

SBTE 036 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Caracterização do esgotamento da reserva ovariana de folículos em camundongos ames dwarf

Tatiana D. Saccon[1]; Fabiana Moreira[1]; Rafael Gianella Mondadori[1]; Luis Augusto Cruz[1]; Andrzej Bartke[2]; Michal M. Masternak[3]; Ligia Margareth Cantarelli Pegoraro[4]; Augusto Schneider[1]
1.UFPEL; 2.Southern Illinois University; 3.University Of Central Florida; 4.EMBRAPA.

Palavras-chave: Reserva ovariana; folículos; envelhecimento

Os camundongos Ames dwarf são deficientes na secreção de hormônio do crescimento (GH) e por isso tem níveis circulantes do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-I) e insulina muito baixos, vivendo em torno de 30-50% mais do que camundongos normais (Masoro; Mech Ageing Dev; 2005; 126:913-22). Estudos vêm demonstrando que a via de sinalização do IGF-I tem direta relação na regulação do crescimento e desenvolvimento folicular (Ahmed & Farquharson; J Endocrinol; 2010; 206:249-59). Portanto, o objetivo deste trabalho foi analisar a quantidade de folículos nos estágios primordial, primário, secundário e terciário, bem como o diâmetro folicular, em camundongos Ames Dwarf e normais. Ovários de camundongos normais (n=3) e Ames Dwarf (n=4) de 12 meses de idade foram utilizados. Os ovários foram histoprocessados, cortados sequencialmente e corados com hematoxilina-eosina. Utilizando microscópio óptico com objetivas de 10x e 40x, os folículos ovarianos foram classificados, mensurados e quantificados. Um a cada seis cortes foram avaliados. Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo teste de t com o software GraphPadPrism 5 (La Jolla, CA, USA). Diferenças foram consideradas significativas quando $P<0.05$. Foi observado maior ($P=0,001$) número de folículos primordiais nos camundongos Ames Dwarf (1.548 ± 139) comparados aos normais (378 ± 125). Este dado revela que os folículos não estão evoluindo do estágio primordial para o primário, possivelmente devido ao reduzido nível sérico de IGF-I e insulina, indicando que estes camundongos podem ser um bom modelo de estudo para entender a relação entre o estado metabólico, o envelhecimento ovariano e a preservação da fertilidade. O número de folículos secundários e terciários não foi diferente ($P>0,05$) entre camundongos Ames Dwarf e normais. O número total de folículos tendeu ($P=0,07$) a ser maior em camundongos Ames Dwarf (2,673 ± 209) comparados aos normais (1,668 ± 445). Em relação ao diâmetro do folículo, oócito e núcleo, foi encontrada diferença ($P=0,02$) apenas no diâmetro de oócitos inclusos em folículos primordiais, que foi maior em camundongos normais (6,8 ± 0,4 µm) do que em Ames Dwarf (5,5 ± 0,3 µm). Em conclusão, observou-se que os camundongos Ames Dwarf apresentam maior número de folículos primordiais, sugerindo que a deficiência de GH, IGF-I e insulina acarreta no acúmulo de folículos primordiais e no aumento da longevidade ovariana.

SBTE 037 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Efeitos do chá verde na expressão gênica do VEGF no corpo lúteo de ratas

Ines Cristina Giometti[1]; Caliê Castilho[1]; Francislaine Anelize Garcia Santos[1]; Luciana Machado Guaberto[1]; Ana Paula Matoso Miskulin Cardoso[1]; Paula De Carvalho Papa[2]
1.UNOESTE; 2.USP.

Palavras-chave: Camellia sinensis; reprodução; corpo lúteo

O chá verde proveniente da planta Camellia sinensis é considerado uma bebida saudável porque está associada com prevenção do câncer, de doenças cardiovasculares e de osteoporose. Suas catequinas têm atividade antioxidativa, antibacteriana e antitumoral. Apesar dos muitos potenciais benefícios do consumo do chá verde, as catequinas presentes no chá verde podem inibir significativamente a proliferação, esteroidogênese e a produção de fator de crescimento endotélio-vascular (VEGF) pelas células da granulosa de suínos. Por isso, é importante investigar as possíveis consequências do seu consumo para a reprodução. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do chá verde na expressão gênica do VEGF em corpos lúteos de ratas superovuladas. Para isto, 60 ratas Wistar foram divididas em dois grupos: o grupo controle com água ad libitum e o grupo tratado com chá verde comercial (Amor à Vida®, Amor à Vida Produtos Naturais, Brazil) a 2,5% ad libitum substituindo a água conforme realizado por Yang et al. (Eur J Cancer Prev, 12:391–395, 2003) e Niwattisaiwong et al. (Drug Metabol Drug Interact., 20:43-56, 2004). As ratas foram mantidas em caixas plásticas (5 animais por caixa), com livre acesso à bebida e comida. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética local. O experimento teve duração de três meses e em cada mês 10 animais de cada grupo foram superovulados com eCG (Folligon®, Intervet Schering-Plough, Brasil) e 150UI/Kg de hCG (Vetecor®, Hertape Calier, Brasil), sendo posteriormente sacrificadas. O RNAm foi extraído dos corpos lúteos pelo método do TRIzol® (Life Technologies, Brasil) e a transcrição reversa foi realizada usando o kit SuperScript III (Life Technologies, Brasil) com primers Oligo (dT) (Life Technologies, Brasil). A expressão relativa do VEGF foi avaliada por qPCR usando TaqMan Real-Time PCR Master Mix (Life Technologies, Brasil). O gene HPRT-1 foi utilizado como controle endógeno. A expressão relativa do VEGF foi calculada usando o método do ΔΔCT com correção da eficiência pelo método de Pfaffl (Nucleic Acids Research, 29:2004-2007, 2001). Na análise estatística utilizou-se o teste t não pareado e os momentos em cada grupo foram analisados por análise de variância. Diferenças foram consideradas significativas quando $p<0,05$. O consumo total de chá verde por rata por dia foi maior (30,73±0.49) que o consumo de água (29.13±0.50). Nenhuma diferença entre os grupos foi observada nos diferentes momentos. As médias e os erros padrões para a expressão relativa do VEGF nos dois grupos foram: primeiro mês (controle = 1,07±0,13 e tratado = 1,05±0,14); segundo mês (controle = 1,09±0,14 e tratado = 0,94±0,11); e terceiro mês (controle = 1,05±0,11 e tratado = 0,73±0,10). Conclui-se que o consumo prolongado de chá verde por três meses não interferiu na expressão do gene VEGF nos corpos lúteos de ratas. Apoio financeiro: FAPESP (2010/20583-2).

SBTE 038 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Concentração de estradiol e expressão de mRNA para CYP19A1, PAPP-A e LHR em folículos dominantes e subordinados no momento do desvio folicular em vacas nelore

Jessica Nora Drum[1]; Ricardo Da Silva Surjus[1]; Pedro Leopoldo Jerônimo Monteiro Jr[1]; Mariana Fernandes Machado[2]; Anibal Ballarotti Nascimento[1]; Jose Buratini[1]; Milo Charles Wiltbank[3]; Roberto Sartori[1]
1.ESALQ - USP; 2.UNESP; 3.University Of Wisconsin.

Palavras-chave: Gene; bovino; dominância folicular

O objetivo foi verificar a expressão de mRNA para genes associados ao desvio folicular, *CYP19A1* (Aromatase), receptor de LH (*LHr*) e *PAPPA* (Pappalysin 1) em um modelo de obtenção de células da granulosa *in vivo*. Vacas Nelore (NEL; n=10), não-lactantes, 3 a 6 anos de idade, em delineamento cross-over tiveram a onda sincronizada por meio de aspiração de folículos ≥5 mm. No mesmo momento, receberam um dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR®, Zoetis, Brasil) 24h depois, duas aplicações de 0,5 mg de cloprostenol sódico com 12h de intervalo, seguidas de acompanhamento da regressão do corpo lúteo por ultrassom. Os ovários foram avaliados a cada 12h para a caracterização da dinâmica folicular. Utilizou-se um modelo de estudo com aspiração folicular, dividido em três tratamentos: 0h, no momento em que o maior folículo atingiu 6,5 mm, os dois maiores folículos foram aspirados (FD0h e FS0h); 12h, os dois maiores folículos (FD12h e FS12h) foram aspirados 12h após o maior folículo atingir 6,5 mm; e grupo desvio, onde o maior folículo (FD0h) aspirado quando atinge 6,5mm, e o segundo maior folículo (FS→FD) 12h depois. Células da granulosa foram obtidas por lavagem da cavidade folicular mediante aspirações e ejeções sucessivas com 1mL de solução fisiológica estéril, com um sistema de aspiração de lúmen duplo. A suspensão obtida foi centrifugada e o sobrenadante armazenado para dosagem de estradiol-17β (E2) por ELISA. O pellet foi ressuspendido em tampão de lise do kit RNeasy (Qiagen, SP, Brasil) e submetido a análise de expressão de mRNA por RT-PCR para os genes: *LHR*, *CYP19A1* e *PAPPA*. A análise estatística foi realizada utilizando o PROC MIXED, do SAS. Amostras contaminadas com sangue ou com concentração de E2 abaixo de 1 ng/mL foram retiradas da análise. A concentração intrafolicular de E2 (ng/mL) para FS→FD (176,9±48,8; n=4) diferiu (P≤0,02) do FS0h (34,2±35,8; n=7) e FS12h (28,9±46,0; n=4), e não diferiu (P>0,05) de FD0h e FD12h (FD0h: 188,9±30,3; n=7; FD12h: 244,4±46,0; n=4) comprovando que FS→FD a partir da ausência de um FD0h aumenta a concentração de E2 de maneira semelhante aos folículos dominantes. Não houve diferença (P>0.05) entre os grupos para expressão relativa de mRNA de *PAPPA* (FD0h:0,14±0,05; FS0h: 0,14±0,07; FS→FD: 0,31±0,08; FD12h: 0,14±0,08; e FS12h: 0,14±0,08) e *CYP19A1* (FD0h: 0,38±0,13; FS0h: 0,27±0,15; FS→FD: 0,49±0,20; FD12h: 0,47±0,19; e FS12h: 0,06±0,19). Para *LHR*, houve tendência de aumento na expressão de mRNA nos folículos FS→FD (3,86±1,43) quando comparados ao do grupo 0h (FD0h:0,56±0,86; P=0,07 e FS0h: 0,46±1,08; P=0,06). Não houve diferença entre o aumento da expressão de mRNA no FS→FD e o grupo 12h (FD12h: 5,71±1,43; e FS12h: 1,04±1,43). FD12h teve maior expressão de mRNA em relação ao grupo 0h (FD0h e FS0h; P=0,01) e FS12h (P=0,05). Concluiu-se que o aumento na expressão de receptores de LH foi o fator de maior significância para o estabelecimento da dominância em vacas Nelore.
Agradecimentos: FAPESP, CNPq e Capes.

SBTE 039 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Conteúdo de vesículas extracelulares isoladas de folículos ovarianos bovinos: associação com a competência oocitária

Juliano Coelho Da Silveira[1]; Gabriella Mamede Andrade[1]; Thais Yuri Nakamura[1]; Marcelo Fabio Gouveia Nogueira[2]; Hélio A Martins-Junior3[3]; Roseneide C Simas[4]; Aline S Cesar[5]; Luiz Lehmann Coutinho[5]; Felipe Perecin[1]; Flavio Vieira Meirelles[1]
1.Universidade De São Paulo; 2.Universidade Estadual Paulista; 3.Ab Sciex Do Brasil; 4.UNICAMP; 5. Escola Superior De Agricultura"Luiz De Queiroz" - Universidade De São Paulo.

Palavras-chave: Exossomos; bovinos; fluido folicular

A comunicação intercelular é crucial para induzir a proliferação e diferenciação celular durante o crescimento folicular. Uma consequência do crescimento folicular é a produção de um oócito viável capaz de gerar uma gravidez. Parte da comunicação celular ocorre no fluido folicular (FF). Vesículas extracelulares (EVs), tais como os exossomos e as microvesículas, foram identificadas no fluido folicular e podem mediar a comunicação celular. Vesículas extracelulares podem transferir moléculas bioativas, tais como lipídeos, proteínas, mRNA e miRNAs. Nossa hipótese é que exossomos contidos no fluido folicular apresentam moléculas de mRNA assim como diferente composição lipídica de acordo com a competência do oócito. A fim de testar esta hipótese folículos de ovários bovinos, entre 3-6 mm de diâmetro foram isolados individualmente. Os conteúdos do folículo foram separados sob o estereoscópico para permitir a coleta de fluido folicular (FF) e do complexo cumulus-oócito (CCO). O FF foi submetido à centrifugação diferencial para a remoção de componentes celulares e debris antes de congelar em -80C. CCOs foram maturados *in vitro* por 18h, em seguida, avaliados quanto a presença do 1º corpúsculo polar. Oócitos desnudados foram ativados para gerar embriões partenogenéticos iniciando às 26h após o início da maturação. Depois de sete dias em cultivo os FFs foram agrupados de acordo com a competência oocitária. Grupos de competência foram baseados na capacidade ou incapacidade dos oócitos em maturar e gerar um blastocisto. Com base nos grupos de competência, EVs foram isoladas utilizando grupos de 10 FFs. As amostras foram processadas para a extração de RNA e lipídeos e analisadas por Next Generation Sequencing e espectrometria de massa em tandem. Análise do transcriptoma demonstrou a presença de espécies de mRNAs como por exemplo HDAC2, HDAC10, EIF4E, EIF2B e BRCA1. A análise de anotação funcional do conteúdo de RNA exossomal demonstrou enriquecimento para moléculas de RNA envolvidas na regulação da remodelação de cromatina e ativação da transcrição. Foram identificados seis lipídeos associados à baixa competência dos oócitos; como exemplo o diacilglicerol monoalquenilo MADAG 52: 8 + NH4 (-FA 18: 1 (NH4) e MADAG 48: 8 + NH4 (-FA 16: 1 (NH4). Três lipídeos foram associados com a capacidade para gerar blastocisto, por exemplo, digalactosildiacilglicerol DGDG 36: 2 + NH4 (-DGDG (NH4). Assim, nossos resultados demonstraram que EVs transportam moléculas de mRNA envolvidas na regulação da cromatina. Além disso, os lipídeos são identificados de forma diferente em EVs e estão associadas com a competência dos oócitos. Outros experimentos são necessários para explorar as diferentes moléculas lipídicas presentes nas EVs e seu papel durante o crescimento folicular e maturação do oócito. Financiado pela FAPESP GIFT-2012 / 50533-2; CEPID-CTC-2013 / 08135-2; BPD-2013 / 10473-3.

SBTE 040 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Correlação entre fenótipo, genótipo e população folicular antral em novilhas *indicus-taurus*

Fabio Morotti[1]; Gustavo Martins Gomes Santos[1]; Celso Koetz Júnior[2]; Katia Cristina Silva-Santos[1]; Marcelo Marcondes Seneda[1]
1.UEL; 2.UNOPAR.

Palavras-chave: Contagem de folículos antrais; melhoramento genético; novilhas

O objetivo deste trabalho foi correlacionar características fenotípicas e genotípicas com a contagem de folículos antrais (CFA) em novilhas indicus-taurus. Novilhas Braford (3/8 Nelore x 5/8 Hereford, 18 - 24 meses, n = 270) inseridas no programa de melhoramento genético Conexão Delta G foram avaliadas por ultrassonografia transvaginal com transdutor microconvexo (7,5 MHz) em um dia aleatório do ciclo estral para determinação da CFA (folículos > 3 mm de diâmetro) segundo Burns et al. Biology of Reproduction (2005). Após avaliações da CFA (média de 26,81 folículos), o número de folículos antrais foi correlacionado com os registros do programa de seleção genética utilizando 4 modelos estatísticos com diferentes covariáveis. No modelo 1 (n = 270) considerou-se o efeito do grupo contemporâneo (GC) e as covariáveis: idade (ID); ganho de peso do nascimento a desmama (GD); e escores visuais de conformação a desmama (CD), de precocidade de acabamento a desmama (PD) e de musculatura a desmama (MD). No modelo 2 (n = 270) considerou-se o efeito do GC e as covariáveis: ID; ganho de peso do desmame ao sobreano (GS); e escores visuais de conformação ao sobreano (CS), de precocidade ao sobreano (PS) e de musculatura ao sobreano (MS). O efeito, as variáveis e covariáveis do modelo 1 e 2 foram reunidas para compor o modelo 3 (n = 270). O modelo 4 (n = 270) consistiu nos mesmos parâmetros do modelo 3 com a inclusão do efeito paterno (touro pai da novilha). Os dados foram analisados por regressão linear utilizando-se o procedimento GLM do SAS e adotando $p < 0,05$. Nos quatro modelos testados, as variáveis e covariáveis do sobreano (modelo 2) não apresentaram qualquer efeito sobre a CFA ($p > 0,05$) e o coeficiente de determinação (R2) foi de 0,056. Os outros modelos também apresentaram baixa correlação com a CFA: 0,072 para o modelo 1, 0,082 para o modelo 3 e 0,172 para o modelo 4. O modelo que inclui efeito paterno foi o que melhor explicou geneticamente a correlação entre as características genotípicas e fenotípicas com a CFA. Os modelos 1, 3 e 4 também revelaram que a CFA de novilhas indicus-taurus pode ser influenciada pela precocidade de acabamento ao desmame ($p < 0,05$). Com base neste estudo conclui-se que não há correlação das características fenotípicas e genotípicas com a população de folículos antrais de novilhas *Bos indicus-taurus*, mas a CFA pode ser afetada pela avaliação visual de precocidade de acabamento ao desmame. Podemos sugerir que a CFA torna-se ferramenta útil para os programas de produção *in vitro* de embrião que selecionam fêmeas de alta CFA, devido à superioridade quantitativa na produção embrionária. No entanto, o critério fundamental de seleção deve sempre ser o mérito genético da doadora.

SBTE 041 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Distribuição regional de folículos ovarianos pré-antrais na espécie equina

Suellen Miguez Gonzalez; Camila Bizarro Da Silva; Andressa Guidugli Lindquist; Isabela Búfalo; Lívia Aires Lisboa; Marcelo Marcondes Seneda
Universidade Estadual De Londrina.

Palavras-chave: Folículo pré-antral; região; ovário

O isolamento e cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais na espécie equina é uma técnica emergente com diversos desafios. Além da escassez de abatedouros desta espécie, é comum a ocorrência de colheita de fragmentos nos quais não há folículos pré-antrais. O objetivo do presente estudo foi delimitar regiões específicas, visando aumentar a probabilidade de uma alta concentração de folículos por fragmentos colhidos. Ovários (n=3) de éguas em anestro estacional, procedentes de abatedouro local foram transportados para o laboratório. Cada ovário foi dividido em dois hemiovários (corte longitudinal). Cada hemiovário foi seccionado em três cortes, cada qual contemplando toda a sua extensão, sendo o primeiro corte na região da curvatura menor do ovário (C1; próximo à fossa ovulatória), o segundo na região intermediária entre as curvaturas menor e maior (C2; região parênquima) e o terceiro corte contemplando a curvatura maior do ovário (C3; região mais externa). Após, os fragmentos foram imediatamente fixados em Bouin, mantidos em álcool 70% e processados para histologia clássica. Foram confeccionadas 900 lâminas com 2.700 secções histológicas com espessura de 5 µm. Todos os folículos pré-antrais contendo um oócito foram contados, independentemente do estágio de desenvolvimento (primordial, secundário ou terciário) e da integridade morfológica (normal ou degenerado), perfazendo um total de 1514 folículos. Os dados foram submetidos ao teste de regressão logística simples ($p \leq 0,05$). Todas as regiões apresentaram diferença ($p<0,05$), sendo a maior concentração de folículos encontrada na região da curvatura menor do ovário, próxima à fossa ovulatória, com 41,3% (625/1514; DP=0,49); a região intermediária apresentou 36,9% dos folículos (559/1514; DP= 0,48) e a menor densidade folicular foi encontrada na região mais externa, próxima da curvatura maior do ovário com 21,8% (330/1514; DP= 0,41). Este estudo demonstra que os folículos pré-antrais equinos se concentram em regiões específicas no ovário, e o melhor conhecimento deste aspecto pode aumentar a eficiência dos experimentos de isolamento e cultivo de folículos pré-antrais nesta espécie.

SBTE 042 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Efeito da dieta na produção *in vivo* de embriões de vacas holandesas não-lactantes e não-gestantes

Camila Spies; Monique Mendes Guardieiro; Pedro Leopoldo Jerônimo Monteiro Jr; Louise Helen De Oliveira; Jessica Nora Drum; Leonardo De França E Melo; Cássio Airton Müller; Ueliton Alberto Viegas; Flávio Augusto Portela Santos; Roberto Sartori
ESALQ/USP.

Palavras-chave: Superovulação; embrião; fonte energética

O objetivo do estudo foi avaliar o efeito de duas dietas isoenergéticas e isoproteicas, uma a base de milho e outra a base de polpa cítrica (ambas misturadas com bagaço de cana-de-açúcar), na qualidade e quantidade de embriões produzidos por 25 vacas HPB não-lactantes e não-gestantes. A hipótese é de que uma dieta que gera maior proporção de propionato em relação à acetato no rúmen, à base de polpa cítrica, teria efeitos positivos na produção de embriões. O estudo foi delineado em crossover: dois períodos com duração de 70 dias cada. Foram realizadas duas superovulações (SOV) em cada período, com intervalo de 35 dias entre elas, com o objetivo de avaliar o efeito agudo e crônico da fonte energética. Foi fornecida uma dieta de adaptação 14 dias antes do início do experimento e outra entre um período e outro. A dieta foi balanceada para mantença e foi fornecida em cochos individuais com canzil, a 1% do peso corporal em matéria seca. As vacas eram pesadas a cada 14 dias. Para as SOVs, utilizou-se protocolo com oito doses decrescentes de FSH (Folltropin-V, Bioniche, Canadá) totalizando 300 mg i.m. Foi utilizado sêmen congelado de três touros da raça Holandês que foram balanceados entre os tratamentos. Sete dias após a IA os embriões foram colhidos e classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento (Souza et al., Animal Reprod., v.4, p.70–76, 2007) e qualidade: Graus I e II (Congeláveis), Grau III, Degenerados e Não Fecundados (NF). Exames ultrassonográficos foram realizados ao final do protocolo de SOV para contagem de folículos ≥8 mm. Os dados foram avaliados por meio do ProcMixed do SAS, com nível de significância de 0,05. O peso corporal manteve-se constante durante o período experimental. Não houve diferença no número de embriões congeláveis obtidos por vaca entre os tratamentos milho e polpa cítrica (2,5 ± 0,79 vs. 3,4 ± 0,77, respectivamente; P = 0,24), no número de embriões Grau III (0,8 ± 0,22 vs. 0,5 ± 0,22; P = 0,22), de embriões viáveis (Graus I a III; 3,6 ± 1,01 vs. 4,0 ± 0,99; P = 0,96), de degenerados (2,3 ± 0,48 vs. 2,4 ± 0,47; P = 0,85) e de NF (5,0 ± 1,11 vs. 3,8 ± 1,09; P = 0,21). A taxa de recuperação foi de 60,5 ± 5,86 vs. 56,4 ± 5,77% (P = 0,53) e o estágio de desenvolvimento embrionário médio foi de 4,3 ± 0,08 e 4,3 ± 0,08 (P = 0,85) para os grupos milho e polpa cítrica, respectivamente. Independente de tratamento, a segunda SOV de cada período (efeito crônico) gerou uma menor percentagem de embriões congeláveis por vaca comparada à primeira (17,5 ± 5,39 vs. 33,1 ± 5,14%; P = 0,003), de embriões viáveis (30,0 ± 6,83 vs. 39,3 ± 6,59%; P = 0,05) e de estruturas fecundadas (37,4 ± 6,23 vs. 53,1 ± 5,88%; P = 0,02). O primeiro período teve maior número de folículos ovulados por vaca comparado ao segundo (18,5 ± 1,96 vs. 15,2 ± 1,95; P = 0,04). Conclui-se que não houve efeito da dieta na produção e qualidade dos embriões.
Agradecimentos: FAPESP, CNPq e Carlos A. Rodrigues (SAMVET).

SBTE 043 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Efeito das diferentes concentrações de EGF no cultivo *in vitro* de folículos ovarianos equinos

Andressa Guidugli Lindquist; Marilu Constantino Max; Isabela Búfalo; Camila Bizarro Da Silva; Suellen Miguez Gonzalez; Marcelo Marcondes Seneda; Roberta Gaberlini Gomes; Lívia Aires Lisboa
Universidade Estadual De Londrina.

Palavras-chave: Egf; cultivo *in vitro*; equino

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de EGF (Epidermal Growth Factor) no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais na espécie equina. Ovários (n=5) provenientes de abatedouro local de éguas em anestro estacional foram coletados, lavados em álcool 70o e PBS e transportados em solução de PBS acrescidos de penicilina (200 UI/mL) e estreptomicina (200 UI/mL). A porção interna do ovário foi dividida em 11 fragmentos de aproximadamente 3x3x1 mm. Um fragmento de cada ovário foi imediatamente fixado em Bouin (grupo controle, D0). Os outros 10 fragmentos foram cultivados individualmente em placas de cultivo de 24 poços contendo 1mL de MEM (Gibco BRL, Rockville, MD, USA) (osmolaridade 300 mOsm/L, pH 7,2) suplementado com penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100 mg/ml), albumina sérica bovina (1,25 mg/mL- Gibco BRL, Rockville, MD, USA), ITS (insulina - 6,25 µg/mL, transferrina - 6,25 µg/mL, selênio - 6,25 ng/mL), piruvato (0,23 mM), glutamina (2 mM) e hipoxantina (2 mM). Este meio foi denominado MEM+. O cultivo foi realizado durante 2 ou 6 dias, sendo a troca do meio realizada a cada 2 dias. O meio foi suplementado com diferentes concentrações de EGF (10, 50, 100 e 200 ng/mL). Após o término do cultivo os fragmentos foram fixados em Bouin e processados para histologia clássica. Os folículos foram classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento (primordiais ou em desenvolvimento) e morfologia (normais ou degenerados). Foram avaliadas 825 lâminas contendo 3.300 cortes histológicos. O modelo estatístico utilizado foi Teste de Proporção ($p<0,05$). Aos dois dias de cultivo houve uma maior proporção de folículos viáveis na concentração de 100 ng/mL EGF, com 87,5%, enquanto que MEM teve 44,4%, 10 ng/mL apresentou 22,2%, 50 ng/mL 46,4% e 200 ng/mL 64,9%. Houve desenvolvimento folicular em todas as concentrações de EGF testadas com dois dias de cultivo, sendo a concentração de 100 ng/mL a que apresentou melhor resultado, com todos os folículos em desenvolvimento folicular, enquanto a proporção de folículos em desenvolvimento para MEM foi 50%; para 10 ng/mL 75%; para 50 ng/mL 69,2% e 200 ng/mL foi de 91,7%. Aos seis dias de cultivo as concentrações testadas não apresentaram diferença quanto à viabilidade folicular. Quanto à proporção de folículos em desenvolvimento por seis dias, os melhores resultados foram as concentrações de 10 ng/mL e 50 ng/mL ambas com todos os folículos em desenvolvimento e 200 ng/mL com 85,7%. Portanto, concentração de 100 ng/mLde EGF promoveu a melhor viabilidade aos dois dias de cultivo, enquanto aos seis dias não houve diferença entre os tratamentos. Quanto ao desenvolvimento folicular no cultivo por dois dias, a concentração de 100 ng/mL foi a mais efetiva, enquanto que aos seis dias as concentrações de 10, 50 e 200 ng/mL foram as mais eficazes em promover desenvolvimento. Conclui-se que há uma demanda dinâmica do EGF para o crescimento folicular nesta espécie.

SBTE 044 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Efeito do aumento de insulina circulante sobre o desenvolvimento folicular em vacas holandesas

Louise Helen De Oliveira[1]; Pedro Leopoldo Jerônimo Monteiro Jr[1]; Camila Spies[1]; Anibal Ballarotti Nascimento[1]; Tony Carreira Bruinjé[2]; Bruno Gonzales[3]; Rafaella Miki Hayashi[4]; Milo Charles Wiltbank[5]; Roberto Sartori[1]
1.USP/ESALQ; 2.Faculdade Evangélica; 3.UFLA; 4.UNESP; 5.University Of Wisconsin.

Palavras-chave: Insulina; crescimento folicular; holandês

O objetivo deste estudo foi testar a hipótese de que o aumento da insulina circulante durante os períodos de pré e pós desvio folicular aumenta o desenvolvimento inicial e final do folículo. Foram utilizadas 16 vacas holandesas não lactantes e não gestantes, cujos ciclos estrais foram sincronizados utilizando-se um dispositivo intravaginal de 1,9 g de P4 (CIDR®; Zoetis, SP, Brasil) e injeção intramuscular (i.m.) de 100 µg de GnRH (Diacetato de gonadorelina; Cystorelin®, Merial, Canadá) no dia -12 do protocolo (dia aleatório do ciclo estral). No dia -5, foram administrados 25 mg i.m. de PFG2α (Dinoprost trometamina; Lutalyse®, Zoetis, SP, Brasil). No dia -3, o dispositivo intravaginal de P4 foi removido e os animais receberam 25 mg de PGF2α i.m. Nos dias 10 e 11 ± 1 do ciclo estral, todos os folículos > 5mm foram aspirados para a sincronização da emergência de uma nova onda de crescimento folicular. O segundo dia de aspiração foi considerado o D1 para o experimento. Neste dia, deu-se início aos tratamentos. Para isto, as vacas foram distribuídas em tratamentos que consistiram de água (Controle; C) ou propilenoglicol (P) fornecidos v.o. em quatro doses diárias de 300 mL, a cada 6 horas, por 3 dias consecutivos (D1 ao D3; período pré desvio folicular), e por mais 3 dias consecutivos (D5 a D7; período pós desvio folicular). O delineamento experimental utilizado foi o quadrado latino em arranjo fatorial 2x2. Desta forma, formaram-se quatro grupos experimentais: 1) Grupo CC = água pré e pós desvio folicular (n = 16); 2) Grupo CP = água e propilenoglicol pré e pós desvio folicular, respectivamente (n = 16); 3) Grupo IP = propilenoglicol e água pré e pós desvio folicular, respectivamente (n=16) e 4) Grupo PP = propilenoglicol pré e pós desvio folicular (n=16). Colheitas de sangue foram realizadas 0, 15, 30, 60 e 120 minutos após fornecimento do propilenoglicol para dosagem de insulina. Exames ultrassonográficos ovarianos foram realizados diariamente para avaliação da dinâmica folicular. A análise estatística foi realizada por meio dos procedimentos MIXED do SAS. As concentrações plasmáticas de insulina (µUI/mL) foram maiores para os grupos que receberam propilenoglicol em comparação aos controles (0, 15, 30, 60 e 120 min: 17,5 ± 1,4; 26,3 ± 1,4; 31,2 ± 1,4; 21,8 ± 1,4; 16,9 ± 1,5 vs.12,1 ± 1,5; 11,6 ± 1,5; 11,2 ± 1,5; 10,8 ± 1,5; 11,1 ± 1,5; P ≤ 0,05). Apesar disto, não houve efeito do aumento de insulina circulante (P > 0,05) sobre a taxa de crescimento folicular pré desvio (1,5 ± 0,14; 1,3 ± 0,15; 1,5 ± 0,14; 1,4 ± 0,15 mm/dia) e pós desvio (1,2 ± 0,13; 1,4 ± 0,14; 1,4 ± 0,13; 1,4 ± 0,13 mm/dia), tamanho de folículo ovulatório (15,5 ± 0,56; 16,1 ± 0,55; 15,6 ± 0,52; 15,6 ± 0,54 mm) para os grupos CC, CP, PC e PP, respectivamente. O modelo proposto não comprovou a hipótese de que o aumento de insulina circulante durante os períodos de pré e pós desvio interfere no desenvolvimento folicular. Agradecimentos:CNPq, FAPESP, Lab.Endocrinologia/UNESP-Araçatuba

SBTE 045 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Efeito do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) sobre a morfologia e o desenvolvimento de folículos pré-antrais ovinos cultivados *in situ*

Bruna Bortoloni Gouveia[1]; Maria Éllida Sousa Bezerra[1]; Alane Pains Oliveira Do Monte[1]; Jamile Maiara Da Silva Santos[1]; Ricássio De Sousa Barberino[1]; Taís Jobard Silva Macedo[1]; Vanuzia Gonçalves Menezes[1]; Vanessa Raquel Pinto De Barros[1]; Isabel Bezerra Lima-Verde[2]; Maria Helena Tavares De Matos[1]
1.Universidade Federal Do Vale Do São Francisco-Univasf; 2.Universidade Tiradentes.

Palavras-chave: Ovelha; oócito; crescimento

Estudos *in vitro* demonstraram que o fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) exerce importantes funções na foliculogênese, tais como manutenção da sobrevivência após cultivo de tecido ovariano caprino (MARTINS et al., Animal Reproduction, v.7, n.4, p.349-361, 2010) e crescimento de folículos isolados em vacas (GUTIERREZ et al., Biology of Reproduction, v. 62, p. 1322-1328, 2000). Entretanto, não há relatos do efeito de diferentes concentrações de IGF-1 sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais ovinos inclusos em tecido ovariano. Desta maneira, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do IGF-1 sobre a morfologia e a ativação *in vitro* de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano ovino. Ovários (n=10) de ovelhas adultas sem padrão racial definido foram coletados em abatedouro local e transportados ao laboratório. O córtex ovariano foi dividido em fragmentos, sendo um imediatamente fixado e destinado à histologia (controle fresco). Os demais fragmentos foram cultivados *in vitro* por 7 dias em α-Meio Essencial Mínimo (α-MEM – GIBCO, Invitrogen, St Louis, EUA) suplementado com insulina, transferrina, selênio, hipoxantina, glutamina, ácido ascórbico e BSA (α-MEM$^+$ - meio controle) ou em α-MEM+ adicionado de diferentes concentrações de IGF-1 (1, 10, 50,100 ou 200 ng/mL). Ao término do cultivo, foi realizada a análise morfológica dos folículos pré-antrais através de histologia, sendo estes classificados em normais ou atrésicos de acordo com a ausência ou presença de retração citoplasmática, picnose nuclear e/ou desorganização das células da granulosa, bem como em folículos primordiais ou em crescimento (transição, primários ou secundários). As porcentagens de folículos normais e em cada estádio de desenvolvimento foram comparadas por ANOVA e teste de Tukey ($P<0,05$). Os resultados mostraram que, após 7 dias de cultivo, houve uma redução significativa na percentagem de folículos morfologicamente normais em todos os tratamentos em comparação ao controle fresco. Entretanto, não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre o α-MEM$^+$ e as diferentes concentrações de IGF-1 com relação a esse parâmetro. Em comparação com o controle fresco, observou-se uma redução significativa dos folículos primordiais e um aumento de folículos em desenvolvimento em todos os tratamentos. Além disso, o tratamento 100 ng/mL de IGF-1 promoveu maior ($P<0,05$) ativação folicular, comparado ao α-MEM$^+$. Em conclusão, a concentração de 100 ng/mL de IGF-1 mantém a sobrevivência e promove a ativação de folículos pré-antrais ovinos cultivados *in situ*.

SBTE 046 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Efeito do polimorfismo IGF1 SnaBI sobre parâmetros reprodutivos e metabolismo em vacas leiteiras

Pedro A S Silveira[1]; Ligia Margareth Cantarelli Pegoraro[2]; Walter R Butler[3]; Marcio Nunes Correa[1]; Augusto Schneider[1]
1.UFPEL; 2.Embrapa Clima Temperado; 3.Cornell University.

Palavras-chave: Snp; igf; fertilidade

O fator do crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) é associado ao aumento da capacidade de produção de estradiol folicular, favorecendo o retorno a ciclicidade no pós-parto (Butler et a., 2004). Portanto, é possível que variações genéticas no gene do IGF-1 possam aumentar a eficiência reprodutiva de vacas pós-parto. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de polimorfismos no gene do IGF-1 sobre parâmetros reprodutivos e produção de leite de vacas leiteiras da raça holandês. A genotipagem foi determinada através de eletroforese após a digestão do produto do PCR com a enzima SnaBI. Foram utilizadas 75 vacas da raça holandês acompanhadas desde 21 dias antes do parto até 210 dias em lactação (DEL). Estas vacas foram submetidas a um protocolo OvSynch-IATF quando estavam com 55 DEL, sendo repetido o protocolo nas vacas diagnosticadas como não prenhes aos 30 e 60 dias após a IA. Foram coletadas amostras de leite 2 vezes por semana para determinação da ovulação. Níveis de progesterona acima de 1ng/mL em duas coletas consecutivas foram indicadores de ovulação. Foram avaliados o intervalo do parto até a primeira ovulação (IPO) e o intervalo parto-concepção (IPC). As concentrações séricas de IGF-1 e β-hidroxibutirato (BHBA) foram obtidas através de coleta de sangue nos dias -21, 0, 7, 21 e 60 DEL. Os dados foram comparados através do procedimento GLM do SAS. A distribuição genotípica foi: 14,7% para o genótipo TT, 48% CT e 37,3% CC. Os níveis de IGF-1 na circulação foram 79,2 ± 9,9, 66,5 ± 5,2 e 56,6 ± 5,9 ng/mL para os grupos TT, CT e CC, respectivamente, com uma tendência de efeito linear entre os genótipos (P=0,05). As médias de IPO para vacas TT, CT e CC foram 19,9 ± 4,2, 30,6 ± 2,3 e 30,4 ± 2,5 dias, respectivamente, indicando um menor intervalo (P<0.05) para o genótipo TT. Um efeito linear (P<0.05) foi observado entre os genótipos TT, CT e CC em relação às médias do IPC, que foram 76,9 ± 12,6, 96,9 ± 6,8 e 111,7 ± 7,8 dias, respectivamente. É possível observar que as vacas TT anteciparam o momento da concepção, o que pode estar associado a antecipação da primeira ovulação e aos maiores níveis de IGF-1 sérico. As vacas TT apresentaram valores de BHBA séricos inferiores (P<0.05) às vacas CT e CC 5,0 ± 1,4, 8,2 ± 0,7 e 8,1 ± 0,8 mg/dL, respectivamente. A produção leiteira não diferiu entre os grupos (P>0.05). Em conclusão, o polimorfismo IGF-1 SnaBI(TT) está associado a um reduzido IPO e IPC em vacas leiteiras.

SBTE 047 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Efeito do tipo de fixador e tempo de fixação na morfologia de folículos pré-antrais equinos

Isabela Búfalo; Andressa Guidugli Lindquist; Suellen Miguez Gonzalez; Camila Bizarro Da Silva; Marcelo Marcondes Seneda
Universidade Estadual De Londrina.

Palavras-chave: Tecido ovariano; fixadores; equino

O objetivo deste estudo foi investigar a eficácia dos fixadores teciduais Bouin, Carnoy e Formol em ovários da espécie equina. Ovários de éguas adultas (n=4) sem raça definida foram obtidos de abatedouro e transportados em recipiente térmico. Imediatamente após a coleta, os ovários foram lavados com solução de PBS modificado (Cultilab®, Campinas-SP, Brasil) e divididos em 9 fragmentos com aproximadamente 5x5x1 mm retirados do parênquima de cada ovário. Em seguida, os fragmentos ovarianos foram imersos nos três diferentes fixadores, Bouin (B), Carnoy (C) ou Formol 10% (F), por 6, 12 ou 24 horas. Cada fragmento foi acondicionado individualmente em frascos contendo 20 vezes o volume da solução fixadora. Após este período, foram mantidos em álcool 70% até o processamento. Para cada fixador e tempo foram feitas quatro réplicas. Para processamento histológico, os fragmentos foram desidratados em concentrações crescentes de álcool, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Em seguida, foram feitos cortes seriados de 5 µm em micrótomo rotativo (Leica®, Wetzlar-Alemanha), seguidos da montagem de lâminas e coloração com ácido periódico de Schiff (PAS) e Hematoxilina. Foram avaliadas 540 lâminas com 1.620 cortes histológicos. Os folículos pré-antrais foram classificados como íntegros ou degenerados. A degeneração foi determinada pela presença de pelo menos um dos seguintes aspectos: retração do citoplasma, núcleo picnótico, vacúolos citoplasmáticos, deslocamento das células da granulosa e rompimento da membrana basal. O modelo estatístico utilizado foi Regressão Logística ($p<0,05$). O fixador Carnoy utilizado por 24 horas proporcionou as melhores condições de integridade morfológica de folículos ovarianos (53,3%; 32/60) em relação aos demais, sendo Boiun por 24 h o tratamento menos eficaz (19,1%; 9/47). Os demais tratamentos apresentaram os resultados a seguir: C12h 50% (30/60), C6h 40% (24/60), F24h 37,8% (17/45), F12h 35,1% (13/37), F6h 32% (16/50), B12h 30,5% (18/59) e B6h 24,4% (11/45). A fixação por 24 horas utilizando Carnoy mostrou-se a mais eficaz na preservação morfológica de folículos pré-antrais em tecido ovariano equino.

SBTE 048 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Efeitos de uma dieta rica em gordura e energia sobre a expressão gênica ovariana em camundongos fêmeas jovens e velhas

Joao Alveiro Alvarado Rincón[1]; Driele N. Garcia[1]; Ligia Prietsch[1]; Sandra C. Valle[1]; Elizabete Helbig[1]; Carlos C. Barros[1]; Ligia Margareth Cantarelli Pegoraro[2]; Augusto Schneider[1]
1.UFPEL; 2.EMBRAPA.

Palavras-chave: Igf; amh; envelhecimento

Estudos indicam que dietas ricas em gordura podem ter efeitos negativos sobre a atividade ovariana e que o envelhecimento reduz a fertilidade feminina devido à diminuição da reserva oocitária e de sua qualidade no ovário. A via metabólica PI3K/AKT1 junto ao fator de transcrição FOXO3a são importantes reguladores da proliferação e sobrevivência celular, estando envolvidos na ativação dos folículos primordiais. Baseando-se nessas informações, objetivou-se determinar os efeitos de uma dieta rica em gordura e energia sobre a expressão ovariana de diversos genes (AMH, IGF-1, AKT1, PI3K, MTOR, BMP15, CAT, SIRT1 e FOXO3) em camundongos fêmeas jovens e velhas. Foram utilizados 20 camundongos fêmeas (C57BL/6) com quatro ou treze meses de idade (jovens: n=10, velhas: n=10) divididas em quatro grupos: fêmeas jovens/dieta-controle (JC); fêmeas jovens/dieta-hiperlipídica (JH); fêmeas velhas/dieta-controle (VC) e fêmeas velhas/dieta-hiperlipídica (VH). Ambas as dietas continham 14,1% de proteína bruta. No entanto, a dieta controle teve 75,9% de carboidratos, 10,0% de lipídios e 3.061 kcal/100 g de energia, enquanto a dieta rica em gordura continha 54,6%; 32,7% e 4.402 kcal/100 g, respectivamente. As fêmeas foram alimentadas durante 55 dias, sendo o consumo alimentar medido a cada dois dias e massa corpórea aferida semanalmente. Após a eutanásia, foram coletados os ovários, extraído o RNA pelo método Trizol® (Invitrogen, EUA), o RNA foi convertido em cDNA (Biorad, Hercules, CA, EUA) e a expressão dos genes alvo foi avaliada por qRT-PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) usando a β2–microglobulina como controle endógeno. Para análise estatística foi aplicado o teste two-way ANOVA (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA) para o efeito da idade, da dieta e de sua interação com a expressão dos genes alvo. Foi observada redução de 67% na expressão ovariana do gene AMH nas fêmeas velhas comparando com as fêmeas jovens ($P<0,05$). Além disso, observou-se expressão 46% menor do IGF-1 nas fêmeas alimentadas com a dieta rica em gordura ($P<0,05$), assim como menor consumo de alimento, quando comparadas às alimentadas com a dieta controle ($P<0,05$; 2,9 +- 0,1 e 3,9 +- 0,1, respectivamente). Estes resultados são compatíveis com estudos anteriores, os quais sugerem que o IGF-1 pode estar envolvido no esgotamento precoce das reservas oocitárias do ovário (Schneider et al., 2015; J Ovarian Res 7:120). Adicionalmente, observamos que as fêmeas recebendo dieta hiperlipídica apresentaram maior ganho de peso em comparação às fêmeas recebendo dieta controle ($P<0,05$; 28% e 9% de ganho, respectivamente). Conclui-se que houve redução na expressão do IGF-1 no ovário das fêmeas alimentadas com a dieta rica em gordura, o que pode ser um fator modulador da taxa de envelhecimento ovariano.

SBTE 049 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Efeitos do fator de crescimento dos fibroblastos 8 sobre a progressão da meiose e expansão do cumulus em complexos cumulus-oócito bovinos submetidos à maturação *in vitro* com ampirregulina

Lorena Sanches[1]; Ana Caroline Silva Soares[1]; Rodrigo Garcia Barros[1]; Paula Fernanda De Lima[1]; Christopher Price[2]; Jose Buratini[1]
1.UNESP; 2.Universidade De Montreal.

Palavras-chave: Fgf8; maturação oocitária; areg

O fator de crescimento dos fibroblastos 8 (FGF8) é expresso pelo oócito bovino e contribui para o bloqueio meiótico em camundongos via regulação da expressão do receptor NPR2 nas células do cumulus e, consequentemente, dos níveis de GMPc. Estudos recentes sugerem que a substituição do FSH pela ampirregulina (AREG) na maturação *in vitro* (MIV) pode melhorar o desenvolvimento embrionário. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do FGF8 na expansão do cumulus e progressão da meiose durante a MIV induzida com AREG. Complexos cumulus-oócitos (CCOs) foram aspirados de ovários provenientes de abatedouro e cultivados (graus 1 e 2) em grupos de 20 em 400 µL de TCM 199 suplementado com BSA a 0,4%, piruvato de sódio a 22 µg/mL, amicacina a 75 µg/mL, AREG a 100 ng/mL e FGF8 nas doses de 0, 10 e 100 ng/mL, a 38,5ºC com 5% de CO2 e máxima umidade. O grau de expansão foi avaliado após 22 horas do cultivo (n=5 réplicas) usando um método subjetivo (graus 1, 2 e 3, sendo 1: expansão pobre, 2: expansão parcial e 3: expansão completa), enquanto que a progressão da meiose foi avaliada às 6 (n=4 réplicas) e às 22 horas (n=5 réplicas) do cultivo. Para avaliação da maturação nuclear, os oócitos foram desnudados mecanicamente, fixados, corados com Hoechst 33342, examinados em microscópio de fluorescência e classificados em vesícula germinativa (VG) ou com rompimento da vesícula (GVBD) às 6 horas, e em MI (metáfase I) ou MII (metáfase II) às 22 horas do cultivo. Os dados foram expressos em porcentagens e transformados em arcoseno para testar os efeitos dos tratamentos por ANOVA, seguida pelo teste Fisher Protected. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. O FGF8 na dose de 100 ng/mL aumentou a porcentagem de oócitos em VG em relação ao controle às 6 horas do cultivo (37,4±7,9%; 49,8±5,6% e 59,3±4,8% de VG para 0, 10 e 100 ng/mL de FGF8, respectivamente), mas não alterou as taxas de MI (22,7 ± 2,4%; 16±5% e 25,3±8,9%) e MII (77,2±2,3%; 83,8±5,03% e 74,5±8,9% para 0, 10 e 100 ng/mL de FGF8, respectivamente), nem a expansão do cumulus às 22 horas (63,3±15,8%; 56,6±22,1% e 56,6±27,4% de CCOs com grau 3 para 0, 10 e 100 ng/mL de FGF8, respectivamente). Conclui-se que a adição de FGF8 ao meio de cultivo é capaz de retardar o rompimento da vesícula germinativa em oócitos bovinos submetidos à MIV com AREG sem comprometer as taxas de meiose ao final do cultivo.

SBTE 050 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Efeitos do hormônio folículo estimulante (FSH) e da ampirregulina (AREG) sobre a dinâmica da meiose de oócitos bovinos submetidos à maturação *in vitro*

Ana Caroline Silva Soares[1]; Lorena Sanches[1]; Rodrigo Garcia Barros[1]; Paula Fernanda De Lima[1]; Valentina Lodde[2]; Alberto M. Luciano[2]; Christopher Price[3]; Jose Buratini[2]
1.UNESP - Campus Botucatu; 2.Universitá Degli Studi Di Milano; 3.Universidade De Montreal.

Palavras-chave: Meiose; areg; fsh

A meiose oocitária é interrompida na prófase I no início da foliculogênese e retomada após o pico ovulatório de LH, que induz a quebra da vesícula germinativa (QVG) e a progressão da maturação nuclear até a metáfase II (MII). A retomada da meiose está associada a quedas na transcrição/tradução oocitária e na comunicação intracelular dentro do complexo cumulus-oócito. Portanto, a retomada precoce da meiose pode comprometer a fertilidade do oócito. As influências do LH no folículo ovulatório e a do FSH na maturação *in vitro* (MIV) são mediadas pelos fatores semelhantes ao EGF, dentre eles a ampirregulina (AREG), produzidos pelas células da granulosa murais e do cumulus. Estudos recentes sugerem que a substituição do FSH pela AREG na MIV pode beneficiar a competência oocitária. Este estudo teve como objetivo avaliar a dinâmica da meiose em oócitos cultivados com FSH ou AREG. Testou-se a hipótese de que o estímulo direto com AREG antecipa a maturação nuclear. Complexos cumulus-oócito (CCOs) foram aspirados de ovários bovinos obtidos em abatedouro e submetidos à MIV por 6 horas em TCM 199 suplementado com BSA (0,4%), amicacina (75µg/mL), piruvato (22µg/mL) e FSH (1µL/mL; n=81) ou AREG (100ηg/mL; n=59). Os cultivos foram realizados em 7 replicatas. Após o cultivo, os oócitos foram separados mecanicamente das células do cumulus e fixados em solução de paraformaldeído 4%, corados com Hoescht-33342 e examinados por microscopia de fluorescência para avaliação da retomada da meiose. Os dados foram transformados em arco-seno e os grupos comparados pelo teste t de Student, considerando-se valores de P<0,05 significativos. A suplementação com AREG resultou em menor porcentagem de oócitos em vesícula germinativa (39,12%±6,6 vs. 61,06%±5,12; P=0,04) e maior porcentagem de oócitos em MI (23,59%±5,5 vs. 9,93±1,04; P=0,04) em comparação ao FSH. A porcentagem de oócitos em QVG não diferiu entre os tratamentos (P=0,1). Os dados presentes indicam que a AREG induz a maturação nuclear de forma mais rápida que o FSH.

SBTE 051 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Expressão do receptor de LH em células do cumulus oophorus é modulada pelo diametro folicular e pelo estimulo das gonadrotrofinas

Ramon Cesar Botigelli[1]; Mariana Fernandes Machado[1]; Patrícia Kubo Fontes[1]; Eduardo Montanari Razza[1]; Elisa M Pioltine[2]; Cláudia Lima Verde Leal[3]; Ciro Moraes Barros[1]; Marcelo Fabio Gouveia Nogueira[2]
1.Instituto De Biociências - UNESP Botucatu; 2.Faculdade De Ciências E Letras - UNESP Assis; 3.Faculdade De Zootecnia E Engenharia De Alimentos - USP Pirassununga.

Palavras-chave: Células do cumulus; oócito; receptor de lh

A reprodução em mamíferos depende e é regulada pela liberação pulsátil das gonadotrofinas LH e FSH, que juntas agem regulando a função gonadal. Em folículos ovarianos, o LH influência o desenvolvimento folicular até a ovulação, cuja ação depende da interação com seu receptor (LHR). No entanto, não há consenso quanto ao uso do LH durante a maturação *in vitro* (MIV) de complexos cúmulus oócito (CCOs) bovinos. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi caracterizar o padrão da expressão do gene LHR em CCs e oócitos oriundos de folículos bovinos com diferentes diâmetros e submetidos à MIV. Ovários foram coletados em abatedouro comercial, os folículos dissecados e separados nos grupos do experimento 1, G1: 3-6mm e G2: >6-10mm. Em placas de Petri, os folículos foram rompidos e o COC recuperado. Foram utilizados pools de 25 COCs imaturos/grupo, onde as CCs foram separadas mecanicamente dos oócitos e ambos armazenados separadamente. No experimento 2, folículos 3-8mm foram aspirados, os COCs foram recuperados e submetidos à MIV (25 COCs/grupo) em gotas (100ul em óleo mineral) de meio MIV (TCM199, piruvato de sódio, 0,4% de BSA e amicacina) em 38,5° C e 5% de CO2 em ar durante 24h. Os grupos experimentais foram divididos em controle (meio MIV); rhLH (MIV+0,01 rhLH); e rhFSH (MIV+0,01 rhFSH). Após a MIV as CCs oriundas dos 25 COCs foram separadas dos oócitos e ambos armazenados. Todas as amostras foram submetidas à extração de RNA total com Trizol e transcrição reversa com HighCapacity. Para o RT-qPCR foram utilizados primers para o gene alvo (LHR) sem diferenciação de isoformas e o PPIA foi usado como controle endógeno. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados foram analisados por ANOVA seguida pelo teste de Tukey (5% de significância). Não houve detecção de mRNA de LHR em nenhuma amostra de oócito (experimentos 1 e 2). Experimento 1 – Para as CCs de folículos de diferentes tamanhos detectamos expressão de mRNA de LHR nos dois grupos experimentais, no entanto, estes não diferiram entre si (P>0,05). Experimento 2 – Nos grupos maturados, a presença do mRNA do LHR foi detectada nos grupos rhLH e rhFSH (P>0,05) e ausente no grupo controle. Sugere-se com o experimento 1 que o crescimento do folículo parece não afetar a abundância do mRNA do LHR em CC. No experimento 2, a abundância de mRNA do LHR em CC foi observada apenas nos grupos em que gonadotrofinas (rhLH e rhFSH) foram adicionados à MIV, sugerindo que o FSH e o LH estimulam a expressão do receptor do LH nas células do cumulus. Apoio Financeiro FAPESP: 2013/050831 e 2014/250727.

SBTE 052 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Expressão dos receptores de ativina durante a divergência folicular e luteólise em bovinos

Gustavo Freitas Ilha[1]; Monique Tomazele Rovani[1]; Vitor Braga Rissi[1]; Mariana Priotto De Macedo[1]; Fabrício Amadori Machado[1]; Rogério Ferreira[2]; Bernardo Garziera Gasperin[3]; Vilceu Bordignon[4]; Paulo Bayard Dias Gonçalves[1]
1.UFSM; 2.UDESC; 3.UFPEL; 4.MCGILL.

Palavras-chave: Divergência folicular; corpo lúteo; tgfbeta

Muitos fatores de sinalização atuam nas células da teca, granulosa e oócito contribuindo para a proliferação e diferenciação folicular no ovário. Neste contexto, os membros da superfamília do fator de crescimento e diferenciação β (TGFβ) estão sendo estudados. Os receptores tipo II da ativina modulam os sinais dos ligantes TGFβ enquanto o betaglycan é um co-receptor que potencializa a ação dos ligantes que atuam nestes receptores tipo II. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi estudar os níveis de RNAm para os receptores de ativina tipo I (ACVR1A, ACVR1B), tipo II (ACVR2A e ACVR2B) e betaglycan durante a divergência folicular e luteólise em bovinos. Ovários foram coletados por colpotomia e as células da granulosa dos dois maiores folículos isoladas antes (dia 2; F1 e F2; n=4), durante (dia 3; folículo dominante (FD) e subordinado (FS); n=4) ou após (dia 4; FD e FS; n=6) a divergência. Para a análise das células luteais durante a luteólise, corpos lúteos foram dissecados dos ovários após coleta por colpotomia nas horas 0 (controle), 2, 12, 24 e 48 horas após o tratamento com PGF2α no dia 10 após a detecção do estro (n=4-5 por grupo). A validação do modelo de divergência folicular se deu através da expressão de CYP19A1, que foi maior nos FD (P<0,05) durante e após a divergência folicular. Para validação do modelo da luteólise, mensurou-se a concentração de progesterona no soro, que diminuiu na hora 2, seguida de uma redução aos níveis basais 24 horas após o tratamento com PGF, sugerindo uma luteólise funcional. Os dados foram testados quanto à distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk, normalizados quando necessário e submetidos à ANOVA. Níveis de RNAm para ACVR2A foram maiores (P<0,05) em F1 antes da divergência (dia 2) em relação a folículos dominantes (DF) após a divergência (dia 4), enquanto que a expressão de RNAm para ACVR1B diminuiu em folículos saudáveis (F1 e DF) e atrésicos (F2 e SF) nos mesmos períodos. Já ACVR1A e ACVR2B não apresentaram regulação nos níveis de RNAm na divergência folicular. Os níveis de betaglycan foram maiores (P<0,05) em SF em relação a DF durante a divergência folicular (dia 3). Na luteólise, níveis de RNAm para ACVR2A apresentaram um pico nas 2h (P<0,05) diminuindo às 48h posteriormente ao tratamento com PGF. Os resultados indicam que que os receptores de ativina são regulados no decorrer na divergência folicular e luteólise, enquanto que o co-receptor betaglycan é regulado no momento esperado da divergência folicular, o que sugere um potencial papel na regulação desses processos ovarianos.

SBTE 053 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Fator de crescimento epidermal (EGF) induz a proliferação celular durante o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais ovinos

Luciana Da Paz Dos Santos[1]; Jamile Maiara Da Silva Santos[1]; Vanuzia Gonçalves Menezes[1]; Ricássio De Sousa Barberino[1]; Bruna Bortoloni Gouveia[1]; Agnes Yasmin Pitombeira Cavalcante[1]; Thae Lanne Barbosa Gama Lins[1]; Rodrigo José De Sousa Gonçalves[1]; Juliana Jales De Hollanda Celestino[2]; Maria Helena Tavares De Matos[1]
1.Universidade Federal Do Vale Do São Francisco-Univasf; 2.Universidade Da Integração Internacional Da Lusofonia Afro-Brasileira.

Palavras-chave: Oócito; mitose; ativação

Sistemas eficientes de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais podem promover o crescimento do oócito e a proliferação das células somáticas. Após cultivo *in vitro* de tecido ovariano ovino, observou-se que o meio controle (α-MEM$^+$) sozinho ou adicionado de 1 ng/mL do Fator de Crescimento Epidermal (EGF) promove o início do desenvolvimento de folículos primordiais, processo também chamado de ativação folicular (SANTOS et al., 2013, Anais da XXVII Reunião Anual da SBTE). Entretanto, ainda não há informações acerca do crescimento oocitário e da proliferação das células da granulosa. Assim, o objetivo deste trabalho foi determinar o efeito do EGF (1 ng/mL) sobre o diâmetro oocitário e a proliferação de células da granulosa após cultivo *in vitro* de tecido ovariano ovino. Após a coleta de ovários (n=10) de ovelhas sem padrão racial definido em abatedouro local, o córtex ovariano foi dividido em fragmentos, sendo um imediatamente fixado e destinado à histologia (controle fresco). Os demais fragmentos foram cultivados *in vitro* por 7 dias em α-Meio Essencial Mínimo (α-MEM$^+$ – GIBCO, Invitrogen, St Louis, EUA) suplementado com ITS (10 µg/mL de insulina, 5,5 µg/mL de transferrina e 5,0 ng/mL de selênio), 2 mM de glutamina, 2 mM de hipoxantina, 1,25 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA) e 50 µg/mL de ácido ascórbico (α-MEM+ - meio controle) ou em α-MEM$^+$ adicionado de 1 ng/mL de EGF. Após cultivo, os fragmentos foram destinados à histologia, o diâmetro oocitário foi mensurado e a técnica de imunohistoquímica foi realizada para a detecção do Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA; 1:500; Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA, EUA). As células em proliferação ou PCNA-positivas (marrons) foram contadas nas secções e expressas em percentagem. O diâmetro foi analisado por ANOVA e as porcentagens de células PCNA-positivas foram comparadas pelo teste do Qui-quadrado ($P<0,05$). Os resultados mostraram que não houve nenhuma influência do α-MEM$^+$ ou do EGF sobre o diâmetro oocitário após cultivo *in vitro*. Com relação à proliferação celular, verificou-se que o meio suplementado com EGF apresentou mais células PCNA-positivas (55,0%) do que o controle fresco (13,0%) e o meio controle (5,0%). Em conclusão, 1 ng/mL de EGF promove proliferação das células da granulosa de folículos pré-antrais após cultivo *in vitro* de tecido ovariano ovino.

SBTE 054 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Incremento da viabilidade de folículos pré-antrais de fêmeas *Bos indicus* cultivados *in vitro* pela adição do hormônio folículo estimulante (FSH)

Camila Bizarro Da Silva; Suellen Miguez Gonzalez; Maira Moreira Santos; Isabela Búfalo; Andressa Guidugli Lindquist; Lívia Aires Lisboa; Marcelo Marcondes Seneda
Universidade Estadual De Londrina.

Palavras-chave: Cultivo *in vitro*; *Bos indicus*; fsh

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da adição do FSH ao meio de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais de fêmeas *Bos indicus*. Ovários (n=10) foram coletados em abatedouro local de cinco fêmeas Nelore adultas cíclicas com escore corporal entre 2,5 a 3,5 (escala de 0 a 5). Os ovários foram lavados em etanol 70% e PBS (Embriolife®, Vitrocell, Brasil). O tecido circundante dos ovários foi retirado e os ovários foram seccionados longitudinalmente. O córtex do ovário foi dividido em fragmentos de aproximadamente 3x3x1 mm. Um fragmento por animal foi imediatamente fixado em Bouin (controle não-cultivado, D0). Os demais fragmentos (n=8) foram cultivados individualmente em placas de cultivo de 24 poços contendo 1 mL de meio essencial mínimo (MEM, Gibco BRL, Rockville, MD, USA; osmolaridade 300 mOsm/L, pH 7,2) suplementado (MEM+) com ITS (6,25 mg/mL insulina, 6,25 mg/mL transferina, e 6,25 ng/mL selênio), 0,23 mM de piruvato, 2 mM glutamina, 2 mM hipoxantina, 1,25 mg/mL de BSA (Gibco BRL, Rockville, MD, USA), 20 UI/mL de penicilina e 200 mg/mL de estreptomicina. Os reagentes não especificados foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO, USA). Ao meio MEM+ foram adicionadas diferentes concentrações (50, 100 e 200 ng/mL) de FSH (Folltropin®, Bioniche Canadá Inc, Ontário, Canadá). O cultivo *in vitro* dos meios testados ocorreu por dois (D2) ou seis (D6) dias. A cada dois dias, os meios de cultivo eram substituídos por alíquotas frescas. Para a análise da integridade e grau de desenvolvimento dos folículos utilizou-se a histologia clássica com coloração de Ácido Periódico de Shiff (PAS) e Hematoxilina. A classificação baseou-se na avaliação do estágio de desenvolvimento folicular (primordial, primário e secundário) e quanto à integridade morfológica em normal ou degenerado. Os dados foram submetidos à ANOVA ($p \leq 0,05$). Foram avaliados 2250 folículos pré-antrais (normais ou degenerados), dos quais 772 eram folículos primordiais e 1478 em desenvolvimento. Após dois dias de cultivo, a concentração de 100 ng/ml de FSH apresentou maior proporção (51,2%; 128/250) de folículos morfologicamente íntegros ao se comparar às demais concentrações testadas: 27,2%, (68/250) para MEM; 30,4% (76/250) para 50ng/mL; 45,2% (113/250) para 200ng/mL ($p<0,05$). A maior porcentagem de folículos em desenvolvimento também foi obtida na concentração de 100 ng/ml (91,8%; 112/122). Após seis dias de cultivo, as concentrações de 100 e 200 ng/mL de FSH possibilitaram um maior percentual de folículos morfologicamente íntegros (40,4%, 101/250 e 36,8%, 92/250, respectivamente), quando em comparação a concentração de 50 ng/ml. Para a taxa de desenvolvimento em D6 não houve diferença entre as concentrações testadas ($p>0,05$). Concluímos que MEM+ suplementado com 100 ng/mL FSH por dois ou de seis dias de cultivo *in vitro* foi o tratamento mais efetivo em proporcionar desenvolvimento e integridade morfológica dos folículos pré-antrais em animais *Bos indicus*.

SBTE 055 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Injeção intrafolicular com agonista do pparγ na divergência folicular em vacas

Juliana Germano Ferst[1]; Rogério Ferreira[2]; Monique Tomazele Rovani[1]; Andressa Minussi Pereira Dau[1]; Bernardo Garziera Gasperin[3]; Alfredo Quites Antoniazzi[1]; Dimas Estrasulas Oliveira[2]; Paulo Bayard Dias Gonçalves[1]
1.UFSM; 2.UDESC; 3.UFPEL.

Palavras-chave: Divergência folicular; pparg; vacas

O receptor ativado por proliferador de peroxissomo gama (PPARγ) pertence à família de receptores nucleares PPAR expressos no tecido reprodutivo de diferentes espécies. PPARs atuam na regulação da apoptose e controle do ciclo celular, afetando também a síntese e o metabolismo do estradiol. Em ratos, a expressão deste receptor aumenta de acordo com o crescimento folicular e diminui após o pico do LH. Em ovelhas e búfalas, a expressão do PPARγ é restrita primariamente a células da granulosa de folículos em desenvolvimento, tendo maior expressão em folículos pequenos. Estes receptores podem ser ativados por ligantes sintéticos como as Thiazolidinediones (TZD), uma família de drogas que aumentam a sensibilidade à insulina e atuam como agonistas do PPARγ. A hipótese do presente estudo é que a sinalização via PPARγ está relacionado com a atresia folicular e, portanto envolvido na divergência folicular em espécies monovulatórias. Para testar essa hipótese, o objetivo do presente estudo foi avaliar se a injeção intrafolicular com agonista de PPARγ (TZD) inibe o crescimento do folículo dominante. Vacas *Bos taurus* tiveram a emergência de uma nova onda folicular induzida utilizando-se um dispositivo intravaginal contendo progesterona (1 g de progesterona, DIB-Intervet Schering Plough, Brasil) e injeção i.m. com 2 mg de benzoato de estradiol (Genix, Anápolis, Brasil). Quatro dias após, o dispositivo foi retirado e realizada injeção i.m. com análogo da PGF2α (cloprostenol, 250 µg; Schering-Plough Animal Health, Brasil). Os ovários foram então monitorados diariamente por ultrassonografia transretal utilizando transdutor linear com 8 MHz (Aquila Vet scanner, Pie Medical, Netherlands). Quando o maior folículo atingiu o diâmetro de 7 ou 8 mm (dez vacas), os animais foram divididos em dois grupos para receber injeção intrafolicular com 50 µM TZD (n=5) ou PBS (n=5). O volume da injeção intrafolicular foi ajustado de acordo com o tamanho do folículo com objetivo de obter a concentração final, dentro do folículo, de 50µM de TZD em todos os folículos. Os folículos injetados, de acordo com a técnica descrita por Ferreira et al. (Reproduction, 134, 713-9, 2007), foram monitorados através da ultrassonografia por três dias após a injeção. O tamanho médio dos folículos injetados com PBS foi 7.5±0.1 mm, 8.3±0.5 mm, 9.9±0.5 mm e 10.9±0.3 mm nas 0, 24, 48 e 72 h após o tratamento, respectivamente. No entanto, folículos injetados com TZD pararam seu crescimento e a curva dos tamanhos foliculares foi estatisticamente diferente do grupo controle (7.6±0.1 mm, 6.4±0.3 mm, 5.2±0.4 mm e 5.0±0.3 mm nas 0, 24, 48 e 72 h após o tratamento, respectivamente). O tratamento com TZD inibiu o crescimento folicular em todas as vacas (5 das 5) e os folículos injetados com PBS continuaram crescendo (5 das 5). Em conclusão, o aumento da sinalização do receptor PPARγ inibe o desenvolvimento folicular e pode estar envolvido na seleção do folículo dominante em bovinos.

SBTE 056 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Melatonina na maturação *in vitro* e seu efeito sobre a expressão de genes antioxidantes e relacionados à apoptose de complexos cumulus-oócito murinos

Hugo Fernandes; Fernanda Cavallari Castro; Katia Lancellotti Schwarz; Cláudia Lima Verde Leal
Departamento De Medicina Veterinária, Faculdade De Zootecnia E Engenharia De Alimentos – FZEA/USP.

Palavras-chave: Melatonina; miv; camundongo

A melatonina (MEL) é um hormônio sintetizado principalmente na pineal e relacionado ao controle do ciclo circadiano, além da estacionalidade reprodutiva de algumas espécies. Além dessas funções, a MEL atua também como um potente antioxidante e antiapoptótico. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da adição de melatonina durante a maturação *in vitro* (MIV) sobre a maturação nuclear e a expressão de genes relacionados à ação antioxidante e à apoptose em células do *cumulus* (CC) e oócitos (OO) murinos. Fêmeas F1 híbridas (n=20; C57BL/6 x CBA) foram submetidas à injeção intraperitonial de eCG (5UI/0,1 mL/animal) e, 48h após, os complexos *cumulus*-oócito (CCOs) coletados. Os CCOs (n=25 por grupo/tratamento) foram selecionados aleatoriamente e maturados *in vitro* com melatonina (10^{-9}, 10^{-6} e 10^{-3} M) ou 0,5 µg/mL de FSH (controle) por 17h em incubadora à 37ºC e 5% de CO_2 em ar. Utilizou-se somente melatonina e não sua associação com FSH a fim de se avaliar sua ação individual sobre a MIV e expressão gênica. A taxa de maturação foi avaliada pela presença do primeiro corpúsculo polar sob microscópio invertido. A expressão gênica foi avaliada por PCR quantitativo em tempo real (4 repetições) para os genes BAX e BCL2L1 (apoptose) e; GPX1, SOD1 e SOD2 (antioxidantes) em CC e OO. Como controle endógeno, foi utilizada a média geométrica dos genes H2AFZ e HPRT1. As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA, seguida de pós-teste de Tukey (4 repetições), com nível de significância de 5%. Não houve diferença significativa (P>0,05) entre os grupos maturados com melatonina nas suas diferentes dosagens (56,0%, 56/100; 53,7%, 51/95; e 48,9%, 43/88; para 10^{-9}, 10^{-6} e 10^{-3} M de MEL, respectivamente) em comparação com o grupo controle (57,3%, 55/96; FSH). Para os genes antioxidantes GPX1 e SOD1, nas dosagens de 10^{-9} e 10^{-6} M de MEL, a expressão foi aumentada (P=0,0006 e 0,0045, respectivamente) em comparação ao controle para CC. Já para OO, somente o grupo tratado com 10^{-6} M de MEL mostrou um efeito negativo com o aumento da expressão (P=0,0208) do gene pró-apoptótico BAX. Para os demais genes avaliados não houve diferença entre os tratamentos (P>0,05). Em conclusão, sob as condições estudadas, a MEL não foi capaz de melhorar a taxa de MIV, porém, sozinha foi tão eficiente quanto o FSH em promover a maturação em OO murinos, indicando seu potencial efeito na estimulação da meiose. Na análise de PCR quantitativo em tempo real, o grupo tratado com MEL (10^{-9} M) apresentou maior expressão de enzima antioxidante, o que sugere a capacidade de melhorar a ação antioxidante nas CC. Agradecimentos: FAPESP (bolsa - HF e auxílio financeiro - CLVL).

SBTE 057 Foliculogênese, oogênese e ovulação

O fator de crescimento dos fibroblastos 10 (FGF10) e a proteína morfogenética óssea 15 (BMP15) inibem a apoptose nas células do cumulus de complexos cumulus-oócito bovinos submetidos à maturação *in vitro*

Rodrigo Garcia Barros[1]; Debora Jardina Sartor[1]; Paula Fernanda De Lima[1]; Lorena Sanches[1]; Ana Caroline Silva Soares[1]; Camila Paula Freitas-Dell`Aqua[1]; Fernanda Fagali Franchi[1], Fernanda Cruz Landim Alvarenga[1]; Christopher Price[2]; Jose Buratini[1]
1.UNESP - Botucatu; 2.Universidade De Montreal.

Palavras-chave: Células do cumulus; apoptose; fgf10

Fatores secretados pelo oócito (FSOs) regulam a apoptose nas células do cumulus (CC). FGF10 e BMP15 são OSF que potencializam a expansão do cumulus e o desenvolvimento embrionário quando adicionados ao meio de maturação. A progesterona tem ação anti-apoptótica nas CC e é essencial para a competência oocitária. Este estudo avaliou a influência da BMP15 e do FGF10, sozinhos ou combinados, sobre a apoptose, expressão de genes relacionados à apoptose (FAS, PUMA, BAX, BCL2, BIRC4, MDM2 e nPR) e produção de progesterona em complexos cumulus-oócito (COC) bovinos submetidos à MIV. Grupos de 20 COCs (graus 1 e 2), aspirados de folículos de 3-8mm de ovários de abatedouro foram cultivados por 22 horas em 450µL de meio de maturação (TCM199 contendo sais de Earle suplementado com 0,4%BSA; 1µl/mL FSH; 22µg/ml piruvato de sódio, 75µg/ml amicacin) sem fatores de crescimento (grupos controle) ou suplementado com FGF10 (R&D Systems,10ng/mL) ou BMP15 (R&D Systems, 100ng/mL), ou FGF10 e BMP15 combinados (5 réplicas para expressão gência e progesterona, 8 réplicas para apoptose). Após a MIV, as CC e oócitos foram separados mecanicamente e as CC foram coradas com iodeto de propídeo (PI) e Anexina-V APC (BD Biosciences Pharmingen) e contadas em citômetro de fluxo para quantificação de células viáveis (PI-/A-), em apoptose inicial (PI-/A+), apoptóticas (PI+/A+) e necróticas (PI+/A-). As concentrações de progesterona foram mensuradas no meio de cultura por radioimunoensaio (Kodalmedical, IgAc). A abundância dos RNAm codificando fatores pro e anti-apoptóticos foi avaliada por RT-qPCR, com valores normalizados pela expressão da CYC-A. Os efeitos dos tratamentos foram testados por ANOVA e as médias comparadas pelo teste "Fisher protected". O FGF10 aumentou a porcentagem de células viáveis (66±2.4, 81.9±3.2, 72±3.2 e 71.9±3.5 para controle, FGF10, BMP15 e FGF10+BMP15, respectivamente), diminuiu a porcentagem de células apoptóticas (22.7±2.1, 7.2±1.1, 19.7±2.9 e 21.9±2.7) e aumentou a razão BCL2/BAX (0.7±0.1, 1.2±0.1, 0.5±0.1 e 0.7±0.1). A combinação de FGF10+BMP15 diminuiu a porcentagem de células em apoptose inicial (6.9±1.3, 7.7±2.3, 4.4±0.8 e 2.7±0.4 para controle, FGF10, BMP15 e FGF10+BMP15, respectivamente), diminuiu a expressão do FAS (1.3±0.21, 1.3±0.1, 0.98±0.22 e 0.81±0.17) e aumentou a expressão do nPR (0.41±0.05, 0.64±0.15, 0.8±0.27 e 0.99±0.16). A produção de progesterona e a expressão dos genes PUMA, BIRC4 e MDM2 não foram afetadas pelos tratamentos. Os dados presentes sugerem ação anti-apoptótica para o FGF10 em COC bovinos, mediada por mecanismos envolvendo aumento na razão BCL2/BAX. Além disso, o FGF10 parece interagir com a BMP15 para prevenir apoptose inicial durante a MIV por mecanismos envolvendo supressão da expressão de FAS e aumento da expressão do nPR. A ação anti-apoptótica desses FSOs pode contribuir para seu impacto positivo sobre a competência oocitária.

SBTE 058 Foliculogênese, oogênese e ovulação

O receptor de quimiocinas CCR2 desempenha um papel crucial na ativação folicular e foliculogênese pré-antral e sua deficiência acarreta em redução da fecundidade

Paulo Henrique Almeida Campos Junior[1]; Alana Géssica Amaral Santos[1]; Remo Castro Russo[2]; João Henrique Moreira Viana[3]
1.Universidade Federal De São João Del Rei; 2.Universidade Federal De Minas Gerais; 3.Embrapa Gado De Leite.

Palavras-chave: Foliculogênese; ccr2; ccl2

Quimiocinas são citocinas de baixo peso molecular que controlam o recrutamento e ativação de leucócitos durante a inflamação. Atualmente, é conhecida a importância de PI3K (Phosphoinositide-3-kinase) na ativação folicular e que a quimiocina CCL2 (MCP-1) e seu principal receptor (CCR2), ambos altamente expressos em ovários de camundongos, são capazes de modular os níveis de PI3K. O estudo do papel do CCR2 no sistema reprodutor tem relevância clínica devido ao fato de antagonistas de CCR2 estarem em fase de avaliação clínica para o tratamento de doenças autoimunes. Em estudos recentes realizados por nosso grupo, foi observada a expressão de CCR2 nos testículos de camundongos e homens, e que a deficiência em CCR2 acarreta em uma drástica redução da produção espermática. No entanto, não é conhecido o papel desta interação quimiocina-receptor na homeostase ovariana. Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi investigar a expressão de CCR2 em ovários de camundongos selvagens (wild type–WT), quantificar a população folicular ovariana, as taxas de recrutamento e atresia folicular de camundongos WT e CCR2-/-. Para tanto, ovários foram coletados de camundongos fêmeas (60 dias de idade) WT (n=10) e CCR2-/- (n=10) e destinados a análises morfométricas, quantificação folicular, imunohistoquímica e western blotting. Também foram avaliados o número médio de ninhadas por fêmea reprodutora e o número de filhotes por ninhada (em intervalo de 1 ano). Todos os dados foram comparados através do teste t. A proteína CCR2 foi observada no lisado ovariano dos WT e não foi observada nos CCR2-/-, enquanto a expressão de β-actina (controle) foi observada em ambos os grupos. Através de imunohistoquímica não foi observada expressão de CCR2 em folículos primordiais. No entanto, este receptor foi imunolocalizado em oócitos inclusos em folículos ativados primários, multilaminares, antrais e atrésicos. Apesar de alterações nos pesos corporal e ovariano e índice gonado-somático não terem sido observadas (P>0,05), a deficiência em CCR2 acarretou em modificações na população folicular ovariana. Os CCR2-/- apresentaram reserva folicular ovariana ~40% maior que os WT (P<0,01). No entanto, foi observada redução (~50%) no número de folículos pré-antrais (P<0,01), enquanto o número de folículos antrais não foi alterado (P>0,05). Corroborando estes achados, foi observada menor taxa de ativação e atresia folicular e menor número de ninhadas/fêmea reprodutora nos CCR2-/- (P<0,01). De maneira geral, este trabalho demonstra pela primeira vez na literatura, que (i) o CCR2 é um potencial regulador e marcador molecular da ativação folicular, (ii) atua principalmente nos estágios iniciais da foliculogênese, e que (iii) sua deficiência acarreta em redução da fecundidade, sendo que os efeitos de antagonistas de CCR2 na foliculogênese devem ser detalhadamente estudados antes da liberação da comercialização destes medicamentos. CEUA 27/2014. CNPq e FAPEMIG

SBTE 059 Foliculogênese, oogênese e ovulação

O sistema NPPC/NPR2 descrito no modelo murino é aplicável para folículos antrais bovinos?

Elisa M Pioltine[1]; Mariana Fernandes Machado[2]; Juliano Coelho Da Silveira[3]; Ramon Cesar Botigelli[2]; Patrícia Kubo Fontes[2]; Ana Elisa Valencise Quaglio[2]; Cláudia Lima Verde Leal[3]; Reneé Laufer Amorim[4]; Luiz Claudio Di Stasi[2]; Marcelo Fabio Gouveia Nogueira[1]
1.Faculdade De Ciências E Letras - UNESP Assis; 2.Instituto De Biociências - UNESP Botucatu; 3.Faculdade De Zootecnia E Engenharia De Alimentos - USP Pirassununga; 4.Faculdade De Medicina Veterinária E Zootecnia - UNESP Botucatu.

Palavras-chave: Maturação *in vitro*; bloqueio meiótico; nppc

Estudos recentes em camundongos demonstraram que o precursor do peptídeo natriurético tipo C (NPPC) e o seu receptor do tipo 2 (NPR2) são essenciais para a manutenção do bloqueio meiótico no oócito e que o estradiol, presente no fluido folicular (FF), participa desse sistema estimulando o NPR2 nas céulas do *cumulus* (CC). O FF bovino influencia a maturação nuclear do oócito quando adicionado ao meio de maturação. Além disso, vesículas extracelulares (VEC), presentes no FF, podem realizar a comunicação entre células somáticas ovarianas e o oócito. Contudo, a presença de NPPC-NPR2 ainda não foi identificada no ovário bovino. Portanto, os objetivos do presente estudo envolvem a elucidação do sistema NPPC-NPR2 no ovário bovino e a investigação da influência do NPPC exógeno, do estradiol e das VEC sobre a expressão dos RNAm da PDE3 e do NPR2, os níveis de AMPc no oócito e de GMPc nas CC e sobre a progressão da meiose I em complexos *cumulus*-oócito (CCO) bovinos. Foram realizados cinco experimentos: 1) Ensaio imunoenzimático (ELISA) para investigar a presença e a concentração do NPPC no FF, no lisado de células da granulosa mural e nas VEC, de acordo com grupos com diferentes diâmetros foliculares (3 a 6 mm; >6 a 8 mm e >8 mm); 2) Imunolocalização do receptor NPR2 no folículo antral bovino; 3) CCOs foram cultivados com NPPC exógeno, estradiol e VEC a) por 6 horas para investigação da expressão do RNAm da PDE3 no oócito e do NPR2 nas CC mediante PCR em tempo real e b) por 9 horas para avaliar a progressão da meiose por coloração de orceína e 4) Mensuração das concentrações de AMPc e GMPc em CCOs maturados por 6 horas com NPPC exógeno ou VEC utilizando kits específicos EIA AMPc, Format A PLUS, Biomol e EIA GMPc. Os dados foram testados por ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Dunnett pelo Software JMP 7.0 (SAS Institute). Diferenças foram consideradas significativas quando $P<0,05$ e tendência quando $0,05<P<0,1$. A proteína NPPC foi detectada em maiores concentrações nas VEC, independente do diâmetro folicular. O NPR2 foi localizado preferencialmente em células da granulosa mural. O estradiol diminuiu a abundância relativa de RNAm da PDE3 no oócito e os tratamentos não influenciaram a expressão do RNAm de NPR2 nas CC. Respectivamente, as VEC e o NPPC propiciaram uma menor degradação de AMPc (no oócito) e de GMPc (nas CC). Todos os tratamentos aumentaram a porcentagem de oócitos no estágio de vesícula germinativa. Concluímos que o NPPC, exógeno ou presente nas VEC do FF bovino, participa do bloqueio meiótico bovino via inibição da expressão da PDE3 oocitária, aumentando o GMPc nas CC e o AMPc nos oócitos, respectivamente. O Estradiol também atua no bloqueio meiótico pela inibição da expressão da PDE3, porém os dados do presente trabalho não demonstraram seu efeito sobre a expressão do RNAm de NPR2.

SBTE 060 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Papel da via INOS/NO/GMPC na maturação *in vitro* de COCs bovinos cocultivados com hemisecções da parede folicular

Natália Ferreira Torres; Maria Clara Caldas-Bussiere; Karina Silva Nogueira; Diego Fernando Dubeibe; Carla Sobrinho Paes De Carvalho; Bruna Lomba Dias; Claudio Luiz Melo De Souza
UENF.

Palavras-chave: Maturação *in vitro*; óxido nítrico; nucleotídeos

A função do óxido nítrico (NO) na maturação de oócitos mamíferos e os mecanismos envolvidos neste processo ainda não foram completamente esclarecidos. O NO é produzido por enzimas óxido nítrico sintases (NOS) e estimula a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) a produzir GMPc. Este nucleotídeo controla a ação da fosfodiesterase 3A, a qual possui a função de metabolizar o AMPc para a forma inativa, induzindo a retomada da meiose. Com o objetivo de melhor compreender esses eventos utilizamos duas substancias atuantes nesta via, a aminoguanidina (AG) que inibe a isoforma induzível da NOS (iNOS) e o 1H-[1,2,4]oxadiazolo-[4,3-a] quinoxalin-1-one (ODQ), que atua inibindo a GCs. Grupos de 20 COCs (120 COCs/tratamento) foram cultivados com oito hemissecções (HS) da parede folicular em estufa a 38,5°C e 5% de CO_2, em 200 µL de meio de maturação (TCM 199/BSA), suplementado com AG (1 e 100 mM) e ODQ (10^{-3} M). Os controles consistiram de COCs cultivados em presença (C-) ou ausência de HS (C+). Foram avaliados os estádios de maturação nuclear dos oócitos após 22 h de cultivo por meio da coloração com orceína acética 0,2%. As dosagens de GMPc (30 COCs/tratamento) e AMPc (10 COCs/tratamento e 50 oócitos/tratamento) foram realizadas as 0, 1, 3, 6 e 9h para os COCs e as 0, 3, 6 e 9h nos oócitos, por imunoensaio enzimático. Todos os dados foram avaliados segundo o teste de Tukey (P<0,05). A presença das HS (C-) diminuiu a percentagem de oócitos que alcançaram a metáfase II (MII) (41,0±4,0%) em relação ao grupo C+ (78,5±3,9%) (P<0,05). A adição de 1mM de AG estimulou a retomada da meiose em relação ao C- (P<0,05) e foi igual ao C+ (P>0,05), enquanto que 100 mM de AG inibiu a retomada da meiose e progressão até MII. A adição de ODQ estimulou a retomada da meiose em relação ao C-, entretanto, inibiu a progressão até a MII (21,9±3,5%) (P<0,05). A concentração de GMPc diminuiu ao longo das horas avaliadas em todos os grupos experimentais. Os resultados observados no grupo 1mM AG não diferiram dos observados no grupo C-, contudo, a adição de 100 mM de AG e 10^{-3} M de ODQ diminuiu a concentração de GMPc, exceto as 3 e 6 h. O grupo tratado com ODQ apresentou as menores concentrações (P<0,05). A concentração de AMPc nos COCs apresentou um aumento ao longo do tempo para todos os tratamentos (P<0,05). Por este motivo, foi realizada a dosagem desse nucleotídeo somente nos oócitos, onde sua concentração foi descrescente. O C+ apresentou a menor (P<0,05) concentração de AMPc durante todas as avaliações, enquanto os grupos tratados com 100 mM de AG e 10^{-3} M de ODQ apresentaram concentrações mais elevadas de AMPc em relação aos demais tratamentos (P<0,05). Os resultados nos permitem concluir que a atividade da via iNOS/NO/GMPc é importante para a manutenção do COC no estádio de vesícula germinativa (VG) e progressão da meiose até a MII, sendo modulada pelas concentrações de GMPc e do AMPc no COC/oócito.

SBTE 061 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Perfil proteico do fluido folicular durante a foliculogênese em éguas

Bianca Petrucci Rocha; Henrique De Araujo Bastos; Tamarini Rodrigues Arlas; Gabriel Oliveira Santos; Anita Mylius Pimentel; Sandra Fiala Rechsteiner; Maria Inês Mascarenhas Jobim; Ricardo Macedo Gregory; Rodrigo Costa Mattos
UFRGS.

Palavras-chave: Foliculogênese; proteomica; fluido folicular

O fluido folicular (FF) é o único meio em que as células do compartimento avascular do folículo (células da granulosa e oócito) estão expostas, proporcionando um microambiente no qual as células do complexo cumulus-oócito (COC) amadurecem e as células da granulosa se diferenciam. Este experimento tem por objetivo comparar o perfil proteico do fluido folicular (FF) do maior folículo (F1) e comparar com o segundo maior folículo (F2) durante as diferentes fases de desenvolvimento folicular (emergência, divergência, dominância e pré-ovulatório). Ovários de 20 éguas cíclicas e não-prenhes foram coletados em um matadouro. Antes do abate, as éguas foram examinadas através de palpação transretal e exame de ultrassom do trato genital, a fim de avaliar ovários e útero. Amostras de sangue foram coletadas por punção da jugular. O diâmetro dos dois maiores folículos (F1 e F2) e do corpo lúteo (CL) foram obtidos de cada égua. Ecotextura do endométrio (EE) foi avaliado e pontuado de 1 a 4. Éguas foram classificadas nos seguintes grupos experimentais: G 15 (n = 4) F1 ≤ 15 mm, EE ≤ 2.5, CL 27 mm; G 20 (n = 8) F1 20 a 26 mm, EE 2.5 a 3, CL 17 a 26 mm; G 30 (n = 4) F1 30 a 38 mm, EE 3, CL < 16 mm; G 40 (n = 4) F1 40 mm, EE 3, CL < 16 mm. As concentrações de progesterona plasmática foram avaliadas pela quimioluminescência. Após o abate o FF de F1 e F2 foi aspirado e então submetido à 2D-PAGE para separação de proteínas e identificação por espectrometria de massa. Para a análise estatística foi realizada uma análise unidireccional da variância (SAS procedimento GLM) para avaliar a densidade ótica relativa de cada spot de proteína como o fator dependente e os grupos experimentais, F1 e F2 e suas interações como variáveis independentes. De um total de 20 éguas estudadas, quatro constituíam o G15, oito o G20, quatro o G30 e quatro do G40. As concentrações plasmáticas de progesterona variaram de 8,1 a 12,7 em G15, 6,7 a 12,6 em G20, 0,6 a 1,3 no G30 e 0,6 a 0,7 no G40. Um total de 43 spots foram observados em géis (38 do F1 e 35 do F2). Nove spots que apresentam diferenças significativas entre os tratamentos foram submetidos à espectrometria de massa. Albumina, apolipoproteina A-1, gelsolina, serotransferrina e alfa-1-antiproteinase 2 detectados no fluido de F1 diferiam em abundância (P < 0,05) entre os grupos experimentais. POM121 e a proteína de fusão ZP3 (POMZP3) diferiram (P = 0,02) em abundância desde a divergência (G20), e alfa-1-antiproteinase 2 demonstraram interação (P = 0,05) entre F1 e F2. A maioria das proteínas identificadas no FF estão presentes no plasma sanguíneo. Não foi possível correlacionar uma proteína específica com uma determinada fase do desenvolvimento folicular, no entanto, serotransferrina e alfa-1-antiproteinase 2 tiveram maior abundância durante o domínio, e a apolipoproteína A-1 e gelsolina durante a fase pré-ovulatória. POMZP3 apresentou maior abundância no folículo dominante em comparação com um subordinado.

SBTE 062 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Perfusão sanguínea no folículo pré-ovulatório em vacas nelore submetidas a protocolos de IATF.

João Ricardo Scaliante[1]; Mauricio Machaim Franco[2]; Sarah De Andrade Dias Rodrigues[3]; Bianca Damiani Marques Silva[2]
1.Universidade Federal De Uberlândia; 2.Embrapa Recursos Genéticos E Biotecnologia; 3.Médica Veterinária.

Palavras-chave: Benzoato de estradiol; ovulação; doppler

O objetivo deste estudo foi caracterizar mudanças no fluxo sanguíneo, na parede do folículo pré-ovulatório na última onda de crescimento folicular desde a retirada do implante de progesterona até a ovulação, utilizando indutores de ovulação em vacas da raça nelore. Foram utilizadas 28 vacas, divididas aleatoriamente em dois protocolos, o protocolo BED9 (n=14) constituiu da colocação de um implante intravaginal de progesterona (P4, Sincrogest®, Ourofino, Cravinhos-SP) e 2mg de benzoato de estradiol IM (BE, Benzoato HC, Hertape Calier, Juatuba-MG) no D0; retirada da P4 e 0,150mg de d-cloprostenol (PGF2α,Veteglan®, Hertape Calier, Juatuba-MG) IM no D8 e 1mg de BE IM 24 h após. O protocolo BED8 (n=14) constituiu da colocação de um implante intravaginal de P4 e 2mg de BE IM no D0; retirada da P4, aplicação de 0,150mg de PGF2α e 1mg de BE no D8, ambos IM. O grupo de vacas foi avaliado com ultrassom Color Doppler (MyLab™30Gold, Esaote) em intervalos de 6 horas até a ovulação dos folículos dominantes ou limite máximo de 90 horas, sendo 0 hora considerado o momento em que foi retirado o implante intravaginal de P4. Das 28 vacas, 11 (39,3%) não ovularam até às 90 horas, sendo 4 do BED9 e 7 do BED8. Para a avaliação da vascularização folicular foi adotada uma classificação subjetiva, na qual folículos com irrigação de 0 a 20% de sua circunferência foram classificados em grau 1, 20 a 40% grau 2, 40 a 60% grau 3, 60 a 80% grau 4 e 80 a 100% grau 5. Para a comparação estatística do horário de ovulação e tamanho médio do folículo pré-ovulatório foi utilizado o t-test para distribuições normais e teste de Mann-Whitney para distribuições não normais ($P<0,05$). Para a quantidade total de folículos em cada horário avaliado, classificado com os diferentes graus de irrigação foi utilizado o teste de Fisher ($P<0,05$). O tamanho médio do folículo ovulado foi 12,83±1,31 e 11,85±1,71mm (P=0,20) em BED9 e BED8, respectivamente. Foi observada diferença estatística no tempo médio de ovulação, 74,4±3,09 em BED9 e 61,71±11,33 horas em BED8 (P=0,01). Com relação à vascularização, no BED9 foi observado que nas primeiras 24 h a maioria dos folículos se mantinham em grau 2, no intervalo de 24 a 30 h foi observada uma mudança de vascularização de grau 2 para grau 3, de grau 3 para 4 no intervalo de 36 para 42 horas e de grau 4 para grau 5 no intervalo de 66 para 72 horas, permanecendo até ovular. No BED8 foi observado que de 0 hora até 30 horas a maioria dos folículos se mantinham em grau 3, no intervalo de 30 para 36 horas ocorreu um aumento de folículos grau 4, de grau 4 para 5 no intervalo de 54 para 60 horas, permanecendo até ovular. Os resultados sugerem que o BE aplicado no momento da retirada do implante antecipa a ovulação comparando com a aplicação 24 h depois e que próximo à ovulação há um aumento da vascularização na parede do folículo pré-ovulatório, o que faz com que o Color Doppler possa presumir o folículo pré-ovulatório pela sua irrigação e a proximidade da ovulação.

SBTE 063 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Regulação de membros da família TGFB na divergência e crescimento folicular final em bovinos.

Monique Tomazele Rovani[1]; Gustavo Freitas Ilha[1]; Cristina Sangoi Haas[2]; Vitor Braga Rissi[1]; Rogério Ferreira[3]; Vilceu Bordignon[4]; Paulo Bayard Dias Gonçalves[1]; Bernardo Garziera Gasperin[2]
1.Universidade Federal De Santa Maria; 2.Universidade Federal De Pelotas; 3.Universidade Estadual De Santa Catarina; 4.Mcgill University.

Palavras-chave: Crescimento folicular; fatores de crescimento; gdf9

Os membros da família do fator de crescimento e diferenciação β (TGFβ) têm sido alvo de estudos após a descrição de mutações inativadoras nas proteínas BMP15 e GDF9 em ovelhas, estando associadas à infertilidade quando em homozigose, ou aumento da taxa ovulatória em heterozigose. A regulação dos membros da família TGFβ durante o crescimento folicular em bovinos ainda não foram completamente avaliadas. Com esta finalidade, a expressão das inibinas (Alpha, BetaA e BetaB) e BMPs (1, 2 e 4) durante a divergência e o efeito da injeção intrafolicular (IIF) de GDF9 sobre o crescimento folicular final foram investigados. Ovários foram coletados por colpotomia e células da granulosa dos dois maiores folículos isoladas antes (dia 2; F1 e F2; n=4), durante (dia 3; folículo dominante (FD) e subordinado (FS); n=4) ou após (dia 4; FD e FS; n=6) a divergência (Evans and Fortune, 1997). Para investigar o efeito do GDF9 sobre o crescimento folicular, vacas (n=11) foram sincronizadas e quando os folículos dominantes alcançaram 9 a 10mm, foram realizadas IIFs de PBS (controle; n=5) ou GDF9 recombinante humano (GDF9; n=6) na concentração final de 100ng/mL (concentração inicial injetada no folículo de 1000ng/mL). Após o tratamento foi realizada dinâmica folicular a cada 24h. Os dados foram testados quanto à distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk, normalizados quando necessário e submetidos à ANOVA. O efeito do GDF9 no crescimento folicular foi avaliado através do teste de medidas repetidas por meio do procedimento MIXED. A validação do modelo de divergência folicular se deu através da expressão de CYP19A1, que foi maior nos FD ($P<0,05$) durante e após a divergência folicular. Além disso, a expressão de RNAm para inibina Alpha (INHA), BetaA (INHBA) e BetaB (INHBB) foi consistentemente maior nos FD. INHBB foi mais expressa antes (dia 2), durante (dia 3) e após (dia 4), enquanto que para a INHBA a diferença ocorreu durante e após a dominância. A expressão de INHA apresentou diferença somente após a dominância folicular. A expressão relativa de RNAm para o gene BMP1 no dia 2 da onda folicular foi significativamente maior ($P<0,05$) no F2, enquanto que nos dias 3 e 4 não foram observadas diferenças entre FD e FS. A expressão da BMP2 não diferiu entre os dois maiores folículos, enquanto que a BMP4 foi mais expressa nos FD nos dias 3 e 4 da onda folicular. A IIF de GDF9 não afetou o crescimento dos folículos, sendo que todas as fêmeas do grupo controle (n=5) e cinco das seis vacas do grupo GDF9 ovularam três a quatro dias após a IIF. O presente estudo é pioneiro em mostrar a expressão de BMP1 no ovário de bovinos, sendo que o padrão de expressão sugere um efeito inibitório sobre o crescimento do futuro FS. A expressão de BMP2 sugere uma função menor ao longo da divergência enquanto que a BMP4 está associada com a dominância folicular. Nas condições do presente estudo, o tratamento com GDF9 não alterou a dinâmica de crescimento folicular e ovulação, embora outras doses do peptídeo serão testadas.
Este estudo foi financiado pelo CNPq, CAPES e FAPERGS.

SBTE 064 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Resveratrol mantém a sobrevivência e promove a proliferação celular em folículos pré-antrais ovinos cultivados *in situ*

Maria Éllida Sousa Bezerra; Agnes Yasmin Pitombeira Cavalcante; Alane Pains Oliveira Do Monte; Bruna Bortoloni Gouveia; Jamile Maiara Da Silva Santos; Ricássio De Sousa Barberino; Taís Jobard Silva Macedo; Vanuzia Gonçalves Menezes; Maria Helena Tavares De Matos
Universidade Federal Do Vale Do São Francisco - UNIVASF.

Palavras-chave: Ovelha; oócito; antioxidante

Alguns estudos têm demonstrado que o resveratrol, fitoalexina produzida por inúmeras plantas e presente em uvas, reduz a atresia folicular (KONG et al., J Endocrinol Invest., v. 34, p. 374-81, 2011) e a as espécies reativas de oxigênio (KWAK, et al., Theriogenology, v. 78, p. 86–101, 2012) após o cultivo de folículos ovarianos de ratas. Entretanto, não há relatos do efeito do resveratrol sobre o cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais ovinos. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do resveratrol sobre a morfologia, a ativação e a proliferação celular de folículos pré-antrais ovinos cultivados *in situ*. Após a coleta de ovários (n=10) de ovelhas em abatedouro, o córtex ovariano foi fragmentado e um fragmento foi imediatamente fixado e destinado à histologia (controle fresco). Os demais fragmentos foram cultivados *in vitro* por 7 dias em α-Meio Essencial Mínimo (α-MEM – GIBCO, Invitrogen, St Louis, EUA) suplementado com insulina, transferrina, selênio, hipoxantina, glutamina, ácido ascórbico e BSA (α-MEM+ - meio controle) ou em α-MEM+ adicionado de diferentes concentrações de resveratrol (2; 10 ou 30 µM). Após o cultivo, foi realizada a análise morfológica dos folículos pré-antrais através de histologia, sendo estes classificados em normais ou atrésicos de acordo com a ausência ou presença de retração citoplasmática, picnose nuclear e/ou desorganização das células da granulosa, bem como em folículos primordiais ou em crescimento (transição, primários ou secundários). Também foi realizada a técnica de imunohistoquímica para a detecção do Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA; 1:500; Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA, EUA). As células em proliferação ou PCNA positivas (marrons) foram contadas nas secções e expressas em percentagem. As porcentagens de folículos normais e em cada estádio de desenvolvimento foram comparadas por ANOVA e teste de Tukey ($P<0,05$). Após 7 dias de cultivo, houve uma redução significativa na percentagem de folículos morfologicamente normais em todos os tratamentos em comparação ao controle fresco. A concentração de 2 µM de resveratrol apresentou percentagem de folículos normais semelhante ao meio controle e significativamente superior às demais concentrações de resveratrol. Além disso, observou-se uma redução significativa na percentagem de folículos primordiais e um aumento na percentagem de folículos em desenvolvimento (ativação folicular) em todos os tratamentos comparado ao controle fresco. Em adição, foi possível observar um aumento significativo na percentagem de células PCNA positivas em folículos cultivados em 2 µM de resveratrol (50,7%) em comparação ao controle fresco (34,0%) e ao α-MEM+ (4,3%). Em conclusão, a concentração de 2 µM de resveratrol mantém a sobrevivência, promove a ativação e a proliferação celular de folículos pré-antrais ovinos cultivados *in situ*.

SBTE 065 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Suplementação de ômega-3 na dieta de leitoas pré-púberes aumenta os níveis de leptina e de seu receptor em oócitos de folículos pré-antrais

Cristina Sangoi Haas; Fabiana Moreira; Ivan Bianchi; Monike Dos Santos Quirino; Carlos Eduardo Ranquetat Ferreira; Bernardo Garziera Gasperin; Thomaz Lucia Jr
Universidade Federal De Pelotas.

Palavras-chave: Omega 3; leptina; leitoas

Uma das estratégias para antecipar a entrada à puberdade é a obtenção de uma condição corporal satisfatória, alimentando a leitoa com altos níveis energéticos (AMARAL; Animal Reproduction Science; 121:139-144, 2010). Dietas contendo altos níveis de ácido graxos n-3 aumentam as concentrações plasmáticas de leptina e atuam regulando a síntese e secreção deste hormônio. Este trabalho objetivou avaliar os parâmetros zootécnicos como o peso corporal e a espessura de toucinho (ET) de fêmeas suínas pré-púberes suplementadas com fonte de ômega-3, bem como o efeito desta suplementação sobre os órgãos reprodutivos. Leitoas pré-púberes foram suplementadas diariamente com 9 mL de óleo de soja (grupo controle; n=13) ou 9 mL de óleo de peixe contendo 5 g de ômega-3 composto por 33% de DHA e 22% de EPA (grupo ômega 3; n=12) durante 45 dias. Após o abate, os úteros foram pesados e os ovários avaliados quanto à presença ou ausência de corpo lúteo (CL). Para a técnica de imunoistoquímica (IHQ) foram utilizados cortes de ovários (n=4/grupo) e utilizados anticorpos primários policlonais: anti-leptina Ob (1:2000) e anti-receptor da leptina ObRb (1:100). Os oócitos foram classificados como inclusos em: folículos primários/primordiais (OIFP); folículos secundários (OISF) ou terciários (OIFT). A quantificação das proteínas foi feita através do software Image J® para obter o valor de moda para cada área selecionada (MOREIRA; Animal Reproduction Science; 139: 89-94, 2013). Dados zootécnicos foram analisados utilizando modelo para dados repetidos (The MIXED procedure, SAS®). O peso do útero, a quantificação da imunomarcação e os valores das modas das estruturas classificadas foram submetidos ao teste de ANOVA seguida de comparação de médias através do teste de Tukey pelo software Statistix® (2008). O peso corporal não diferiu (P>0,05) entre os grupos em nenhum dos momentos. Entretanto, observou-se uma interação entre grupo e momento (P<0,05), sendo observada uma maior ET nas fêmeas do grupo ômega 3 após 45 dias de suplementação (P=0,06). Ao abate, nenhuma das fêmeas apresentava CL, sendo observada uma tendência a maior peso de útero no grupo ômega 3 (P=0,09). Nas fêmeas do grupo ômega 3 a imunomarcação para leptina nos OIFP e OIFS (P<0,05) foi mais intensa que nas leitoas controle, porém não houve diferença nos OIFT (P>0,05). Para o receptor da leptina, a intensidade de marcação foi maior nos OIFS das leitoas ômega 3 (P<0,05) não se observando diferenças nos demais folículos (P>0,05). Portanto, infere-se que a suplementação com ômega 3 aumenta as chances das fêmeas alcançarem a ET mínima ao atingir a idade à puberdade e que os maiores níveis de leptina induzidos através da suplementação de ômega 3 podem influenciar positivamente o desenvolvimento oocitário/folicular e do trato reprodutivo. Os autores agradecem à FAPERGS, CAPES e CNPq pelo suporte financeiro.

SBTE 066 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Validação de marcadores moleculares para competência ovocitária em células do cumulus bovinas

Nayara Ribeiro Kussano[1]; Ligiane Oliveira Leme[2]; Ana Luiza Silva Guimarães[2]; Mauricio Machaim Franco[3]; Margot Alves Nunes Dode[3]
1.Universidade Federal De Uberlândia - UFU; 2.Universidade De Brasília - UNB; 3.Embrapa Recursos Genéticos E Biotecnologia.

Palavras-chave: Competência ovocitária; cultivo individual; marcadores

Considerando que as células do cumulus (CC) possuem comunicação bi-direcional com o ovócito e que desempenham papel importante no seu crescimento e maturação, elas podem ser utilizadas para indicar a qualidade do ovócito de modo não invasivo. Vários estudos têm identificado genes nas CCs, cuja expressão está associada a competência ovocitária e, que podem ser utilizados como marcadores. Entretanto, para comprovar a eficiência desses como marcadores é necessário acompanhar o desenvolvimento individual de cada CCO até a formação do blastocisto. O presente estudo objetivou quantificar a expressão de genes candidatos em CCs de ovócitos com alta e baixa capacidade de produzir embriões *in vitro*. Inicialmente, foi avaliado o efeito do sistema de cultivo individual e da biópsia na produção de embriões. Os complexos-cumulus-ovócitos (CCOs) foram distribuídos em três grupos: controle (CCOs cultivados em grupos); WOW (CCOs cultivados individualmente no sistema WOW); e microgota (CCOs cultivados individualmente em microgotas de 20 µL). Os diferentes sistemas foram utilizados para a MIV, FIV e CIV. Foi comparada a produção de embriões, do cultivo em grupo e do cultivo individual em microgota, com e sem biópsias. O nível de transcritos dos genes GPC4, IGFBP4, FSHR, GHR, EGFR, FGF11, SLC2A1, SLC2A3, SPRY1, VCAN e KRT8, foi quantificado por PCR em tempo-real (qPCR) em 5 pools de 7 biopsias de CCs que foram obtidos de CCO imaturos e, agrupadas de acordo com o resultado da produção de embriões, em: CCOs que formaram blastocisto expandido em D7; CCOs que não clivaram e, CCOs que clivaram, mas que não chegaram a blastocisto. A produção de embriões em D7 foi inferior ($P<0,05$) nos grupos cultivados individualmente (WOW=17,9 % n=95; microgota= 26,3% n=95) do que no controle (45,0 %, n=209). Entretanto, a biópsia não afetou ($P>0,05$) a produção de blastocistos em nenhum dos grupos. Dos 11 genes avaliados nas CCs, três mostraram diferença no nível de RNAm. O GHR ($P=0,09$) e VCAN ($P=0,06$) tiveram maior expressão em CCs de ovócitos que chegaram a blastocistos comparado aos que não clivaram; já o GPC4 foi mais expresso ($P=0,007$) nas CCs dos que chegaram a embrião do que os que apenas clivaram. Conclui-se que apesar do cultivo individual reduzir a taxa de blastocisto, a biópsia de CC não afeta a produção de embriões. A expressão dos genes GHR, VCAN e GPC4 em CC está associada a capacidade do ovócito de formar embrião e, pode ser utilizada como marcador não invasivo da competência ovocitária.

SBTE 070 IATF, TETF e IA

Segunga IATF após ressincronização precoce em nulíparas e multíparas nelore

Wendell Amaral Nantes De Oliveira[1]; Moisés Maximo Rodrigues Junior[1]; David Luis Andrea[1]; Adnan Darin Pereira Rodrigues[2]; Izaias Claro Junior[3]; Jose Luiz Moraes Vasconcelos[2]
1.MS REPRODUÇÃO; 2.FMVZ-UNESP - Botucatu; 3.ZOETIS.

Palavras-chave: IATF; ressincronização precoce; Nelore

O trabalho teve como objetivo comparar a utilização da ressincronização precoce (antes do diagnóstico de gestação) de quatro manejos em nulíparas e multíparas Nelore. Foram utilizadas 308 nulíparas e 142 multiparas Nelore, com ECC médio de 2,84 ± 0,01. Para a primeira IATF as fêmeas foram sincronizadas com o seguinte protocolo: inserção de um dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR 1,9g; Zoetis, São Paulo, Brasil) e 2,0 mg im de benzoato de estradiol (BE; Gonadiol; Zoetis) no Dia -11, 12,5 mg im de dinoprost trometamina (PGF; Lutalyse; Zoetis) no Dia -4, no Dia -2 o CIDR foi retirado e 0,5 mg im de cipionato de estradiol (ECP; Zoetis) e eCG (200 UI Nulíparas ou 300 UI Multíparas; Novormon; Zoetis) foi administrado. A IATF foi realizada no Dia 0, 48 h após a remoção do CIDR. No Dia 23 todas as fêmeas receberam a inserção de CIDR e 1,0 mg im de BE. No Dia 30 foi realizado o diagnóstico de gestação, as fêmeas diagnosticadas como prenhes tiveram o CIDR removido, nas fêmeas não prenhes foi aplicado 12,5 mg im de PGF. No Dia 32 o CIDR foi removido e foram administrados 0,5 mg im de ECP e eCG (200 UI Nulíparas ou 300 UI Multíparas). A 2ª IATF foi realizada no Dia 34, 48 h após a remoção do CIDR. As taxas de prenhez na 1ª e 2ª IATF foram analisadas utilizando o PROC GLIMMIX do SAS, sendo incluído no modelo os efeitos de categoria, ECC, Inseminador e Touro. Para análise da taxa de prenhez FINAL (1ª+2ª IATF) foi incluído no modelo o efeito de ordem. Os resultados foram reportados como média dos quadrados mínimos. Na 1ª IATF não houve efeito de nenhuma das variáveis, sendo que Nulíparas tiveram taxa de prenhez de 63,6% (211/308) e as Multíparas de 54,1% (68/142). Na 2ª IATF não houve efeito das variáveis analisadas na taxa de prenhez, sendo 55,7% (54/97) para as Nulíparas e 63,5% (47/74) para as Multíparas. A taxa de prenhez final foi igual entre ordem, 86,0% (265/308) para as Nulíparas e 80,9% (115/142) para as Multíparas. A utilização da 2ª IATF através da ressincronização precoce, antes do diagnóstico de gestação e com antecipação da PGF em 2 dias antes da retirada do CIDR, não foi diferente em Nulíparas e Multiparas Nelore, mostrando ser uma alternativa viável para antecipar a prenhez destas categorias durante a estação de monta.

SBTE 071 IATF, TETF e IA

A adição de GnRH e/ou PGF2α antecipada em protocolos para IATF a base de progestágeno e estradiol não altera a fertilidade de vacas leiteiras

Guilherme De Souza Floriano Machado De Vasconcellos[1]; Lais Mendes Vieira[1]; Bruna Martins Guerreiro[1]; Bruno Gonzalez De Freitas[1]; Cecilia Rodrigues Alves Silveira[2]; Guilherme Nogueira Borges Filho[2]; Felipe Souza Pires[3]; Regis José De Carvalho[4]; Pietro Sampaio Baruselli[1]
1.USP; 2.UNESP; 3.MSD SAUDE ANIMAL; 4.M.V AUTONOMO.

Palavras-chave: Taxa de prenhez; vacas em lactação; sincronização

O objetivo do presente estudo foi avaliar a eficiência reprodutiva de vacas leiteiras em lactação submetidas a diferentes protocolos de sincronização para IATF. Foram utilizadas 422 vacas (Holandesa e Holandesa x Jersey) em lactação, criadas em sistema de semiconfinamento, com produção média de leite de 23,4 ± 0,4 L/vaca/dia, escore de condição corporal (ECC) 3,0 ± 0,02 (escala de 1 a 5) e 144,8 ± 4,5 dias em lactação (DEL), oriundas de cinco fazendas comerciais. As vacas foram homogeneamente distribuídas em quatro grupos experimentais (Controle, n = 102; GnRHD0, n = 109; PGFD7, n = 102 e; GnRHD0+PGFD7, n = 109), em arranjo fatorial 2 x 2, conforme produção de leite, ECC e DEL. Em dias aleatórios do ciclo estral todos os animais iniciaram o protocolo de sincronização para IATF [Dia 0: 2 mg de benzoato de estradiol (BE; Gonadiol®,MSD, Argentina) + implante auricular de norgestomet (Crestar®, MSD, Holanda); Dia 8: remoção do implante + 0,530 mg de cloprostenol sódico (PGF2α; Ciosin®, MSD, Brasil); Dia 9: 1 mg BE (Gonadiol®, MSD, Argentina); Dia 10 AM: IATF]. Além do protocolo mencionado, o grupo GnRHD0 recebeu 100µg de gonadorelina (Fertagyl®, MSD, Holanda) no Dia 0, o grupo PGFD7, 0,530 mg de cloprostenol sódico (Ciosin®, MSD, Brasil) no Dia 7 e o grupo GnRHD0+PGFD7, 100µg de gonadorelina no Dia 0 e 0,530 mg de cloprostenol sódico no Dia 7. Os animais do grupo Controle não receberam tratamento adicional. No Dia 40 as vacas foram submetidas ao diagnóstico de gestação com o auxílio da ultrassonografia. A análise estatística foi realizada pelo GLIMMIX do SAS®. Não foi observado interação entre o tratamento com GnRH no Dia 0 e tratamento com PGF2α no Dia 7 para taxa de prenhez 30 dias após IATF [Controle: 40,2 (41/102); GnRHD0: 37,6 (49/109); PGFD7: 38,2 (39/102) e; GnRHD0+PGFD7: 42,2% (46/109); P = 0,47]. Também não foi observado efeito principal para o tratamento com GnRH no Dia 0 [Com GnRHD0: 39,9 (87/218) e Sem GnRHD0: 39,2% (80/204); P = 0,82] ou PGF2α no Dia 7 [Com PGFD7: 40,3 (85/211) e Sem PGFD7: 38,9% (82/211); P = 0,52]. Ainda, apesar do efeito fazenda (P = 0,03), não foi observada interação dos tratamentos com fazenda (P > 0,05). Portanto, conclui-se que a adição de uma dose GnRH no início do protocolo e/ou uma dose de PGF2α um dia antes da retirada do implante auricular não aumenta a taxa de prenhez de vacas leiteiras (Holandesa e Holandesa x Jersey) criadas em sistema de semi-confinamento submetidas ao protocolo de sincronização da ovulação a base de progestágeno e estradiol. Agradecimentos: Agropecuária Carolla, Fazenda Boa Esperança, Fazenda Reunidas e MSD Saúde Animal.

SBTE 072 IATF, TETF e IA

A utilização do eCG em protocolos de IATF melhora as características foliculares e função luteal de vacas mestiças leiteiras gestantes e não gestantes?

Antonio De Lisboa Ribeiro Filho; Alessandro Bitencourt Nascimento; Aloisio Bitencourt Nascimento; Marcus Vinícius Galvão Loiola; Alexandra Soares Rodrigues; Priscila Assis Ferraz; João Batista Ribeiro Da Silva; Rodrigo Freitas Bittencourt; Alberto Lopes Gusmão; Marcos Chalhoub
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA.

Palavras-chave: Diâmetro folicular; corpo lúteo; progesterona

Objetivou-se determinar o impacto da utilização da gonadotrofina coriônica equina (eCG) sobre o diâmetro folicular (DFOL), luteal (DCL) e concentração de progesterona (P4) em fêmeas bovinas gestantes e não gestantes submetidas a um protocolo de sincronização para IATF. Para tanto, 126 vacas mestiças leiteiras, foram submetidas ao seguinte protocolo: em um dia aleatório do ciclo estral (Dia 0) administrou-se um dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR®, Zoetis, São Paulo, Brasil) associado a 2mg de benzoato de estradiol IM (Gonadiol®, Zoetis). No Dia 8, foi removido o dispositivo e administrado 25mg de dinoprost trometamina i.m. (Lutalyse®, Zoetis), seguido por 1mg de cipionato de estradiol i.m. (E.C.P.®, Zoetis). Neste momento, as vacas foram distribuídas aleatoriamente em dois tratamentos: Com eCG (C/eCG; n=61) administrou-se 300UI de eCG i.m. (Novormon®, Zoetis) e Sem eCG (S/eCG; n=65), o qual não recebeu este hormônio. No Dia 10, previamente à IATF, realizou-se a mensuração do DFOL por meio da ultrassonografia transretal. No Dia 20 foi mensurado o DCL e coletado sangue para concentração de P4, utilizando a metodologia de quimiluminescência. O diagnóstico de gestação foi realizado por ultrassonografia transretal no Dia 40, ou seja, 30 dias após a IATF. Desta forma, estabeleceu-se quatro grupos experimentais: Grupo C/eCG gestante (n=25), Grupo C/eCG não gestante (n=30), Grupo S/eCG gestante (n=21) e Grupo S/eCG não gestante (n=37). Para análise estatística das variáveis empregou-se o SPSS (Versão 19), utilizando-se o índice de significância de 5%. Verificou-se que o DFOL para os grupos C/eCG gestante, C/eCG não gestante, S/eCG gestante e S/eCG não gestante foram de respectivamente, 10,1±3,4; 11,2±3,1; 12,1±2,4 e 11,1±2,9 mm, já o DCL foram de respectivamente, 19,8±3,8; 21,4±4,2; 20,5±3,7 e 19,9±3,8 mm, essas características não diferiram entre os grupos. Contudo, o grupo C/eCG gestante apresentou diferença (P=0,0007) para concentração de P4 (16,7±11,1 ng/mL) em comparação com os grupos C/eCG não gestantes (8,2±6,7 ng/mL), S/eCG gestantes (8,2±5,7 ng/mL) e S/eCG não gestantes (8,7±6,7 ng/mL), esses três últimos não diferiram. Conclui-se, que as vacas gestantes tratadas com eCG tiveram melhor função luteal e consequentemente maior concentração de P4.

SBTE 073 IATF, TETF e IA

Adição de uma segunda dose de prostaglandina f2α em protocolo de IATF aumenta a fertilidade de vacas leiteiras em anestro e sem hipertermia

Francisco Rebolo Lopes; Marcos Henrique Colombo Pereira; Anderson Kloster Munhoz; Jose Luiz Moraes Vasconcelos
UNESP - BOTUCATU.

Palavras-chave: Anestro; PGF2α; IATF

Este estudo foi conduzido durante Janeiro a Dezembro de 2014 em duas fazendas leiteiras no Estado de Minas Gerais, o objetivo foi avaliar se a adição de uma segunda dose de prostaglandina (PGF2α) aumenta a fertilidade de vacas holandesas em anestro submetidas a protocolo de IATF a base de E2/P4. Foram realizadas avaliações ovarianas através de ultrassonografia para verificar ausência de corpo lúteo (CL) no momento do início do protocolo (d-11) e no dia da PGF2a (d-4). Vacas que não apresentaram CL no d-11 e d-4 foram classificadas em anestro (n=436). Vacas em anestro foram submetidas ao protocolo de IATF: d-11: dois dispositivos intravaginais contendo progesterona (1,9g P4,CIDR, Zoetis) e 2,0 mg de benzoato de estradiol (BE) i.m. (Gonadiol, Zoetis); d-4 25mg de PGF2a i.m. (Lutalyse, Zoetis) e retirada de um CIDR; d-2 retirada do segundo CIDR e 1,0 mg i.m. de cipionato de estradiol (E.C.P., Zoetis); no d0 IATF. No d-4, as vacas foram divididas aleatoriamente para receber o tratamento: (1PGF) uma dose de PGF2α no d-4 ou (2PGF) duas doses de PGF2α, sendo a primeira no d-4 e a segunda no d-2. A temperatura retal foi mensurada no dia da IATF e 7 dias após. A temperatura retal média foi calculada e as vacas foram divididas em dois grupos: sem hipertermia (<39,1°C) ou com hipertermia (≥39,1°C). Foi realizado diagnóstico de gestação 60 dias após a IATF. Para avaliar as variáveis binomiais foi utilizado o PROC GLIMMIX e as contínuas o MIXED do SAS. A taxa de sincronização desse estudo foi de 76,4% (n=436) e a porcentagem de vacas com hipertermia foi de 58% (n=436). O tratamento com 2PGF apresentou tendência em aumentar a taxa de sincronização (80,2% [n=218] vs. 72,4% [n=218] P=0,07). Houve interação (P=0,05) entre tratamento e hipertermia na prenhez por IA (P/IA) no d60. Nas vacas com hipertermia, P/IA foi 9,1% (n=123) e 9,4% (n=130) para 1PGF ou 2PGF, respectivamente. Nas vacas sem hipertermia, P/IA foi 16,3% (n=95) e 30,0% (n=88) para 1PGF ou 2PGF, respectivamente. Quando somente as vacas ovuladas foram incluídas nas análises, foi detectado interação (P=0,05) entre tratamento e hipertermia na P/IA aos 60d, vacas com hipertemia a P/IA foi de 13,8% (n=80) e de 12,1% (n=100) em 1PGF ou 2PGF, respectivamente. Vacas que não apresentaram hipertermia a P/AI foi de 19,4% (n=78) e 34,8% (n=75) em 1PGF ou 2PGF, respectivamente. A adição de uma segunda dose de PGF2α aumentou a fertilidade em vacas em anestro sem hipertermia nos primeiros 7 dias após a IA.

SBTE 074 IATF, TETF e IA

Ajuste da dose de benzoato de estradiol no início do protocolo de ressincronização sem diagnóstico prévio de gestação em vacas de corte lactantes

Gilson Antonio Pessoa[1]; Ana Paula Martini[2]; Marcio Flores Cunha Chaiben[3]; Lais Mendes Vieira[4]; Renato Wihby Girotto[5]; Guilherme Pugliesi[4]; Thiago Santin[4]; Mara Iolanda Batistella Rubin[2]; Pietro Sampaio Baruselli[4]; Manoel Francisco Sá Filho[4]
1.UFRGS; 2.UFSM; 3.AGENER UNIÃO- TECNOPEC; 4.USP; 5.RG GENÉTICA AVANÇADA.

Palavras-chave: Bovino; perda gestacional; fertilidade

O estudo avaliou duas doses de benzoato de estradiol (BE) administradas no início do protocolo de ressincronização 22 dias (Dia 22) após a primeira inseminação artificial em tempo fixo (IATF) sobre a taxa de prenhez por IATF (P/IA), perda gestacional (PG) e indução da emergência da nova onda de crescimento folicular (EF) em vacas de corte lactantes. Após a 1ªIATF e independentemente do estado gestacional, 1.426 vacas (768 taurinas e 728 zebuínas) foram aleatoriamente distribuídas em 2 grupos conforme a dose de BE [1 mg (n = 721) ou 2 mg (n = 705); taurinas (RIC-BE®) e zebuínas (Gonadiol®)]. Neste mesmo momento (Dia 22) as vacas receberam um dispositivo intravaginal de progesterona (P4; taurinas PRIMER® e zebuínas DIB®). Após 8 dias (Dia 30), a P4 foi removida e efetuou-se o diagnóstico gestacional por ultrassonografia. As fêmeas não gestantes receberam tratamento IM com análogo de prostaglandina [taurinas (Estron®) ou zebuínas (Ciosin®)]. As vacas taurinas receberam 10 mg de FSH (Foltropin®) e 1 mg de BE, enquanto que as zebuínas foram tratadas com 300 UI de eCG (Novormon®) e 1 mg de cipionato de estradiol (E.C.P.®). A IATF foi realizada 44h ou 48h após a remoção do P4, para as fêmeas taurinas e zebuínas, respectivamente. O diagnóstico de gestação foi conduzido aos 30 e aos 62 dias após a 1ª IATF. Os dados foram analisados pelo Glimmix do SAS 9.3. Não houve interação entre os tratamentos e raças sobre a P/IA após a 1ª IATF (P=0,85), a P/IA após a 2ª IATF (P=0,31), a PG entre 30 e 62 dias após a 1ª IATF (P=0,50), bem como a prenhez acumulada (1ªIATF + 2ª IATF; P=0,75). A P/IA após a 1ª IATF foi similar (P=0,85) entre os tratamentos (1 mg=44,0% e 2 mg=44,0%). Entretanto, a P/IA após a ressincronização foi maior (P=0,0001) nas vacas tratadas com 2 mg (1 mg=36,1% e 2 mg=47,3%). A PG da 1ª IATF foi semelhante (P=0,37) entre os tratamentos (1 mg=3,8% e 2 mg=5,5%), porém, a prenhez acumulada foi maior (P = 0,01) nas vacas tratadas com 2 mg de BE (68,2%) do que às tratadas com 1 mg de BE (62,8%). A dinâmica folicular ovariana de 40 vacas zebuínas foi avaliada a cada 24 h durante todo o tratamento da ressincronização por ultrassonografia para verificar o momento da EF após o tratamento com 1 ou 2 mg BE 22 dias após a 1ª IATF. Nas fêmeas não gestantes (1 mg, n = 12 e 2 mg, n = 12), apesar da média semelhante (Média ± EPM; P = 0,13), a EF ocorreu de maneira mais dispersa (P = 0,03) nas vacas tratadas com 1 mg de BE (1,8 ± 1,3 dias) comparada as fêmeas tratadas com 2 mg de BE (2,3 ± 0,6 dias). Portanto, a dose de 2 mg de BE promove melhor sincronia na EF, maior taxa de P/IA após a ressincronização, sem comprometer as gestações previamente estabelecidas após a 1ª IATF de vacas de corte lactantes submetidas à ressincronização sem o diagnóstico prévio de gestação.
Agradecimentos: CAPES, Fazenda Empyreo, Firmasa, RG Genética Avançada, Fazenda Tapera, Agener União-Tecnopec, Pref. Campus USP/ Pirassununga/SP.

SBTE 075 IATF, TETF e IA

Associação entre o ângulo de garupa, dificuldade de partos e fertilidade em vacas holandesas em lactação

Bruno Gonzales[1]; Emiliana Oliveira Santana Batista[2]; Pietro Sampaio Baruselli[2]; Alexandre Henryli Souza[3]
1.UNIVERSITY OF CALIFORNIA; 2.USP; 3.CEVA SAÚDE ANIMAL.

Palavras-chave: ângulo garupa; fertilidade; vaca de leite

Este estudo foi realizado com o objetivo de se verificar a possível associação entre o ângulo da garupa e fertilidade de vacas Holandesas. O ângulo da garupa de 557 vacas holandesas produzindo 38,2 ± 2,8 kg/dia aos 151 ± 12 DEL e localizadas em 2 rebanhos do tipo free-stall nos EUA (rebanho 1 na California, rebanho 2 em Wisconsin) foi medido com ajuda de um esquadro eletrônico (ADA Angle-meter®) por um mesmo técnico sem prévio conhecimento do histórico reprodutivo dos animais. Os dados de dificuldade de parto (DP; escala de 1 fácil a 3 difícil) e taxa de concepção à primeira IA pós-parto (TC1) foram coletados através do programa Dairy Comp-305, o qual era utilizado nos rebanhos incluídos no estudo. As informações de ângulo de garupa foram agrupadas em quartis da seguinte forma: Q1 = vacas com ângulo de garupa de -2,0 a 0,2; Q2 = 0,3 a 1,0; Q3 = 1,1 a 1,7; Q4 = 1,8 a 5,3. Os dados foram analizados com o procedimento Glimmix do SAS (Versão 9.3). Não houve efeito de rebanho na TC1 (rebanho 1 = 27,9%; rebanho 2 = 32,3%; P = 0.26), porém o rebanho 2 teve maior proporção de partos difíceis com DP > 1 (rebanho 1 = 8,0%; rebanho 2 = 19,7%; P = 0.03). Ordem de lactação tendeu a afetar DP (P=0.10) e TC1 (P=0.09), mas o mês de parição também não afetou (P>0.10) DP e TC1. O ângulo de garupa não afetou nenhuma variável estudada (DP: P = 0,53; TC1: P = 0,68). Assim, a média de DP e TC1 para cada quartil foi, respectivamente, de: Q1 = 1,2 e 33,5%; Q2 = 1,2 e 26,5%; Q3 = 1,2 e 25,6%; Q4 = 1,3 e 29,8%. Ao contrário do esperado, existe pouca influência do ângulo de garupa na dificuldade de parto e taxa de concepção à primeira IA pós-parto em vacas Holandesas de alta produção.

SBTE 076 IATF, TETF e IA

Atraso no momento da IATF em novilhas taurinas com ausência de cio após a retirada do dispositivo de progesterona

Verônica Flores Da Cunha Scheeren[1]; Guilherme Machado Zanatta[1]; Gilson Antonio Pessoa[2]; Ana Paula Martini[1]; Janislene Mach Trentin[2]; Julia Brum Spreckelsen Casarin[1]; Mariani Farias Fiorenza[2]; Pietro Sampaio Baruselli[3]; Manoel Francisco Sá Filho[3]; Mara Iolanda Batistella Rubin[1]
1.Universidade Federal De Santa Maria/Rs; 2.Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul; 3.USP.

Palavras-chave: Estro; GnRH; novilhas

A ocorrência de estro após o protocolo de sincronização da ovulação está relacionada com maior sucesso gestacional após a inseminação artificial em tempo fixo (IATF). No entanto, fêmeas que não apresentam estro apresentam ovulação atrasada (Lopes et al. AnimReprod, v.9, n.3, p.520, 2012) e menor taxa de concepção (Sá Filho et al. Theriogenology, v. 76, p. 455-63, 2011). Neste sentido, o atraso na IATF, associado à administração de GnRH pode incrementar as taxas de concepção (Thomas et al. J AnimSci, v.92, p.4189–4197, 2014). Neste sentido, 478 novilhas taurinas de corte [*B. taurus* (n=368) e sintéticas (n=110)] foram utilizadas para comparar o momento da IATF com sêmen convencional (48 ou 60h) em fêmeas que não apresentaram cio até 48 h após sincronização da ovulação com protocolo a base de estradiol e progesterona (P4). As fêmeas apresentavam escore de condição corporal (ECC) de 3,2 ± 0,5 (escala de 1 a 5) no início do protocolo (Dia 0) e eram provenientes de três fazendas da região central e oeste do RS. No Dia 0, as novilhas foram classificadas de acordo com a presença (n = 392) ou ausência de corpo lúteo (n = 85). Imediatamente após procedeu-se a inserção de um dispositivo de P4 previamente utilizado por 24 dias (PRIMER®, Tecnopec) seguido da aplicação via IM 2mg de benzoato de estradiol (BE; RIC-BE®, Tecnopec). No dia 8 (D8), o dispositivo de P4 foi retirado e administrou-se IM 0,482 mg de cloprostenol sódico (ESTRON®, Tecnopec) e 1 mg IM de cipionato de estradiol (Cipionato HC®, Hertape Calier Saude Animal). Neste momento, as fêmeas receberam pintura com bastão de cera (Raidl-Maxi, RAIDEX GmbH, Dettingen/Erms, Germany) na região sacral. As novilhas que na referida região não apresentaram sinais da tinta 48h após a remoção do dispositivo de P4 foram consideradas em estro e inseminadas imediatamente (Cio-IA48h; n=311). Novilhas com tinta evidente foram consideradas com ausência de cio e receberam via IM 10µg de GnRH (buserelina; Prorelin®), sendo distribuídas aleatoriamente para IATF às 48h (ÑCio-IA48; n=87) ou às 60h (ÑCio-IA60; n=79) após a remoção do dispositivo de P4. O diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias após a IATF com auxílio de ultrassom. Para análise estatística utilizou-se o PROC GLIMMIX do SAS (SAS 9.3). A taxa de prenhez por IA (P/IA) geral foi de 47,8% (228/478). Não houve diferença (P = 0,31) na P/IA entre os diferentes grupos [Cio-IA48h = 49,5% (154/311), ÑCio-IA60h = 49,4% (39/79) e ÑCio-IA48h = 40,2% (35/87)]. Apesar da semelhança estatística entre os tratamentos, os resultados são sugestivos de que existe a possibilidade de incrementar a P/AI dessas novilhasque não apresentam cio até 48h da remoção do dispositivo de P4 pelo atraso na realização da IATF associado ao GnRH. Vale ressaltar que novos estudos com maior número de animais são necessários para confirmar tal indício.
Agradecimentos: Fazenda Limoeiro, Posto Branco e Tapera

SBTE 077 IATF, TETF e IA

Avaliação do efeito da administração de diferentes eCG comerciais (crescimento folicular e concepção) e validação de sua necessidade em protocolos de IATF em vacas nelore paridas

Lucas De Araújo Souto[1]; Talita Lara Conti[2]; José Nélio De Sousa Sales[3]; Pietro Sampaio Baruselli[4]; Roberta Machado Ferreira[5]
1.BIOGÉNESIS BAGÓ SAÚDE ANIMAL LTDA; 2.CENTRO UNIVERSITÁRIO ANHANGUERA; 3.DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA DA UFLA; 4.DEPARTAMENTO DE REPRODUÇÃO ANIMAL DA FMVZ-USP; 5.DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINARIA DA FZEA-USP.

Palavras-chave: Gonadotrofina coriônica equina; vacas de corte; anestro pós-parto

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do uso de diferentes apresentações comerciais de gonadotrofina coriônica equina (eCG) sobre o crescimento folicular, diâmetro do folículo dominante (ØFD) e taxa de prenhez de vacas Nelore (*Bos indicus*, n=943) em período pós-parto de 30-50d e sincronizadas para inseminação em tempo fixo (IATF). O estudo foi conduzido na Fazenda Vera Cruz IV, Barra do Garças – MT. No início do tratamento (D0), todas as vacas receberam um dispositivo intravaginal com 1g de progesterona (Cronipres®, Biogénesis Bagó, Brasil) e 2 mg i.m. de benzoato de estradiol (Bioestrogen®, Biogénesis Bagól). No D8, o dispositivo foi removido e administrou-se 150µg de D-Cloprostenol (Croniben®, Biogénesis Bagó) e 1 mg de cipionato de estradiol (Croni-Cip®, Biogénesis Bagó). Nesse momento, as vacas foram homogeneamente distribuídas (de acordo com peso, ECC e ØFD no D8) para compor um dos três grupos experimentais: controle (sem eCG), Novormon (MSD, Saúde Animal, Brasil, 300UI i.m.) ou Ecegon (Biogénesis Bagó, 300UI i.m.). A IATF foi realizada 54h após a retirada do dispositivo. Avaliações ultrassonográficas foram realizadas nos D0 para verificar a regressão uterina, nos D8 e D10 para avaliação do ØFD (n = 529) e no D45 para diagnóstico de gestação (n = 943). A taxa diária de crescimento folicular foi calculada pela diferença de ØFD entre os D8 e D10 dividido por dois. Os dados foram analisados pelo PROC GLIMMIX do SAS. O ECC médio ± EPM das vacas foi 2,80 ± 0,02. O ØFD no D8 foi similar (P = 0,92) entre vacas controle (11,3 ± 0,2 mm; n = 178), Novormon (11,1 ± 0,2 mm; n = 174) e Ecegon (11,3 ± 0,2 mm; n = 177), demonstrando homogeneidade entre os grupos antes do tratamento. No entanto, vacas tratadas com Novormon (13,4 ± 0,2a mm; n = 174) ou Ecegon (13,5 ± 0,2a mm; n = 177) tiveram maior ØFD no D10 do que as vacas controle (12,8 ± 0,2b mm; n = 178; P = 0,001). Além disso, o crescimento folicular total (entre o D8 e D10) e a taxa diária de crescimento foram superiores nos grupos Novormon (2,4 ± 0,1ª mm e 1,2 ± 0,05ª mm/dia; n = 174) e Ecegon (2,3 ± 0,1ª mm e 1,2 ± 0,05ª mm/dia; n = 177) comparadas às taxas do grupo controle (1,6 ± 0,1b mm e 0,8 ± 0,04b mm/dia; n = 174; P = 0,001), respectivamente. De forma semelhante, observou-se taxa de concepção 35d após a IATF superior (P = 0,035) nos grupos Novormon (52,1%; 160/307) e Ecegon (52,8%; 181/343) em relação as vacas controle não tratadas com eCG (43,3%; 127/293). Portanto, comprovou-se a eficácia da eCG em aumentar as taxas de crescimento folicular e o diâmetro do folículo dominante em protocolos de IATF, possibilitando o aumento da taxa de concepção de vacas em anestro pós-parto. Ambas as apresentações comerciais de eCG testadas (Novormon® e Ecegon®) foram igualmente eficientes.
Agradecimentos: Faz. Vera Cruz IV e funcionários, Proc. FAPESP 2012/07510-1, Proc. CNPq 486089/2013-4.

SBTE 078 IATF, TETF e IA

Comparação das taxas de concepção e perdas gestacionais em receptoras de embrião tratadas com lecirrelina 13 dias após a TETF – resultados preliminares

Thales Ricardo Rigo Barreiros[1]; Douglas Gaitkoski[2]; Luiz Fernando Garro Monteiro[1]; Henrique Goulart Ribeiro De Mendonça[1]; José Carlos Arevalo Junior[1]; Bárbara Pedro Novelli[1]; Crícia Alves Gutjahr[1]; Anna Raquel Grimas Almeida[1]; Wanessa Blaschi[1]
1.UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE DO PARANÁ; 2.IN VITRO BRASIL S/A.

Palavras-chave: Gnrh; ressincronização; *Bos indicus*

A aplicação de análogos sintéticos do GnRH tem sido empregada para ressincronização da ovulação de fêmeas previamente submetidas a IATF (Vianna e Gois, 2014, Anim. Reprod. 11, 353). O objetivo do presente levantamento de dados foi comparar as taxas de concepção e perdas gestacionais de receptoras tratadas ou não com Lecirelina de maneira retrospectiva. No estudo 1, foram analisados dados de 4263 embriões de cruzamento Angus x Nelore produzidos *in vitro* e transferidos em vacas Nelore (ECC: 3,0 a 2,5, escala 1 a 5). As receptoras foram previamente tratadas com dispositivo intravaginal progesterona (CIDR®, Zoetis, Brasil) e 2mg BE (Gonadiol®, Zoetis). Nove dias depois, os animais receberam 12,5mg PGF2α (Lutalyse®, Zoetis), 300UI eCG (Novormon®, Zoetis) e 1 mg CE (E.C.P.®, Zoetis), IM. A TETF foi realizada 18 dias após o inicio da sincronização. Treze dias após a TETF, as receptoras receberam 25µg de Lecirelina (Gestran Plus, Tecnopec, Brasil), IM (G-P4+GnRH; n=810) ou não (G-P4; n=3453). O diagnóstico de gestação foi feito aos 29 e 60 dias de gestação por ultrassonografia. As perdas gestacionais foram calculadas com base na diferença nas taxas de concepção. O estudo 2 foi semelhante ao anterior, também de maneira retrospectiva, entretanto os embriões eram da raça Nelore (n=2152); (G-P4+GnRH, n=341; G-P4, n=1811). Os dados foram analisados pelo teste do Qui-quadrado ($p<0,05$). No estudo 1, as taxas de concepção foram superiores ($P\leq0,001$) no G-P4 aos 29 dias (47,0% (1622/3453) em relação ao G-P4+GnRH (35,1%; 285/810) e semelhantes aos 60 dias (p=0,11); [G-P4: 40,6% (1405/3453) vs. G-P4+GnRH: 33,2% (269/810)]. As perdas gestacionais foram inferiores ($P\leq0,001$) no G-P4+GnRH (5,6% 16/285) do que no G-P4: 13,3% (217/1622). No estudo 2, as taxas de concepção foram superiores no G-P4 aos 29 dias (p=0,001); (G-P4: 39,2% (710/1811) em relação ao G-P4+GnRH: 30,0% (102/341) e aos 60 dias (p=0,02); [G-P4: 33,1% (601/1811) vs. G-P4+GnRH: 26,6% (91/341)]. As perdas gestacionais foram semelhantes (P=0,28) nos grupos [G-P4 (15,3% 109/710) do que no G-P4+GnRH: 10,7% (11/102)]. Em conclusão, estes resultados retrospectivos preliminares demonstraram, de maneira inesperada, que a aplicação de Lecirelina reduziu as taxas de concepção aos 30 dias nas duas bases de dados. Entretanto, as perdas gestacionais foram reduzidas após a aplicação do análogo do GnRH. Estudos prospectivos são certamente necessários para confirmar tais resultados.

SBTE 079 IATF, TETF e IA

Comparação das taxas de prenhez em vacas nelore solteiras ou paridas ressincronizadas com lecirrelina 13 dias após a TETF

Wanessa Blaschi[1]; Douglas Gaitkoski[2]; Luiz Fernando Garro Monteiro[3]; Henrique Goulart Ribeiro De Mendonça[3]; Anna Raquel Grimas Almeida[3]; José Carlos Arevalo Junior[3]; Bárbara Pedro Novelli[3]; Crícia Alves Gutjahr[3]; Thales Ricardo Rigo Barreiros[3]
1.UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE DO PARANÁ - CAMPUS BANDEIRANTES; 2.IN VITRO BRASIL S/A; 3.UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE DO PARANÁ.

Palavras-chave: Gado de corte; GnRH; receptoras de embrião

O objetivo do presente trabalho foi comparar as taxas aproveitamento, concepção e prenhez em vacas Nelore solteiras e paridas e submetidas à transferência de embrião em tempo fixo (TETF). Vacas da raça Nelore (n=3652), com ECC de 3,0 a 3,5 (escala 1a 5) foram divididas em dois grupos experimentais com 2590 vacas solteiras (G-S) e 1062 vacas com 40 a 90 dias pós-parto (G-P). As receptoras foram previamente tratadas com dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR®, Zoetis, Brasil) e 2mg BE, IM (Gonadiol®, Zoetis). Nove dias depois, os animais receberam 12,5mg PGF2α (Lutalyse®, Zoetis), 300UI eCG (Novormon®, Zoetis) e 1mg CE (E.C.P.®, Zoetis), IM. A TETF foi realizada 18 dias após o inicio do tratamento hormonal. Treze dias depois, todas as receptoras receberam 25µg de Lecirelina (Gestran Plus, Tecnopec, Brasil), IM. O diagnóstico de gestação foi feito por ultrassonografia 39 dias após o inicio do tratamento hormonal e as receptoras não gestantes e com CL foram submetidas a uma nova TETF. Os dados foram analisados pelo teste do Qui-quadrado ($p<0,05$). A taxa de concepção após a primeira TETF foi de 47,5% (1232/2590) e 58,1% (617/1062); ($P\leq0,001$) para G-S e G-P, respectivamente. Após a aplicação da lecirelina, as taxas de aproveitamento ($P\leq0,001$), concepção ($P=0,02$) e prenhez ($P\leq0,001$) foram superiores nas vacas paridas [G-P: 87,8% (391/445); 39,3% (154/391) e 34,6% (154/445)] em relação às vacas solteiras [G-S: 78,7% (1070/1358), 33,0% (353/1070) e 26,0% (353/1358)]. A taxa de prenhez acumulada em 21 dias, considerando as duas sincronizações para TETF foi 72,5% (771/1062) para vacas do G-P e 61,1% (1585/2590) para vacas do G-S ($P\leq0,001$). Em conclusão, a ressincronização com lecirelina proporcionou taxas adequadas de aproveitamento, concepção e prenhez em vacas paridas e solteiras. Vacas Nelore paridas apresentaram superiores taxas de aproveitamento, concepção e prenhez em relação a vacas solteiras, podendo ser uma boa opção de receptoras na TETF.

SBTE 080 IATF, TETF e IA

Comparação dos índices zootécnicos de novilhas nelore precoces ou não quando desafiadas para prenhez entre 12 e 16 meses de idade – resultados preliminares

Rogerio Fonseca Guimaraes Peres[1]; Hugo Borges Graff[2]; Adnan Darin Pereira Rodrigues[1]; Ky Pohler[3]; Jose Luiz Moraes Vasconcelos[1]
1.UNESP - BOTUCATU; 2.Agropecuária Fazenda Brasil; 3.University Of Tennessee.

Palavras-chave: Precocidade sexual; Nelore; prenhez precoce

Com o objetivo de diminuir a fase de recria da fêmea na fazenda, associada a seleção genética para probabilidade de parto precoce (PPP), novilhas Nelore tem sido desafiadas para prenhez entre 12 e 16 meses. A PPP apresenta correlação positiva com características de interesse econômico tornando-a interessante como ferramenta de seleção. O objetivo desse trabalho foi avaliar retrospectivamente resultados zootécnicos preliminares de novilhas que emprenharam (Precoces=P) ou não precocemente (Não precoces=NP). Foram utilizadas 305 novilhas nascidas entre setembro e novembro de 2010 e desmamadas entre maio e julho de 2011. De julho até dezembro de 2011 receberam 600 gramas/animal/dia de um suplemento proteíco-energético. Em dezembro de 2011 as novilhas foram induzidas e inseminadas em tempo fixo de acordo com o protocolo proposto por Rodrigues (Theriogenology, 82, 760, 2014). Após a inseminação, as novilhas receberam touro na relação de 1:30 até março de 2012. Novilhas que emprenharam na primeira estação de monta (EM 2011/2012) foram consideradas P (n=164) e as que não emprenharam foram consideradas NP (n=141). Novilhas NP entraram em monta com idade entre 24 e 27 meses. Essas fêmeas foram acompanhadas nas estações de monta subsequentes (2012/2013 e 2013/2014) adotando manejos semelhantes. Foram avaliados o número de gestações, nascimentos, e desmamas, total de quilos de bezerros desmamados, taxa de perda de gestação, taxa de mortalidade de bezerros, peso da novilha na desmama, peso no momento do desafio da precocidade e o peso adulto entre as duas populações por análise retrospectiva. O peso adulto foi avaliado próximo aos 44 meses de idade (maio de 2014). Os dados foram analisados utilizando o procedimento MIXED do SAS. Não houve diferença de idade entre novilhas P e NP no momento do início do protocolo de indução (432 dias = 14,1 meses). Novilhas P apresentaram maior número de prenhezes (2,3 ± 0,05 vs. 1,2 ± 0,06), nascimentos (2,1 ± 0,06 vs. 1,2 ± 0,07) e desmamas (1,4 ± 0,04 vs. 0,7 ± 0,05) comparado com novilhas NP ($P < 0,05$). O total de kg de bezerros desmamados por vaca foi maior para o grupo P (312,5 ± 10 kg) em relação ao grupo NP (146,8 ± 11 kg). A taxa de perda de gestação foi menor para o grupo NP (4,3%) em relação ao grupo P (14,0%). Não houve diferença entre os grupos na taxa de mortalidade de bezerro (10,5%), peso médio das novilhas na desmama (214,1 ± 1,8 kg), no momento do desafio para precocidade (280,0 ± 1,7 kg) e no peso adulto (445,1 ± 3,6 kg). As taxas de prenhez a IATF e final quando primíparas foram 41,6%^{a} e 67,9%^{x} para o grupo P e 27,9%^{b} e 60,4%^{y} para o grupo NP respectivamente. O peso médio na desmama foi de 211kg^{a} e 233kg^{b} para o primeiro e segundo parto das fêmeas do grupo P e 206kga para primíparas do grupo NP. Conclui-se que novilhas Nelore que se tornam gestantes entre 12 e 16 meses, aumentam o número de quilos de bezerros desmamados por fêmea exposta, mesmo apresentando maior perda de gestação, assim como não altera o peso adulto das vacas. Estudos prospectivos são certamente necessários para validar os resultados desse trabalho.

SBTE 081 IATF, TETF e IA

Concentração circulante de AMH e sua relação com fertilidade em vacas em lactação e novilhas da raça holandesa e jersey

Paulo David Carvalho[1]; Emiliana Oliveira Santana Batista[2]; John Verstegen[3]; Milo Charles Wiltbank[1]; Pietro Sampaio Baruselli[2]; Alexandre Henryli Souza[4]
1.University Of Wisconsin; 2.USP; 3.MOFA GLOBAL; 4.CEVA SAUDE ANIMAL.

Palavras-chave: AMH; fertilidade; vaca leiteira

O objetivo deste estudo foi verificar as concentrações circulantes do hormônio anti-Muleriano (AMH) nas raças Holandesa e Jersey e sua associação com fertilidade de vacas em lactação e novilhas nulíparas. Foi efetuada a coleta de sangue na base da cauda de vacas em lactação (n = 141 Holandesa e n = 82 Jersey) e novilhas (n = 407 Holandesa e n = 122 Jersey) com tubos a vácuo contendo EDTA. As amostras de sangue foram mantidas sob-refrigeração imediatamente após a coleta e a separação do plasma em tubos de eppendorf ocorreu dentro de 2 horas após a coleta, e as amostras foram congeladas para posterior análise das concentrações de AMH. A concentração plasmática de AMH foi realizada com o kit-MOFA (Bovine Fertility Assay®). Vacas em lactação e novilhas foram manejadas com detecção diária de cios pela mãnha seguido de IA e animais detectados não prenhes foram submetidos a protocolos de IATF (do tipo Ovsynch). A análise retrospectiva dos parâmetros reprodutivos foram os seguintes: 1) intervalo parto-concepção para vacas em lactação; 2) idade à concepção para novilhas nulíparas. As análises estatísticas foram efetuadas pelo procedimento Glimmix e Corr do software SAS (Versão 9.3 para Windows). A concentração de AMH foi similar entre vacas em lactação da raça Jersey e Holandês (Jersey = 312 ± 47 pg/ml; Holandês = 318 ± 61 pg/ml; P>0.10). Porém, novilhas Jersey tiveram maiores concentrações de AMH que novilhas da raça Holandesa (Jersey = 311 ± 31 pg/ml; Holandês = 225 ± 24 pg/ml; P<0.05). Independente de raça, a concentração circulante de AMH não foi correlacionada com intervalo parto-concepção em vacas em lactação (r = -0.05, P>0.10) ou idade à concepção em novilhas nulíparas (r = -0.06, P>0.10). Portanto, o AMH não parece ser um bom marcador de fertilidade em vacas ou novilhas de leite da raça Holandês e Jersey. Estes achados devem ser confirmados em experimentos futuros utilizando um maior número de animais. Agradecimentos: CAPES processo 2627-14-0, MOFA Global – USA.

SBTE 082 IATF, TETF e IA

Concentração de progesterona durante protocolo a base de P4/BE na prenhez a IATF em vacas holandesas em lactação

João Pedro De Albuquerque[1]; Eraldo Laerte Drago Filho[1]; Sergio Soriano[2]; Alex Fagner Sica[2]; Adnan Darin Pereira Rodrigues[1]; Augusto Mesquita Lacerda Madureira[1]; Jose Luiz Moraes Vasconcelos[1]
1.FMVZ/UNESP-BOTUCATU; 2.FAZENDA COLORADO.

Palavras-chave: Progesterona; fertilidade; primíparas

O presente estudo avaliou se a concentração de progesterona (P4) durante o desenvolvimento do folículo ovulatório em protocolo a base de P4/BE interfere na prenhez a IATF em vacas HPB em lactação. A hipótese é que vacas com maior P4 terão maior fertilidade. Para alterar a concentração de P4 os animais (n=594) foram distribuídos aleatoriamente em um de dois grupos para receberem um (n=310) ou dois (n=284) dispositivos intravaginais de P4 (CIDR®, Zoetis, SP, Brasil). O protocolo utilizado foi: no d-11 inserção de 1 CIDR (novo ou previamente usado por 9 dias)+aplicação de 2mg im de BE (Gonadiol®,Zoetis,SP,Brasil)+100mcg im de GnRH (Cystorelin®,Merial, SP, Brasil); d-4,aplicação de 25mg im de Dinoprost (Lutalyse®, Zoetis); d-2,aplicação de 25mg im de Dinoprost+1mg im de ECP (ECP®, Zoetis) + retirada do dispositivo de P4; d0, IATF. Os animais do grupo 2CIDR receberam um CIDR adicional no d-11, o qual foi retirado no d-4. Nos d-11 (n=117), d-4 (n=351), d0 (n=214) e d10 (n=72) foram colhidas amostras de sangue para determinação da concentração de P4. A prenhez foi determinada através de US nos d32 (DG1) e d60 (DG2). Dados binários foram analisados pelo PROC GLIMMIX, e os dados contínuos pelo PROC MIXED do SAS (foi considerada diferença significativa se P<0,05 e tendência se P<0,10). A P4 não diferiu entre os tratamentos no d-11 (1CIDR=4,2±0,4 ng/ml; 2CIDR=4,5±0,4 ng/ml; P>0,1), e no d-4 (1CIDR=3,5±0,2 ng/ml; 2CIDR=3,8±0,2 ng/ml; P>0,1). Foi detectada interação entre tratamento e presença de CL no início do protocolo na P4 no d-4 (sem presença de CL e 1CIDR=2,7±0,3 ng/ml; 2CIDR= 3,6±0,3 ng/ml; P<0,05). Não houve diferença na prenhez a IATF e nas perdas gestacionais entre os tratamentos (DG1: 1CIDR=26,1% [81/310] vs. 2CIDR=22,9% [65/284]; DG2: 1CIDR=23,9% [74/310] vs. 2CIDR=20,1% [57/283]; Perdas gestacionais: 1CIDR=8,6% [7/81] vs. 2CIDR=10,9% [7/64]; P<0,05). Houve interação entre [P4] no d-4 e ordem (Primíparas=PP; Multíparas=MP) no DG1 (P4 < 2.61 ng/ml: PP=12.1% [16/69] vs. MP=10.1% [21/107]; P4 ≥ 2.61 ng/ml: PP=37.7% [28/63] vs. MP=14.6% [30/113]; P<0.05), e no DG2 (P4 < 2,61 ng/ml: PP=12,4% [14/69] vs. MP=8,4% [19/107]; P4 ≥ 2,61 ng/ml:PP=34,2% [27/63] vs. MP=11,2% [27/113]; P<0,05). A suplementação de P4 exógena em animais submetidos a protocolo de IATF à base de P4/E2 com aplicação de GnRH em seu início não interferiu na prenhez a IATF. Aumento de P4 durante o desenvolvimento folicular aumenta a fertilidade em primiparas, mas não em multíparas.

SBTE 083 IATF, TETF e IA

Concentração de progesterona e resposta ovariana após a administração de PGF2αlpha no início do protocolo de IATF em novilhas taurinas de corte

Richard Núñez Olivera; Guido Kuffo; Federico Cuadro; Camila Simões; Romina Artagaveytia; Alejo Menchaca
FUNDACIÓN IRAUY.

Palavras-chave: Concentração de progesterona; iatf; monodose

O objetivo foi determinar o efeito do tratamento com PGF2α no início do protocolo de sincronização a base de progesterona e estradiol para IATF sobre as concentrações séricas de progesterona (P4), tamanho do folículo ovulatório e o momento da ovulação em novilhas taurinas de corte. Foram utilizadas 25 novilhas Hereford ciclando, com condição corporal 4,5±0,1 (escala 1 a 8). As novilhas foram distribuídas em um de dois grupos experimentais: 1) duas meias doses de PGF2α de 250 µg de cloprostenol (Ciclase DL, Syntex, Buenos Aires, Argentina) administradas na inserção e na remoção do dispositivo de P4 (DIB, 0,5 g de P4, Syntex, Argentina) ou 2) dose única de 500 µg de cloprostenol administrada no momento da retirada do dispositivo de P4. Todas as fêmeas foram sincronizadas usando um dispositivo de P4, mantido por 7 dias e associado a 2 mg de benzoato de estradiol (Gonadiol, Syntex) no momento da inserção. No momento da retirada do dispositivo de P4, 7 dias após, foram administrados 0,5 mg de cipionato de estradiol (Cipiosyn, Syntex) e 400 UI de eCG (Novormon, Syntex). As concentrações séricas de P4 foram determinadas diariamente, desde o inicio do tratamento até 24 horas após a retirada do dispositivo de P4. Os folículos ovarianos foram monitorados a cada 12 horas por ultrassonografia (WED-9618V, Well.D, Shenzhen, China) desde a retirada do dispositivo de P4 até o momento da ovulação. Os resultados foram analisados por GLM e apresentados como media±SEM. O uso de PGF2α na inserção e retirada do dispositivo de P4 reduz as concentrações circulantes de P4 durante o tratamento (3,9±0,4 vs. 7,1±1,1 ng/mL; P<0,05). Isto determinou maior crescimento do folículo dominante na retirada do DIB (12,2±0,5 mm) quando comparado com o grupo que recebeu somente PGF2α a remoção do dispositivo de P4 (9,6±0,5 mm; P<0,05). O diâmetro do folículo ao momento da ovulação mostrou uma tendência a ser maior para as novilhas do grupo com PGF2α ao inicio e ao final do tratamento (14,4±0,4 mm) em relação às novilhas tratadas somente ao final do tratamento (13,1±0,5 mm; P<0,10). A taxa de ovulação foi 100% (13/13) e 83,3% (10/12) para as novilhas com PGF2α ao inicio e ao final vs. as que receberam a PGF2α somente ao final do tratamento (P=0,43). Novilhas tratadas com PGF2α ao inicio (64,6±10,4 h) mostraram menor intervalo entre a retirada e a ovulação em comparação com as tratadas somente na retirada do dispositivo (78,0±8,5 h; P<0,05). Em conclusão, a administração de PGF2α na inserção e na retirada do dispositivo de P4, reduz as concentrações de P4 durante a permanência do dispositivo de P4, aumenta o tamanho do folículo ovulatório e reduz o intervalo entre a retirada do dispositivo de P4 e a ovulação de novilhas taurinas de corte.

SBTE 084 IATF, TETF e IA

Concentração endógena de progesterona interfere na liberação deste hormônio por dispositivos intravaginais

Humberto Del Hoyo Neri[1]; Miller Pereira Palhão[1]; Deiler Sampaio Costa[2]; João Henrique Moreira Viana[3]; Ana Cristina Silva De Figueiredo[1]; Carlos Antônio De Carvalho Fernandes[1]
1.UNIFENAS; 2.Universidade Federal Do Mato Grosso Do Sul; 3.EMBRAPA.

Palavras-chave: Progesterona; inseminação artificial; iatf

A crescente utilização da Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) observada no Brasil nos últimos anos se deve a vários fatores como a possibilidade do seu uso em vacas acíclicas e antecipação dos partos à estação de monta. Nesse contexto, o uso de dispositivos intravaginais de progesterona (P4), além de apresentar elevada relevância técnica, representa 43 % do custo total dos protocolos. Com o intuito de viabilizar a aplicação da técnica e reduzir os custos necessários para sua realização, vários autores descreveram a possibilidade de reutilização dos dispositivos de liberação de P4 (DLP), porém os resultados são controversos e não descrevem com precisão a quantidade do esteroide remanescente nos dispositivos após terem sido utilizados em vacas com diferentes fases luteínicas (i.e concentração circulante de P4). O objetivo deste trabalho foi quantificar a concentração de P4 remanescente em DLPs novos de 1 g, após terem sido utilizados uma única vez em novilhas com diferentes concentrações de P4 endógena. Trinta novilhas mestiças cíclicas foram divididas em três grupos (n=10): Em G1 e G2, o DLP (DIB, MSD – Brasil) foi inserido (D0), sete dias após a ovulação induzida com benzoato de estradiol (Benzoato HC, Hertape – Brasil). Adicionalmente, 0,15 mg de D-cloprostenol (Veteglan, Hertape - Brasil) foi administrado três dias depois para promover a luteólise em G2. Para G3, a luteólise foi induzida pela aplicação de 2 doses de D-cloprostenol, 04 e 03 dias antes da inserção do DLP para que a P4 exógena fosse a única fonte desse hormônio. Os três grupos permaneceram com o DLP por 08 dias, simulando um protocolo de IATF. Após o tratamento, três DLP de cada grupo foram separados e 3 unidades de dispositivos novos (G4) foram submetidos a remoção, moagem e pesagem do silicone. A extração da P4 foi realizada com metanol e as amostras foram avaliadas em duplicata por RIA (IM 1188, Immunotech Inc., Prague, República Tcheca). As amostras de G4 foram consideradas como padrão e utilizadas para validação da técnica de extração. Médias de P4 foram comparadas entre os grupos utilizando o teste de Tukey. A concentração de P4 remanescente nos dispositivos foi de 30,75 + 1,13 ng/mL(a), 14,65 + 1,65 ng/mL(b), 10,96 + 1,15 ng/mL(c), 7,91 + 1,22 ng/mL(d), ($p<0,05$), para G4, G1, G2 e G3 respectivamente. Adicionalmente, o valor absoluto do resíduo encontrado nos DLP´s para G4, G1, G2 e G3 foi de 1.000 mg (a), 478 mg (b), 349 mg (c) e 257 mg(d), ($p<0,05$), respectivamente. Portanto a concentração de progesterona residual após a utilização dos DLP é influenciada pela concentração endógena deste esteróide. Animais com níveis elevados de P4 endógena determinam maiores concentrações residuais deste hormônio nos DLP. Adicionalmente, menores quantidades de P4 residual são esperadas quando tais dispositivos são utilizados em fêmeas não cíclicas.
Agradecimento: Fapemig, CAPES e CNPQ

SBTE 085 IATF, TETF e IA

Diferentes doses de gonadotrofina coriônica equina no protocolo de IATF de vacas taurinas de corte lactantes: impacto no crescimento folicular e na ocorrência de estro

Giovane Wolffenbüttel Carloto[1]; Ana Paula Martini[2]; Gilson Antonio Pessoa[2]; Mityelle Da Costa Chaves Rodrigues[3]; Cassio Cassal Brauner[3]; Pietro Sampaio Baruselli[4]; Mara Iolanda Batistella Rubin[2]; Marcio Nunes Correa[3]; Fábio Gallas Leivas[1]; Manoel Francisco Sá Filho[4]
1.UNIPAMPA; 2.UFSM; 3.UFPEL; 4.USP.

Palavras-chave: eCG; IATF; *Bos taurus*

Avaliou-se o uso de diferentes doses (0, 300 ou 400 UI) de gonadotrofina coriônica equina (eCG), no momento da retirada do dispositivo de progesterona (P4) e seu impacto no crescimento folicular e na ocorrência de estro em vacas de corte taurinas lactantes. Vacas oriundas de cinco fazendas comerciais localizadas em três regiões distintas do estado do RS foram utilizadas. No início do protocolo (D0), 996 vacas com escore de condição corporal de 2,77±0,02 (escala de 1 a 5) receberam um dispositivo de P4 (CIDR®, Zoetis, SP, Brasil) e 2 mg IM de benzoato de estradiol (BE; Gonadiol®, Zoetis). No D9, o dispositivo foi removido e foram administrados IM 12,5 mg de dinoprost trometamina (Lutalyse®, Zoetis) e 1 mg de cipionato de estradiol (E.C.P.®, Zoetis). Neste mesmo momento as fêmeas foram distribuídas em um de três grupos experimentais: Controle (n=323; sem eCG), 300UI (n=326) e 400UI (n=317) de eCG (Novormon®, Zoetis). A inseminação artificial em tempo fixo (IATF) foi realizada 48 horas após a remoção da P4. Ainda as fêmeas tiveram a base da cauda pintada com bastão de cera (Raidl-Maxi, Raidex GmbH, Dettingen/Erms, Germany) no momento da retirada do dispositivo de P4. As fêmeas que não apresentavam tinta no momento da IATF foram consideradas em cio. Adicionalmente, 435 vacas em anestro (ausência de corpo lúteo no momento da inserção do dispositivo de P4; Controle: n=146; 300UI: n=153; 400UI: n=136) tiveram o diâmetro folicular no momento da retirada do dispositivo de P4 e da IATF avaliados para determinar o crescimento folicular após o tratamento com eCG. A análise estatística foi realizada pelo PROC GLIMMIX do SAS®, sendo os dados analisados por contraste ortogonal (C): C1 (efeito do eCG) e C2 (efeito da dose de eCG). O tratamento com eCG aumentou a ocorrência de estro (Controle = 53,7%, 300 IU = 70,6% e 400 UI = 77,0%; C1; P <0,0004), no entanto, não houve diferença entre as doses utilizadas (C2; P = 0,58). Ainda, devido à semelhança do tamanho folicular no momento da remoção do dispositivo de P4 (Controle = 11,0 ± 0,2 mm, 300 UI = 10,7 ± 0,2 mm e 400 UI = 11,0 ± 0,2 mm; C1; P = 0,32 e C2; P = 0,38) e o maior diâmetro folicular encontrado no momento da IATF das vacas tratadas com eCG (Controle = 13,5 ± 0,3 mm, 300 IU = 14,0 ± 0,2 mm e 400 IU = 15,1 ± 0,3 mm; C1 ; P < 0,04 e C2 ; P = 0,19), o crescimento folicular (mm/dia) foi maior (Controle = 1,2 ± 0,1 mm, 300 UI = 1,6 ± 0,1 mm e 400 UI = 2,1±0,1 mm; C1; P < 0,0001) nas fêmeas tratadas com eCG, independente da dose administrada (C2; P = 0,33). Conforme indica a literatura, animais que possuem folículo maior e manifestam estro têm maior probabilidade de prenhez. Portanto, o tratamento com eCG, independente da dose de 300 ou 400 UI administrada, aumenta a ocorrência de estro e o crescimento folicular em vacas taurinas de corte lactantes. Agradecimentos: Zoetis, Agropecuária Odair Gonzáles, Fazenda Dois Angicos, Estância Nova Aurora, Cabanha Aguada e Agropecuária Posto Branco.

SBTE 086 IATF, TETF e IA

Diferentes doses de gonadotrofina coriônica equina no protocolo de inseminação artificial em tempo fixo em vacas taurinas lactantes: impacto sobre a taxa de prenhez

Ana Paula Martini[1]; Gilson Antonio Pessoa[1]; Giovane Wolffenbüttel Carloto[2]; Mityelle Da Costa Chaves Rodrigues[3]; Cassio Cassal Brauner[3]; Pietro Sampaio Baruselli[4]; Mara Iolanda Batistella Rubin[1]; Marcio Nunes Correa[3]; Fábio Gallas Leivas[2]; Manoel Francisco Sá Filho[4]
1.UFSM; 2.UNIPAMPA; 3.UFPEL; 4.USP.

Palavras-chave: Bovino; eCG; IATF

Neste estudo foi avaliado o uso de diferentes doses (0, 300 ou 400 UI) de gonadotrofina coriônica equina (eCG; Novormon®, Zoetis, Cravinhos/SP, Brasil), no momento da retirada do dispositivo de progesterona (P4; CIDR®, Zoetis) e seu impacto sobre a taxa de prenhez por inseminação artificial (P/IA) em vacas de corte *Bos taurus* lactantes. As vacas mantidas em campo nativo eram provenientes de cinco fazendas comerciais localizadas em três regiões distintas do Rio Grande do Sul/Brasil (sudeste, sudoeste e centro ocidental). No início do protocolo (D0), 996 vacas com escore de condição corporal de 2,77±0,02 (escala de 1 a 5) receberam um dispositivo de P4 e 2 mg IM de benzoato de estradiol (BE; Gonadiol®, Zoetis). No D9, o dispositivo foi removido e foram administrados por via IM 12,5 mg de dinoprost trometamina (Lutalyse®, Zoetis) e 1 mg de cipionato de estradiol (E.C.P.®, Zoetis). Neste mesmo momento as fêmeas foram distribuídas em um de três grupos experimentais: Controle (n=323; sem eCG), 300UI (n=326) e 400UI (n=317) de eCG. A inseminação artificial em tempo fixo (IATF) foi realizada 48h após a remoção da P4. Adicionalmente, 718 vacas foram submetidas a exame ultrassonográfico no momento da inserção e remoção do dispositivo de P4 para avaliação da presença de corpo lúteo (CL). O diagnóstico de gestação foi efetuado 30d após a IATF com auxílio do ultrassom. A análise estatística foi realizada pelo PROC GLIMMIX do SAS®, sendo os dados analisados por contrastes ortogonais (C): C1 (efeito do eCG) e C2 (efeito da dose de eCG). O tratamento com eCG aumentou a P/IA (Controle = 29,7%; 300 UI = 44,8% ou 400 UI = 47,6%; C1; P <0,0001). No entanto, não houve diferença entre doses de eCG (C2; P = 0,55). Na amostra de fêmeas avaliadas quanto à presença de CL observou-se interação entre ciclicidade e o tratamento sobre a P/IA (P = 0,05). A taxa de ciclicidade geral foi de 21,2% (152/718). Não houve efeito do eCG nas fêmeas cíclicas [Controle = 55,4% (31/56); 300 UI = 54,2% (26/48) ou 400 UI = 52,1%(25/48)]. No entanto, nas fêmeas não cíclicas observou-se efeito positivo do tratamento com eCG [Controle = 25,8% (47/182); 300 UI = 41,6% (82/197) ou 400 UI = 49,7% (93/187)]. Conclui-se que o tratamento com eCG (300 ou 400 UI), administrado no momento da remoção da P4 aumentou P/IA em vacas de corte *Bos taurus* lactantes em anestro.
Agradecimentos: Zoetis, CAPES, Agropecuária Posto Branco – Fazenda Nova Esperança, Cabanha Aguada, Agropecuária Odair Gonzáles, Fazenda Três Angicos e Estância Nova Aurora.

SBTE 087 IATF, TETF e IA

Diâmetro do folículo no qual a eCG apresenta efeito sobre o crescimento folicular e fertilidade de vacas *Bos indicus* submetidas à IATF

Miguel Pizzolante Bottino[1]; Renato Wihby Girotto[2]; Pietro Sampaio Baruselli[3]; José Nélio De Sousa Sales[1]
1.Universidade Federal De Lavras; 2.RG Genética Avançada; 3.Universidade De São Paulo.

Palavras-chave: eCG; fertilidade; zebu

O objetivo do presente estudo foi identificar em que diâmetro do folículo, no dia do tratamento da eCG, ocorre aumento no crescimento folicular e na taxa de prenhez de vacas *Bos indicus* submetidas à IATF. No estudo foram utilizadas 556 vacas lactantes, com período pós-parto entre 30 e 60 dias e escore de condição corporal (ECC) de 2,89±0,02 (escala de 1 a 5). Em dia desconhecido do ciclo estral (D0), os animais receberam 2 mg de benzoato de estradiol (Sincrodiol®, Ourofino, Brasil) e um dispositivo intravaginal de progesterona (Sincrogest®, Ourofino). No D8 as vacas receberam 500µg de Cloprostenol (Sincrocio®, Ourofino) e 1mg de cipionato de estradiol (E.C.P.®, Zoetis, Brasil) e os dispositivos de progesterona foram removidos. Nesse momento, as vacas foram distribuídas de acordo com o diâmetro folicular em um de dois tratamentos (Grupo Controle e Grupo eCG). Os animais do Grupo eCG (n=277) receberam 300UI de eCG (Folligon®, MSD, Brasil) e as vacas do grupo controle (n=279) não receberam tratamento. As vacas foram inseminadas em tempo fixo 48 horas após a retirada dos dispositivos de progesterona. No estudo foram realizados exames ultrassonográficos no D8 e D10 para mensurar o diâmetro folicular e no D40 para o diagnóstico de gestação. A análise estatística foi realizada pelo procedimento GLIMMIX do SAS. As vacas do grupo eCG [1,17±0,06 mm/dia e 55,2% (153/277)] apresentaram maior crescimento folicular e taxa de prenhez do que o grupo Controle [0,76±0,05 mm/dia e 39,4% (110/279); P=0,001]. Após a avaliação de diferentes diâmetros foliculares na retirada do dispositivo de progesterona, verificou-se que a eCG apresentou efeito sobre o crescimento folicular e taxa de prenhez em vacas com folículo menores que 10,6mm e 9,4mm, respectivamente. Assim, nas vacas com folículos <10,6 mm, o Grupo eCG (1,35±0,09 mm/dia) apresentou maior crescimento folicular do que o Grupo Controle (0,79±0,07 mm/dia; P=0,001) e nas vacas com folículos <9,4 mm, o Grupo eCG [37,4% (34/91)] apresentou maior taxa de prenhez do que o Grupo Controle [15,7% (17/108); P=0,001]. Conclui-se que o tratamento com a eCG em protocolo de IATF aumentou o crescimento folicular e a taxa de prenhez em vacas com folículos <10,6 mm e <9,4 mm, respectivamente.

SBTE 088 IATF, TETF e IA

eCG incorporado ao protocolo de IATF aumenta a concepção de vacas leiteiras mestiças com até 70 del

Alexandre Barbieri Prata; Pedro Leopoldo Jerônimo Monteiro Jr; Guilherme Corrêa De Sousa Pontes; Jessica Nora Drum; Roberto Sartori
ESALQ / USP.

Palavras-chave: Vaca leiteira; eCG; IATF

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do tratamento com eCG em protocolo de sincronização da ovulação na fertilidade de vacas mestiças (*Bos taurus* x *Bos indicus*) lactantes, inseminadas em tempo fixo (IATF) entre outubro de 2013 e julho de 2014. Foram utilizadas 679 vacas, sendo 492 multíparas e 187 primíparas, com produção média de 21,4 ± 7,6 kg/d e DEL médio de 124,6 ± 97,1. Em dia aleatório do ciclo estral, todas as vacas receberam um dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR®, Zoetis, Brasil), 2 mg de benzoato de estradiol i.m. (Gonadiol®, MSD, Brasil) e 100 µg de gonadorelina (Fertagyl®, MSD) pela manhã (D0). No D7 de manhã todos os animais receberam 150µg de D-Cloprostenol i.m. (Sincrocio®, Ouro Fino, Brasil) e foram divididos aleatoriamente em dois grupos: eCG (n = 340) - receberam 400 UI de eCG i.m. (Novormon, MSD); e Controle (n = 339) - não receberam eCG. No D8 à tarde, os dispositivos foram retirados e aplicou-se em todas as vacas 150 µg de D-Cloprostenol i.m. e 1 mg de benzoato de estradiol. A IATF foi realizada no D10 de manhã. O diagnóstico e a confirmação da gestação foram realizados 30 e 60 dias após IA. A análise estatística foi realizada por meio de regressão logística no PROC GLIMMIX do SAS e os resultados estão apresentados seguindo a ordem dos grupos eCG e Controle. Na prenhez por IA (P/IA), o grupo eCG apresentou melhor fertilidade tanto aos 30 (37,8% vs. 30,2,3%; P = 0,06) quanto aos 60 (31,9% vs. 25,1%; P = 0,08) dias. Contudo, as perdas gestacionais entre 30 e 60 (9,4% vs. 14,4%; P = 0,3) dias e entre 60 dias até o parto (9,2% vs. 12,2%; P = 0,5) não diferiram entre os grupos. Além disso, não houve diferença na proporção de parto gemelar entre os grupos (4,1% vs. 2,4%; P = 0,5). No entanto, houve interação (P = 0,09) entre o uso de eCG e o DEL. Vacas tratadas com eCG e inseminadas até 70 dias pós-parto tiveram maior P/IA aos 30 (39,0% vs. 25,2%; P = 0,02) e aos 60 dias (32,8% vs. 21,3%; P = 0,05). Isso não ocorreu nas vacas inseminadas com DEL superior a 70 dias aos 30 (36,6% vs. 35,7%; P = 0,8) ou aos 60 (31,1% vs. 29,9%; P = 0,7) dias. Concluiu-se que o uso de eCG no D7 do protocolo aumentou a fertilidade geral de vacas mestiças leiteiras submetidas a IATF, devido a melhora na P/IA das vacas inseminadas até os 70 dias de DEL. Além disso, o uso de eCG no D7 do protocolo não aumentou a taxa de gestação gemelar.
Agradecimentos: FAPESP, CNPq, CAPES, MSD, Fazendas Queima Ferro e São João.

SBTE 089 IATF, TETF e IA

Efecto de la concentracion de progesterona y el momento de la GnRH en las tasas de preñez de vaquillonas holando tratadas con el protocolo j-synch

Gabriel Amilcar Bo[1]; Martin Gonzalo Re[2]; Gustavo Curchod[1]; Damian Alessio[1]
1.Instituto A.P. De Ciencias Basicas Y Aplicadas, Universidad Nacional De Villa Maria; 2.Actividad Privada.

Palavras-chave: Progesterona; GnRH; holando

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de diferentes concentraciones de progesterona (P4) en los dispositivos intravaginales (DIV) y distintos momentos de aplicación de la GnRH en vaquillonas de leche tratadas con el protocolo J Synch. En el experimento 1, se utilizaron vaquillonas Holando (n=80). En el Día 0, todas las vaquillonas recibieron 2 mg de benzoato de estradiol (BE, Proagro Argentina), mientras que la mitad fueron tratadas con DIV con 0,5 g de P4 (Synkro, Proagro, Argentina) y la otra mitad con un DIV con 1 g P4 (DIB, Syntex SA, Argentina). En el Día 6, se retiraron los DIV y todas recibieron 150 µg D+cloprostenol (PGF; Sincronil, Proagro). Las vaquillonas fueron nuevamente subdivididas para recibir 10,5 µg de acetato de buserelina (GnRH, Pro Buserelina, Proagro) a las 56 o 72 h y todas fueron inseminadas a tiempo fijo (IATF) a las 72 h. Se evaluó la dinámica folicular, ovulación y tasas de preñez a los 32 días por medio de ultrasonografía (Honda 101 V, 5.0 Mhz). La ovulación ocurrió antes cuando la GnRH se aplicó a las 56 h 91,9±3,2 h) que cuando se aplicó a las 72 h (98,8±3,2 h; P= 0,035). Sin embargo, no hubo diferencia en la hora de ovulación entre las vaquillonas tratadas con los DIV de 0,5 g (92,8±2.2 h) o 1 g de P4 (97,9±2.8 h; P= 0,126). Hubo una interacción entre DIV y momento de la GnRH (P=0,018) en el diámetro del folículo preovulatorio, siendo menor para el subgrupo DIV 1 g y GnRH 56 h (11,8±0,4 mm) respecto al subgrupo DIV 1 g GnRH 72 h (13,4±0.4 mm; P<0,05), mientras que los otros subgrupos, DIV 0,5 g GnRH 56 h (13,1±0,4 mm) y DIV 0,5 g GnRH 72 h (12,6±0,4 mm) fueron intermedios. Finalmente, tasa de preñez fue mayor para los animales tratados con el DIV 0,5 g (19/40; 72.5%) respecto a los animales que recibieron DIV 1 g (16/40 40%; P=0,006). Mientras que no hubo diferencias entre las tratadas con GnRH a las 56 (55.0%) o 72 h (57.8%; P=0.9). En el experimento 2 se evaluó la tasa de preñez en vaquillonas Holando (n=417) que recibieron DIV de 0,5 g de P4 y 2 mg de BE en el Día 0 y fueron divididas en tres grupos. Las vaquillonas de los dos primeros grupos fueron tratadas con el protocolo J-Synch, recibieron GnRH a las 56 o 72 h y fueron IATF a las 72 h de la remoción del DIV. Las vaquillonas del grupo control fueron tratadas con un DIV por 7 días, PGF junto con la remoción del DIV, 1 mg de BE en el Día 8 y fueron IATF a las 56 h del retiro del DIV. No hubo diferencias significativas en las tasas de preñez entre las vaquillonas tratadas con el protocolo J-Synch con GNRH a las 56 h (82/137; 59,9%), las tratadas con el protocolo J-Synch y GnRH a las 72 h (89/140; 63,6%) y las del grupo control (86/139; 61,9%; P=0,816). A pesar que los dispositivos con menor contenido de P4 mejoraron las tasas de preñez al protocolo J-Synch, el momento de la administración de GnRH no la afecto. Por último, las tasas de preñez con el protocolo J-Synch no fueron diferentes que la obtenida con el protocolo convencional de 7 días.

SBTE 090 IATF, TETF e IA

Efeito da angiotensina-(1-7) na taxa de ovulação de cabras submetidas a inseminação artificial em tempo fixo

Amilton Paulo Raposo Costa; Andréia Da Silva Costa; José Adalmir Torres Souza; Felipe Pereira Da Silva Barçante; Antonio Sousa Junior; Joilson Ferreira Batista; Icaro O. Torres Sousa
Universidade Federal Do Piaui (UFPI).

Palavras-chave: Inseminação artificial; ECA; progesterona

Estudo anterior mostrou aumento na produção de estradiol próximo à ovulação em ovelhas submetidas a protocolo de sincronização de estro quando da aplicação de maleato de enalapril (inibidor da Enzima Conversora de Angiotensina-ECA) nos três últimos dias de um protocolo de sincronização de estro (Costa et al., Reproduction in Domestic Animal, v.49, p. e53-e55, 2014). O mecanismo desta resposta pode ser devido ao aumento de angiotensina-(1-7), novo tipo de peptídeo do sistema renina-angiotensina, que ocorre como consequência da inibição da ECA (Brosnihan et al., Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v.37, p.1255-1262, 2004). No presente trabalho avaliou-se o efeito da angiotensina-(1-7) na taxa de ovulação de cabras submetidas a um protocolo de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) quando aplicada próximo ao período ovulatório. Todos os animais foram submetidos ao protocolo de sincronização do estro e ovulação, com 60mg de acetato de medroxiprogesterona (Progespon-Syntex, Luis Guill on, Buenos Aires, Argentina) em esponjas intravaginais durante 11 dias. No 9º dia foram aplicados, im, 300UI de eCG (Novormon-Syntex) e 125µg de cloprostenol (Sincrocio-Ouro Fino, Cravinhos, São Paulo, Brazil). No dia 11 foram removidas as esponjas e nos dias 12 e 13 (24 e 48h após a retirada das esponjas, respectivamente) os animais receberam os tratamentos de acordo com os grupos experimentais: o grupo controle recebeu 30µg/kg de ciclodextrina em 2ml de água destilada por animal, via subcutânea e o grupo angiotensina recebeu, também por via subcutânea, 50µg/kg da associação Ang-(1-7)+ciclodextrina, correspondente a 20µg/kg de angiotensina-(1-7), diluída em 2ml de água destilada. As ciclodextrinas são carboidratos complexos utilizados em produtos farmacêuticos apenas para dar solubilidade ao produto. A IA foi realizada 38 e 50 horas após a retirada das esponjas, com sêmen congelado, oriundo de reprodutores aprovados em exames andrológicos. Após sete dias da última IA foram coletados sangue da veia jugular externa de 39 animais (20 do grupo angiotensina e 19 do grupo controle) usando tubos a vácuo sem anticoagulante e com gel separador. O soro foi congelado a -20°C até a realização das análises. As concentrações de progesterona foram determinadas pelo teste de Elisa (Interkit-BioCheeck, Foster City, CA, EUA). Os resultados foram analisados pelo teste exato de Fisher ($p<0,05$). O grupo controle apresentou 73,68% (14/19) de ovulação e o grupo angiotensina-(1-7) apresentou 80% (16/20). Não houve diferença estatística entre os dois tratamentos ($P = 0,72$). Conclui-se que a aplicação de angiotensina-(1-7) durante o período pré-ovulatório, com apenas duas aplicações, não foi capaz de incrementar a taxa de ovulação de cabras submetidas à IATF.

SBTE 091 IATF, TETF e IA

Efeito da associação entre benzoato de estradiol e GnRH no início do protocolo de IATF na fertilidade de vacas holandesas de alta produção

Rafael Ruggeri[1]; Cesar Diniz Narciso[1]; Emiliana Oliveira Santana Batista[2]; Pietro Sampaio Baruselli[2]; Roberto Sartori[2]; Alexandre Henryli Souza[3]
1.VITROGEN WEST; 2.USP; 3.CEVA SAUDE ANIMAL.

Palavras-chave: Benzoato de estradiol; IATF; vaca leiteira

Este estudo foi delineado para testar a hipótese que a associação de benzoato de estradiol (BE) e GnRH no início do protocolo de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) pode melhorar a concepção (P/IA) em vacas de leite de alta produção. Vacas Holandesas (n = 254) com média de produção diária de 41,3 ± 5,8 kg, condição corporal de 2,9 ± 0,1 e aos 158,3 ± 9,4 DEL foram sincronizadas pela primeira vez pós-parto ou quando detectadas vazias ao diagnóstico de gestação. Os animais foram aleatoriamente distribuídos conforme ordem de lactação e presença de corpo lúteo (CL) no D0 a receber um os seguintes protocolos de sincronização para IATF: 1) BEGnRH: D0 = 2mg de BE (Sigma-Aldrich®)+ inserção de um dispositivo intravaginal de P4 (CIDR, Zoetis), D2 = GnRH (0,1 mg gonadorelina, Factrel, Zoetis), D7 = PGF2a (25mg dinoprost, Zoetis) e remoção do implante de P4, D8 = segunda aplicação de PGF2a, D10 = IATF efetuada simultaneamente com aplicação de GnRH, aproximadamente 72h após remoção do implante de P4; 2) NOBEGnRH: mesmo protocolo, porém sem o uso de BE no D0. O diagnóstico de gestação foi efetuado por meio de exames ultrasonográficos 30 dias após a IA. As análises estatísticas foram efetuadas pelo procedimento Glimmix do SAS, 9.3. Vacas que receberam BE associado ao GnRH no início do protocolo de IATF tiveram melhores taxas de concepção se comparado com vacas que receberam somente o GnRH (42,0% vs 31,0%; P<0,05). Além disso, não houve interação entre tipo de protocolo e ordem de lactação (Primíparas: BEGnRH = 36,8% vs NOBEGnRH = 22,2%, P=0,11; Multíparas: BEGnRH = 43,5% vs NOBEGnRH = 41,2%, P=0,80) ou presença de CL (com CL: BEGnRH = 48,0% vs NOBEGnRH = 31,6%, P=0,06; sem CL: BEGnRH = 32,7% vs NOBEGnRH = 30,0%, P=0,79). Estes resultados mostram um efeito positivo da associação entre BE e GnRH no início do protocolo de IATF, porém experimentos futuros são necessários para elucidar possíveis mecanismos fisiológicos para essa melhora na fertilidade, possivelmente relacionada ao melhor controle do momento de emergência da onda folicular. Agradecimentos: Zoetis.

SBTE 092 IATF, TETF e IA

Efeito da categoria animal na eficiência da TETF em bubalinos

Julia Gleyci Soares[1]; Nelcio Antonio Tonizza De Carvalho[2]; Diego Cavalcante De Souza[3]; Andrea Cristina Basso[4]; Antonio Nogueira Vieira[4]; Rodrigo Mendes Untura[4]; Breno Marcassa De Godoi[4]; Cesar Augusto Moreira Da Silva[4]; José Nélio De Sousa Sales[5]; Pietro Sampaio Baruselli[1]
1.VRA/FMVZ/USP; 2.Unidade De Pesquisa E Desenvolvimento/Pólo Regional Do Vale Do Ribeira/APTA; 3.CATI; 4.In Vitro Brasil S/A; 5.DMV-UFLA.

Palavras-chave: Búfalas; embrião; TETF

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da categoria animal (novilha, primípara ou multípara) na eficiência da transferência de embriões em tempo fixo (TETF) em bubalinos. Foram utilizadas 125 búfalas, distribuídas de acordo com a categoria em três grupos: nulíparas (GN, n=42), primíparas (GP, n=27) e multíparas (GM, n=56). Em dia aleatório do ciclo estral (D0), todos os animais foram submetidos ao mesmo protocolo de TETF, que consistiu na inserção de um dispositivo intravaginal de progesterona (P4, 1g, Sincrogest®, Ourofino Agronegócio, Brasil) e na administração simultânea de 2mg im (intramuscular) de Benzoato de Estradiol (BE, Sincrodiol®,Ourofino Agronegócio). Nove dias após (D9), o dispositivo de P4 foi removido e os animais receberam 530µg im de Cloprostenol sódico (Sincrocio®, Ourofino Agronegócio) mais 400 UI im de eCG (Folligon, MSD Saúde Animal, Brasil). No D11, todas as búfalas receberam 20µg im de GnRH (Sincroforte®, Ourofino Agronegócio). As fêmeas foram avaliadas quanto à presença de CL oito dias após a remoção dos dispositivos (D17) e apenas aquelas com CL foram submetidas à TETF. Foram realizadas avaliações ultrasonográficas (Mindray DP2200Vet, China) nos seguintes dias: D11, para aferir o diâmetro do maior folículo ovariano; D17, para avaliar o diâmetro do maior folículo ovariano, do CL e a taxa de ovulação e D40, para o diagnóstico de gestação. As variáveis binomiais e contínuas foram analisadas pelos procedimentos GLIMMIX e MIXED do SAS®, respectivamente. Foi considerada significância quando $P \leq 0,05$. Não foram verificadas diferenças entre as categorias (GN vs. GP vs. GM) com relação ao diâmetro do maior folículo no D11 (10,5±0,3 vs.11,1±0,5 vs.11,5±0,4 mm; P=0,25) e no D17 (10,5±0,4 vs.12,0±1,1 vs.11,7±0,6 mm; P=0,30), ao diâmetro do CL (16,1±0,3 vs. 15,4±0,9 vs.16,6±0,4 mm; P=0,24), as taxas de concepção (38,5 vs. 40,0 vs. 27,5 %; P=0,56) e de prenhez (23,8 vs.14,8 vs.19,6 %; P=0,65). Porém, a taxa de ovulação diferiu entre primíparas e as multíparas (61,9ab vs. 42,3b vs. 71,4a %; P=0,001). Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que é possível utilizar a TETF nas diferentes categorias (nulíparas, primíparas e multíparas) de fêmeas bubalinas.

SBTE 093 IATF, TETF e IA

Efeito da presença de corpo lúteo em búfalas em lactação na resposta ao protocolo ovsynch durante a estação reprodutiva favorável (resultados preliminares)

Diego Cavalcante De Souza[1]; Nelcio Antonio Tonizza De Carvalho[2]; Julia Gleyci Soares[3]; Bruno Moura Monteiro[3]; Ed Hoffmann Madureira[3]; Pietro Sampaio Baruselli[3]
1.Escritório De Desenvolvimento Rural De Registro/Cati; 2.Unidade De Pesquisa E Desenvolvimento De Registro-Pólo Regional Do D.S.A. Do Vale Do Ribeira/Apta; 3.Departamento De Reprodução Animal, VRA-FMVZ-USP.

Palavras-chave: Ovsynch; ciclicidade; búfalas

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da ciclicidade de búfalas em lactação na resposta ao protocolo *Ovsynch* durante a estação reprodutiva favorável (outono e inverno). Foram utilizadas 99 búfalas, com média de 5,3±0,2 partos, ECC de 3,5±0,1 e 85,5±5,2 dias pós-parto, divididas em dois grupos experimentais: grupo sem corpo lúteo (CL; GC; n=50) e grupo com CL (GCL; n=49). Em dia aleatório do ciclo estral (D0), todas as búfalas receberam a aplicação intramuscular (im) de 10µg de GnRH (Acetato de buserelina, Prorelinn®, Innovare Biotecnologia e Saúde Animal, Monte Aprazivel, Brasil). No D7, os animais receberam via im 0,53mg de PGF2α (Cloprostenol sódico, Cioprostinn®, Innovare Biotecnologia e Saúde Animal, Monte Aprazivel, Brasil). Dois dias após (D9), foram administradas via im 10µg de GnRH (Prorelinn®) e, 16 horas mais tarde, todas as búfalas foram submetidas à IATF (D10). Avaliações ultrassonográficas (Mindray DP-2200Vet; Shenzhen, China) foram realizadas para determinar a ciclicidade dos animais (presença de CL no D0), a taxa de ovulação ao primeiro GnRH (Ov-1ºGnRH; presença de CL no D9), o diâmetro do folículo dominante (øFD) no D9 e no D10, a taxa de ovulação ao segundo GnRH (Ov-2ºGnRH; avaliações no D10 e D13) e a taxa de concepção (DG) no D40. A funcionalidade (vascularizações central – VC; e periférica – VP; Escore de 0 a 4, em que "0" corresponde a ausência de vascularização e 4 a máxima vascularização) e o diâmetro do CL (øCL) foram avaliados por meio de ultrassonografia em modo color Doppler (Mindray M5Vet; Shenzhen, China) no D17, no D21 e no D25. A comparação entre as variáveis foi realizada por análise de variância (ANOVA), pelo procedimento GLIMMIX do SAS®. As variáveis VC, VP e øCL foram analisadas como medidas repetidas no tempo, utilizando o procedimento MIXED do SAS® por meio dos efeitos de tratamento, tempo e interação entre estes (Trat.*Tempo). Foi considerada diferença quando P<0,05. Em todas as variáveis analisadas, o GCL apresentou resultados superiores ao GC: Ov-1ºGnRH (89,8 vs. 42,0 %; P<0,01); øFD no D9 (13,4±0,3 vs. 12,1±0,3 mm; P<0,01); øFD no D10 (13,9±0,3 vs. 12,3±0,3 mm; P<0,01); Ov-2ºGnRH (87,8 vs. 52,0 %; P<0,01) e DG (65,3 vs. 20,0 %; P<0,01). Da mesma forma, nas avaliações do CL nos Dias 17, 21 e 25, o GCL apresentou melhores resultados comparado ao GC: VC = 2,8±0,2, 3,1±0,1, 3,3±0,1 vs. 1,8±0,3, 2,0±0,3, 2,2±0,3 (Trat.: P <0,01, Tempo: P=0,02, Trat.*Tempo: P=0,93); VP = 3,2±0,2, 3,5±0,1, 3,6±0,1 vs. 2,3±0,3, 2,4±0,3, 2,4±0,3 (Trat.: P<0,01, Tempo: P=0,14, Trat.*Tempo: P=0,83); øCL = 17,3±0,5, 18,7±0,4, 19,2±0,5 vs. 15,2±0,8, 14,4±0,9, 14,1±0,9 mm (Trat.: P<0,01, Tempo: P=0,02, Trat.*Tempo: P<0,01). Conclui-se que búfalas com CL no início do protocolo apresentam melhor resposta ao protocolo *Ovsynch* em comparação às fêmeas que apresentam ausência de CL no início do protocolo, durante a estação reprodutiva favorável.

SBTE 094 IATF, TETF e IA

Efeito da prostaglandina aplicada no início do protocolo de sincronização de cio com progesterona e estradiol em novilhas *Bos taurus taurus*

Guilherme Machado Zanatta[1]; Verônica Flores Da Cunha Scheeren[1]; Diego Fontoura Simões[1]; Laurence Boligon De Araujo[1]; Luiz Augusto Machado Centeno[1]; Mariani Farias Fiorenza[2]; Ana Paula Martini[1]; Janislene Mach Trentin[2]; Gilson Antonio Pessoa[1]; Mara Iolanda Batistella Rubin[1]
1.Universidade Federal De Santa Maria; 2.Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul.

Palavras-chave: Diâmetro folicular; dispositivo de progesterona; IATF

Esta pesquisa avaliou o efeito da aplicação de prostaglandina no início do protocolo de sincronização do cio e ovulação com progesterona e estradiol seguida da inseminação artificial (IATF) sobre o diâmetro do folículo ovulatório e a taxa de prenhez. Novilhas de corte *Bos taurus taurus* (n = 762), com idade entre 14 e 24 meses, escore de condição corporal de 3,6 ± 0,01 (escala de 1 a 5) foram utilizadas. As fêmeas foram mantidas em campo nativo na região central do Rio Grande do Sul, Brasil. No início do protocolo (D0) os animais receberam via IM 2 mg de Benzoato de Estradiol (RIC-BE®, Tecnopec, São Paulo, Brasil) e foram distribuídos em três tratamentos quanto ao uso de diferentes tipos de dispositivo intravaginal de progesterona (P4): T1 = dispositivo novo (1 g de P4, PRIMER®, Tecnopec), T2 = dispositivo usado 1x (PRIMER®, Tecnopec) e T3 = dispositivo monodose (0,75 g de P4; PROCICLAR®, Hertape Calier, Juatuba, Brasil). Adicionalmente, os animais foram aleatoriamente subdivididos em 6 tratamentos para receber ou não uma dose de PGF neste dia (D0): T1 (n=39), T1PGF (n=51), T2 (n=259), T2PGF (n=262), T3 (n=81) e T3PGF (n=70). No D8 todos animais receberam via IM 1 mg de Cipionato de Estradiol (CE; Cipionato HC®, Hertape Calier) e 0,150 mg de d-Cloprostenol (PGF; Prolise®, Tecnopec). Todas as novilhas dos três tratamentos foram inseminadas 48h (D10) após a retirada da P4. No momento da IA também se realizou a medida do diâmetro do folículo dominante (FD) de uma amostra de cada grupo T1 (n=39), T1PGF (n=51), T2 (n=44), T2PGF (n=46), T3 (n=81) e T3PGF (n=70). Os touros para repasse foram introduzidos no rebanho dez dias após a IATF e permaneceram por 60 dias. O exame ultrassonográfico em todas as fêmeas no D40 foi realizado para diagnóstico precoce de gestação. O diâmetro do FD foi de 10,18 ± 0,29 (T1), 10,65 ± 0,30 (T1PGF), 14,03 ± 0,27 (T2), 13,0 ± 0,21 (T2PGF), 13,72 ± 0,19 (T3), 13,03 ± 0,25 (T3PGF) (P=0,1). A taxa de prenhez por IA (P/IA) foi menor nos grupos T1 e T1PGF (33,3% e 37,3%; respectivamente) quando comparada a 57,4% (T2), 53,6% (T2PGF), 49,4% (T3), 47,1% (T3PGF) (P=0,019). O uso de PGF no D0 não influenciou na P/IA (P = 0,88), porém foi menor no T1 (35,6%; 32/90) quando comparado ao T2 (55,5%;289/521) e T3 (48.3%;73/151) (P=0,0018). A P/IA foi similar (P = 0.357) entre as novilhas de 14 (50,2%) e 24 (50,6%) meses de idade, respectivamente. Além disso, a taxa de prenhez final média após o repasse foi de 86,7% e não foi influenciada pelos tratamentos ou idade das novilhas. O uso de PGF no início do protocolo de IA não alterou as taxas de P/IA em novilhas taurinas e sendo a P/IA satisfatória quando o protocolo foi realizado com dispositivo de P4 previamente usado ou monodose.

SBTE 095 IATF, TETF e IA

Efeito do uso de eCG (syncro-part) na resposta ovariana e na taxa de prenhez de vacas *Bos indicus* submetidas à IATF

Maria Clara Costa Mattos[1]; Sandra Fernandez[1]; Alexandre Henryli Souza[1]; Bruna Cerrutti De Godoi[1]; João Paulo Martinelli Massoneto[2]; Luiz Antônio Scandiuzzi Jr[2]; Allan Gledson Ferreira Dos Santos[3]; Lucas Rodrigues De Souza[3]; Miguel Pizzolante Bottino[4]; José Nélio De Sousa Sales[4]
1.Ceva Saúde Animal - R&D; 2.Fazenda Água Preta; 3.Universidade Federal Da Paraíba; 4.Universidade Federal De Lavras.

Palavras-chave: *Bos indicus*; IATF; eCG

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da eCG (Syncro-part, CEVA, França) no crescimento folicular, diâmetro do folículo dominante (ØFD), taxa de ovulação, diâmetro do CL e taxa de prenhez de vacas Nelore (*Bos indicus*) primíparas, entre 30 e 80 dias pós-parto, submetidas à IATF. Em dia desconhecido do ciclo estral (D0), todas as vacas (n=587) receberam um dispositivo intravaginal com 1g de progesterona e 2 mg de benzoato de estradiol i.m. No D8, o dispositivo foi removido e administrou-se i.m. 500µg de D-Cloprostenol e 1 mg de cipionato de estradiol. Nesse momento, as vacas foram distribuídas aleatoriamente em três tratamentos experimentais: Controle Negativo (administração do veículo do Syncro-Part), Controle Positivo (administração i.m. de 300UI de eCG; Novormon®, Zoetis, Brasil) e Syncro-Part (administração i.m. de 300UI de eCG; Syncro-Part, CEVA, França). A IATF foi realizada 48h após a retirada do dispositivo de progesterona. Em um subgrupo de animais (n=89) foram realizadas avaliações ultrassonográficas nos D8 e D10 para verificar ØFD e crescimento folicular, no D18 para verificar o diâmetro do CL e taxa de ovulação. Em todas as vacas, realizou-se exame ultrassonográfico no D40 para diagnóstico de gestação. A taxa de crescimento diário do folículo foi calculada pela diferença de ØFD entre os D8 e D10 dividido por dois. Os dados foram analisados pelo PROC GLIMMIX do SAS. O ØFD no D8 foi similar (P = 0,82) entre vacas Controle Negativo (10,4±0,5 mm), Controle Positivo (11,1 ± 0,2 mm) e Syncro-Part (9,8 ± 0,4 mm), demonstrando homogeneidade entre os grupos antes do tratamento. No entanto, vacas tratadas com Syncro-Part apresentaram maior ØFD no D10 e taxa de ovulação (13,1 ± 0,6a mm e 83,3%a) do que as vacas Controle Negativo (11,7 ± 0,7b mm e 56,7% b; P=0,03). No grupo Controle Positivo, o ØFD no D10 e taxa de ovulação (12,8 ± 0,6ab mm e 75,9% ab) foram semelhantes a ambos os grupos. Além disso, a taxa de crescimento folicular diária foi maior nos grupos Controle Positivo (1,5 ± 0,2ª mm/dia) e Syncro-Part (1,7 ± 0,2ª mm/dia) do que no grupo Controle Negativo (0,7 ± 0,1b mm/dia; P=0,01). Não se verificou diferença no diâmetro do CL no D18 entre os grupos experimentais (Controle Negativo - 21,5±1,0 mm; Controle Positivo - 23,4±0,9 mm e Syncro-Part - 22,0±0,7 mm; P=0,32). Por fim, observou-se maior taxa de prenhez 30 dias após a IATF nas vacas dos grupos Controle Positivo [54,7% (104/190)] e Syncro-Part [53,3% (106/199)] em relação às vacas do grupo Controle Negativo [37,9% (75/198)]. Dessa forma, concluiu-se que o tanto o Grupo Syncro-Part como o Controle Positivo aumentaram o crescimento final do folículo dominante, a taxa de ovulação e, consequentemente, a taxa de prenhez de vacas *Bos indicus* submetidas à IATF em comparação ao grupo Controle Negativo.

SBTE 096 IATF, TETF e IA

Eficiência de dois dispositivos de progesterona contendo quantidades diferentes do princípio ativo

Felipe Costa Gonçalves; Carlos Antônio De Carvalho Fernandes; Miller Pereira Palhão; Ana Cristina Silva De Figueiredo; Jairo Pereira Neves; Aécio Silveira Raymundy; Tochimara Aparecida Miyauchi; Romeu Luiz De Podestá Junior; Lucas Freire Pereira; Junior Henrique De Oliveira
UNIFENAS.

Palavras-chave: Corpo lúteo; cloprostenol; progesterona

O objetivo deste trabalho foi de verificar o perfil de liberação de Progesterona (P4) em dois dispositivos intravaginais P4 (IVP), com a mesma matriz, contendo 1,2 e 0,6 g de P4, utilizados em protocolo de IATF. Foram utilizadas 24 novilhas mestiças, púberes, com peso entre 270 a 450 kg, distribuídas aleatoriamente entre os dois tratamentos. G1 (n=12) receberam IVP com 1,2g de P4 e G2 (n=12) receberam IVP com 0,6g de P4. Em todos os animais realizou-se pré-tratamento com o objetivo de eliminar o Corpo Lúteo (CL) existente e impedir a formação de um novo, evitando a interferência de P4 endógena. Para isso, dez dias antes do início do teste, os animais receberam um Implante Auricular de Norgestomet, 5 mg de Valerato de Estradiol e cloprostenol 0,5 mg. Uma segunda dose de cloprostenol 0,5 mg foi aplicada três dias antes do início do protocolo. Os animais foram submetidos ao exame ultrassonográfico (Mindray-2200 - transdutor linear transretal 7,5 Mhz) para constatação de ausência de corpo Lúteo (CL) no D0. Em D0 foram inseridos IVPs e aplicado 2 mg de Benzoato de Estradiol (BE), no dia 8 (D8) retirou-se os IVPs. No dia 9 (D9) foi aplicado 1mg de BE. Amostras de sangue foram colhidas para dosagem de P4, antes e após a colocação dos IVPs, sendo a última, 12 horas após a remoção dos IVPs. As dosagens de P4 foram feitas por RIA (DPC Medlab®) no Laboratório de Endocrinologia da Unesp-Botucatu. As médias de P4 e do diâmetro folicular foram comparados com o teste de Shapiro-Wilk. Os dados foram analisados por ANOVA. As diferenças entre tratamentos foram acessadas pelo teste "T" de Student e nos diferentes dias pelo teste de Tukey. As probabilidades menores que 5% foram consideradas significativas. Não houve diferenças nas concentrações de P4 ($P>0,05$) entre os tratamentos considerando o mesmo dia de avaliação. Em ambos os tratamentos o efeito de dia foi significativo ($P<0,0001$). Não houve diferença no dia de emergência da onda folicular: G1 3,3±1,8 e G2 4,0±1,2 dias. O diâmetro folicular médio em D10 foi: 12,2±0,6 e 12,9±0,5 mm para G1 e G2, respectivamente. Houve crescimento folicular semelhante entre D4 a D10. Conclui-se que IVPs contendo 1,2 e 0,6 g de P4 são eficientes para manter concentrações plasmáticas satisfatórias de P4 ao promover rápida elevação pós-colocação e queda após a retirada, mostrando que as diferentes concentrações do produto não interferem no perfil de P4 nos animais. Adicionalmente, estes IVPs não alteram a dinâmica folicular, mostrando-se eficientes no controle do crescimento folicular e sincronização da ovulação.

SBTE 097 IATF, TETF e IA

Eficiência reprodutiva de primíparas nelore de 24 meses submetidas à programas de ressincronização após IATF

Bruna Martins Guerreiro[1]; Bruno Gonzalez De Freitas[1]; Rodolfo Daniel Mingoti[1]; Emiliana Oliveira Santana Batista[1]; Gabriel Armond Crepaldi[2]; Manoel Francisco Sá Filho[1]; Lais Mendes Vieira[1]; Bruno Moura Monteiro[1]; Pietro Sampaio Baruselli[1]
1.FMVZ/USP; 2.SEXING TECHNOLOGIES.

Palavras-chave: Primípara; sincronização; iatf

Este estudo teve como objetivo avaliar a taxa de prenhez durante estação de monta de fêmeas primíparas Nelore (*Bos indicus*) de 24 meses de idade e submetidas a dois programas consecutivos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) com 32 dias de intervalo entre as inseminações. O estudo foi conduzido em uma fazenda comercial em Camapuã – MS, Brasil. Fêmeas da raça Nelore (n = 1028) de três categorias distintas [vacas com um parto e 24 meses de idade (PRIM24; n = 115); vacas com um parto e 36 meses de idade (PRIM36; n = 475) e vacas com dois partos e 48 meses de idade (SECUND48; n = 438)] foram submetidas ao mesmo protocolo de IATF no início da estação reprodutiva. No Dia 0, as fêmeas receberam um dispositivo intravaginal de progesterona (P4; Cronipress Monodose M-24®, Biogenesis Bagó) e 2 mg IM de benzoato de estradiol (BE; Bioestrogen®, Biogenesis Bagó). No Dia 8, os dispositivos de P4 foram removidos e foram administrados 300UI IM de eCG (Novormon®, Zoetis), 1,0 mg IM de cipionato de estradiol (CE; ECP®, Zoetis) e 0,75 mg IM de Cloprostenol (PGF; Croniben®, Biogenesis Bagó). Todas as fêmeas foram inseminadas 48 h após a retirada do dispositivo (1ª IATF). No Dia 32, todas as fêmeas foram ressincronizadas, independentemente do status de prenhez da 1ª IATF, pela inserção do dispositivo de P4 e aplicação de 1 mg IM de BE. No Dia 40, o dispositivo de P4 foi removido e foi realizado o diagnóstico de gestação por ultrassonografia transretal (Chison 9300VET, Kylumax, Brasil). Nesse momento, fêmeas não gestantes também receberam 300UI IM de eCG, 1,0 mg IM de CE e 0,75 mg IM de PGF. No Dia 42, vacas não gestantes receberam a 2ª IATF. O diagnóstico de gestação desta segunda IATF foi realizada no Dia 72. A análise estatística foi realizada via procedimento GLIMMIX do SAS (SAS® 9.3 Institute Inc., Cary, NC, USA, 2003). A taxa de prenhez à 1ª IATF foi semelhante entre as categorias distintas (PRIM24 = 53,0 vs. PRIM36 = 54,3 vs. SECUND48 = 56,6%; P = 0,62). Além disso, a taxa de prenhez à 2ª IATF também não diferiu entre as categorias (PRIM24 = 38,9 vs. PRIM36 = 41,5 vs. SECUND48 = 46,6%; P = 0,22). Ainda, não foi encontrada diferença na taxa de prenhez acumulada (1ª IATF + 2ª IATF) entre as distintas categorias (PRIM24 = 71,3 vs PRIM36 = 78,1vs SECUND48 = 78,3%; P = 0,70). Portanto, primíparas de 24 e 36 meses e secundíparas de 48 meses de idade da raça Nelore possuem semelhante eficiência reprodutiva durante a estação de monta. Esses dados indicam a possibilidade de redução da idade ao primeiro parto de novilhas desta raça, sem comprometer seu desempenho na estação de monta subsequente.
Agradecimentos: Fazenda Engano, Bovifértil e CNPq.

SBTE 098 IATF, TETF e IA

Eficácia de diferentes indutores da ovulação em vacas leiteiras submetidas à inseminação artificial em tempo fixo

Otávia Reis Silva[1]; Juliana Ferreira Rocha[1]; Samuel Rodrigues Bonamichi Couto[1]; Joaquim Esquerdo Ferreira[1]; Osvaldo Almeida Resende[2]; Marco Roberto Bourg Mello[3]
1.UFRRJ; 2.PESAGRO AGROBIOLOGIA; 3.UFRRJ - Instituto De Zootecnia - Departamento De Reprodução Animal.

Palavras-chave: Girolando; IATF; indução da ovulação

Dentre os principais ésteres de estradiol utilizados em programas de Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) de fêmeas bovinas, o benzoato de estradiol (BE) e o cipionato de estradiol (CE) tem se destacado por apresentarem baixo custo. Porém, ambos são diferentes quanto à utilização em função de apresentarem meias-vidas distintas. Com objetivo de reduzir o manejo em protocolos de IATF, o presente trabalho avaliou a dinâmica folicular em vacas leiteiras tratadas com BE ou CE como indutores da ovulação. Para tanto foram utilizadas 44 vacas Girolando, lactantes, apresentando escore de condição corporal médio igual a 3 (escala de 1-5). Em dia aleatório do ciclo estral, os animais receberam um dispositivo intravaginal contendo 1g de progesterona (DIB®, MSD, São Paulo, Brasil) e aplicação intramuscular (im) de 2mg de BE sendo este dia considerado D0. No D8, os dispositivos foram removidos sendo administrados (im) 150µg de cloprostenol (CIOSIN®, MSD Animal Health, São Paulo) em todas as fêmeas. Neste momento os animais foram divididos aleatoriamente em dois tratamentos: Grupo BE (n=22) e Grupo CE (n=22). Os animais do Grupo CE receberam como indutor da ovulação 1mg de CE (im) (ECP®, Pfizer, São Paulo, Brasil) no momento da remoção do dispositivo, enquanto as vacas do Grupo BE receberam 1mg de BE (im) (ESTROGIN®, Agroline, São Paulo, Brasil) 24 horas depois (D9). Após a remoção do dispositivo, avaliações ultrassonográficas foram realizadas a cada 12 horas até o momento da ovulação. Foram avaliados os seguintes parâmetros: diâmetro do folículo ovulatório – FO (mm); taxa de ovulação - TO (%) e intervalo retirada do dispositivo/ovulação - IRO (horas). Para análise estatística foi utilizado o teste Qui-quadrado para TO e o teste "T" para FO e IRO, adotando nível de significância de 5%. Os resultados para os grupos BE e CE foram, respectivamente: FO: 13,82±0,41mm e 13,86±0,61mm; TO: 86,36% e 81,82%; IRO: 69,16±1,80 horas e 64,82±2,58 horas. Não houve diferença estatística significativa ($p>0,05$) entre os tratamentos para nenhum dos parâmetros avaliados. Os resultados do presente trabalho corroboram com os de Sales et al. (Theriogenology, v.78, p.510–516, 2012), que não observaram diferença entre o benzoato e o cipionato de estradiol na sincronização da ovulação de vacas Nelores. O presente estudo também constatou maior dispersão nas ovulações do grupo tratado com cipionato de estradiol como foi observado no trabalho de Martins et al. (Acta Scientiae Veterinariae, v.33, p.285, 2005). Os resultados preliminares deste estudo permitem concluir que ambos os indutores da ovulação podem ser empregados na IATF de vacas Girolando com mesma eficiência.

SBTE 099 IATF, TETF e IA

Estradiol, GnRH ou sua associação no início do protocolo de ressincronização resulta em semelhante eficiência reprodutiva em vacas leiteiras

Lais Mendes Vieira[1]; Bruna Martins Guerreiro[1]; Emiliana Oliveira Santana Batista[1]; Bruno Gonzalez De Freitas[1]; Manoel Francisco Sá Filho[1]; Guilherme De Souza Floriano Machado De Vasconcellos[1]; Julia Gleyci Soares[1]; Luiz Gustavo Martignoni Bragança[2]; Sintia S Plá[3]; Pietro Sampaio Baruselli[1]
1.USP; 2.NEOGEN REPRODUÇÃO ASSISTIDA; 3.AGENER.

Palavras-chave: Ressincronização; vaca em lactação; estradiol

Realizou-se dois estudos para avaliar a eficiência reprodutiva de vacas em lactação submetidas à ressincronização após prévia IATF (Exp 1) e verificar o efeito do tratamento (ressincronização) no fluxo sanguíneo do corpo lúteo (CL; Exp 2). No Exp 1, 601 vacas foram distribuídas em três grupos experimentais, BE (n=200), GnRH (n=197) e BE+GnRH (n=204). Após a 1ª IATF, todas as fêmeas foram ressincronizadas com a inserção de um dispositivo P4 (Primer®, Tecnopec) no Dia 25 (Grupos BE e BE+GnRH) ou no Dia 26 (Grupo GnRH). Juntamente com a inserção do dispositivo de P4, as fêmeas do grupo BE receberam 2mg de BE (RIC-BE®, Tecnopec), as do grupo GnRH, 25µg de lecirelina (Gestran®, Tecnopec) e o grupo BE+GnRH, 2mg de BE e 25µg de lecirelina. No Dia 33 todos os dispositivos de P4 foram removidos e as fêmeas foram submetidas ao diagnóstico de gestação da 1ª IATF com o auxílio da ultrassonografia. As fêmeas não gestantes receberam, 0,482 mg de cloprostenol sódico (Estron®, Tecnopec) no Dia 33, 1mg de BE no Dia 34 e inseminadas no Dia 35 AM. A reconfirmação do diagnóstico de gestação da 1ª IATF e o diagnóstico de gestação da ressincronização foram realizados no Dia 65. A análise estatística foi realizada pelo GLIMMIX do SAS®. Os grupos experimentais apresentaram semelhante taxa de prenhez à 1ª IATF, tanto aos 33 [BE: 33,0, GnRH: 35,0 e BE+GnRH: 34,3%; P=0,61] quanto aos 65 dias [BE: 26,0, GnRH: 28,9 e BE+GnRH: 26,5%; P=0,26]. Ainda, semelhante perda gestacional entre 33 e 65 dias de gestação após 1ª IATF foi observada [BE: 21,2, GnRH: 17,4 e BE+GnRH: 22,9%; P=0,47]. Por fim, as taxas de prenhez 30 dias após a IATF referente a ressincronização também foram semelhante entre os grupos [BE: 20,9, GnRH: 17,2 e BE+GnRH: 25,4%; P=0,54]. Para todas as variáveis analisadas houve efeito fazenda (P<0,05), porém não foi observada interação tratamento e fazenda (P>0,05). No Exp. 2, 42 animais utilizados no Exp 1 (BE: n=15; GnRH: n=12 e; BE+GnRH: n=15) foram submetidos a exames ultrassonográficos com função Collor Doppler a cada 48h entre os Dias 25 e 33, para avaliar a taxa de vascularização do CL conforme o tratamento de ressincronização. A análise estatística foi realizada pelo GLIMMIX do SAS®. Não foi verificado efeito de tratamento (P=0,77), tempo (P=0,11) e interação (P=0,81) entre tratamento e tempo para taxa de vascularização do CL. Portanto, a taxa de vascularização do CL permaneceu semelhante entre os grupos durante o período avaliado (Dia 25: 76,1, Dia 27: 79,1, Dia 29: 77,5, Dia 31: 76,3 e Dia 33: 77,1%). Conclui-se que a ressincronização utilizando 2mg de BE, 25µg de lecirelina ou a associação de ambos fármacos após prévia IATF resulta em semelhante taxa de prenhez após a 1ª IATF e após a ressincronização. Ainda, a administração do BE no início do protocolo de ressincronização não compromete a vascularização do CL presente nos animais previamente inseminados. Agradecimentos: Fazenda Morro de Ventos, Fazenda São José, Instituto de Zootecnia-Nova Odessa e Agener União – Linha Tecnopec.

SBTE 100 IATF, TETF e IA

Fatores que afetam a temperatura vaginal em vacas da raça holandesa em lactação de alta produção.

Eraldo Laerte Drago Filho[1]; Augusto Mesquita Lacerda Madureira[1]; Liam B Polsky[2]; Sergio Soriano[3]; Alex Fagner Sica[3]; Jose Luiz Moraes Vasconcelos[1]; Ronaldo Luis Aoki Cerri[2]
1.FMVZ UNESP; 2.Universidade Da Columbia Britânica; 3.Fazenda Colorado.

Palavras-chave: Estresse térmico; produção de leite; prenhez por IA

O objetivo deste experimento foi avaliar a mensuração contínua de temperatura vaginal durante 72 h (a cada 10 min) em vacas em lactação da raça Holandesa (n = 480; 591 eventos de inseminação) alocadas em um único barracão com ventilação cruzada. Foi inserido em cada vaca um termômetro acoplado a um dispositivo intravaginal de progesterona (1,9g P4,CIDR, Zoetis) no ínicio do protocolo de IATF. Produção de leite, DEL, espessura da pele, cor da pelagem, escore de condição corporal (ECC), e prenhez por IA (P/IA) foram coletados para posterior análise. Dentro do barracão, dados de temperatura e umidade do ambiente foram medidas durante 72 horas e o cálculo do índice de temperatura e umidade (ITU) foi analisado. Os dados foram analisados utilizando análise de variância e as correlações de Pearson usando proc GLM, Corr e Logistic do SAS. Os dados coletados através dos sensores de temperatura ambiental e vaginal que foram utilizados foram o ITU máximo (MAX) e a porcentagem de tempo em que a temperatura vaginal foi acima de 39,1°C (PCT), duas categorias para MAX e PCT (alta vs baixa) foram criadas tendo como limite a mediana. Houve baixa correlação entre o ITU e PCT ($P < 0,05$) ($r = 0,01$). A espessura da pele também teve baixa correlação com PCT ($P< 0,05$) ($r< 0,01$). Vacas com pelagem preta passaram menos tempo com alta temperatura vaginal ($P = 0,05$). Primíparas ($P = 0,04$) e vacas com baixos ECC ($P <0,01$) tiveram maior PCT. A produção de leite foi afetada pela ordem de partos ($P <0,01$) e PCT (Alta = 43,5 vs. Baixo = 41,2 kg/d; $P = 0,02$). Houve interação entre produção de leite e MAX na PCT ($P <0,01$), onde apenas vacas no quartil mais alto de produção de leite (> 50,7 kg/d) passaram mais tempo com temperaturas vaginais mais elevadas. Entre as variáveis independentes incluídas no modelo, ordem ($P <0,01$), PCT (Alta = 17,4 vs. Baixo = 26,1%; $P = 0,03$) e interação entre PCT e produção de leite ($P = 0,05$) afetaram P/IA. A diminuição do P/IA em vacas com alta PCT só ocorreu em vacas com maior produção. Em resumo, existe grande variabilidade individual na capacidade das vacas em responder ao estresse térmico. Ordem, ECC, cor da pelagem e produção de leite afetam PCT, particularmente sob alta temperatura ambiente. A seleção dos animais com controle eficiente da temperatura corporal, apesar da elevada produção de leite, deve ser abordada como estratégia adequada para manter a fertilidade dos rebanhos leiteiros.

SBTE 101 IATF, TETF e IA

Frequência bacteriana de amostras uterinas de éguas da raça mangalarga marchador

M.P. Moreno[1], M.A.F. Sá[1], Melo, D.[1], Dutra, G.A.[1], Gomez, M.A.[2]; Abreu, D.P.B.[2]; J.C.F. Jacob[1]
1. DRAA, UFRRJ; 2.DMIV, UFRRJ, Seropédica, RJ, Brasil;

Palavras-chave: Endometrite; microbiologia; éguas susceptíveis

A endometrite em éguas é considerada como uma das causas mais frequentes de infertilidade, sendo classificada como a terceira enfermidade mais importante nesta espécie. Os agentes etiológicos das endometrites na espécie equina podem ser Streptococcus equi subsp zooepidemicus, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Candida albicans, dentre outros (LANGONI et al., Revista Brasileira de Reprodução Animal, 23, 44-51, 1999). Entretanto, segundo LeBlanc (Reproduction in Domestic Animals, 45, 21–27, 2010), o tratamento se baseia, entre outros aspectos, na neutralização das bactérias virulentas e no controle da inflamação pós cobertura, o que torna a identificação do agente causador primordial para o sucesso no tratamento. Diante disso, o presente trabalho objetivou identificar a frequência em que os possíveis microorgarnismos causadores de endometrites ocorreu no grupo de éguas estudadas. Para tanto, foram utilizadas 22 amostras uterinas obtidas através de swab estéril mantidos em meio de transporte Stuart de éguas da raça Mangalarga Marchador com idade entre três e 20 anos, com histórico de subfertilidade e/ou citologia endometrial positiva para endometrite. Os resultados obtidos foram avaliados utilizando-se análise descritiva para cálculo das frequências absoluta e relativa (SAMPAIO, Estatística Aplicada à Experimentação Animal, 1998). Das 22 amostras analisadas, 14 (63,6%) foram positivas para o exame microbiológico, resultado próximo ao encontrado por Oliveira et al. (Medicina Veterinária, 1, 19-25, 2007) que obtiveram 64,4% (41/64) das éguas positivas. Os microrganismos mais frequentes foram Enterococcus sp (18,2%), Eschirichia coli e Staphilococcus sp (13,6%), Micrococcus sp (9,1%), Streptococcus sp e Serratia sp (4,5%). A frequência identificada no presente estudo de Enterococcus sp e Eschirichia coli pode ser decorrente de defeitos anatômicos na região perineal e vulvar devido a idade avançada de algumas éguas utilizadas, predispondo a pneumovagina e contaminação fecal. Segundo LeBlanc (Proceedings of Reproductive Pathology, 78-84, 1997), isto proporciona maior frequência de bactérias comumente encontradas no intestino. Após os resultados obtidos no presente estudo, foi possível identificar a frequência em que os agentes causadores de endometrite ocorreram no grupo de éguas estudadas. Apoio financeiro FAPERJ.

SBTE 102 IATF, TETF e IA

Glicoproteína associada a gestação prediz perdas de gestação em vacas de leite

Marcos Henrique Colombo Pereira[1]; Ky Pohler[2]; Francisco Rebolo Lopes[1]; Wedson Maria Costa[1]; Jose Luiz Moraes Vasconcelos[1]
1.UNESP BOTUCATU; 2.University Of Tennessee.

Palavras-chave: Glicoproteínas; perda de gestação; vacas de leite

O objetivo deste estudo foi determinar a associação entre glicoproteínas associada a gestação (PAGs) e perdas de gestação em vacas de leite em lactação após inseminação artificial em tempo fixo (IATF) ou transferência de embrião em tempo fixo (TETF). Três experimentos foram realizados, no experimento 01 (IATF - inseminação no d0) e 02 (TETF - transferência de embrião no d7) o diagnóstico de gestação foi realizado por ultrassonografia no d31. Em vacas gestantes amostras de sangue foram coletadas e a concentração sérica de PAGs foi determinada por ELISA. No d59 foi realizado um segundo diagnóstico de gestação e a perda de gestação foi determinada quando havia um embrião viável no d31 de gestação mas não no d59. No estudo 03 (TETF - TE d7) vacas foram consideradas gestantes baseado na presença de um corpo lúteo vascularizado no d24 (avaliado por Ultrassom Doppler colorido) ipsilateral ao CL da TETF, nos dias 31, 38, 45, 52 e 59 foi realizado ultrassonografia para avaliar a presença de um embrião ou feto viável e amostras de sangue foram coletadas para avaliar a concentração de progesterona (P4) e de PAGs. One-way ANOVA (SAS 9.4) foi utilizada para avaliar as diferenças de PAGs no d31,o procedimento LOGISTIC foi utilizado para determinar a probabilidade de manutenção da gestação. Para testar a efetividade de uma amostra de PAG no d31 em predizer perda de gestação, foi gerada uma curva ROC (receiver-operating characteristic curve) pelo MedCalc software package para determinar a concentração de PAG no d31 que prediz perda de gestação com ≥95 de acurácia na IATF e TETF. Um total de 77 vacas apresentaram perda de gestação na IATF (exp 01/n=413) e 47 vacas apresentaram perda de gestação na TETF (exp 02/n=238). Vacas que estavam gestantes no d31 e mantiveram a gestação até o d59 apresentaram maior (P<0,05) concentração circulante de PAGs no d31 (IA=9,58±0,31; TE=8,61±1,53) comparado a vacas que apresentaram perda de gestação (IA=4,15±0,33; TE=3,78±0,58) entre os dias 31 e 59 de gestação, tanto na IATF e TETF. Menores concentrações de PAGs no d31 resultaram em maior (P<0,05) perda de gestação até o d59 de gestação (efeito linear). Concentrações circulantes de PAGs abaixo de 1,4 ng/mL (IATF; nível detectado mínimo 0,28 ng/mL) e 1,85 ng/mL (TETF) tiveram 95 % de acurácia em predizer perda de gestação. No experimento 03, não foi detectado efeito (P>0,05) de PAGs e de concentração de P4 no d24 na manutenção da gestação até o dia 31. A concentração de P4 no d31 não interferiu (P>0.05) na manutenção da gestação; entretanto, houve efeito (P<0,05) de PAGs no d31 na perda de gestação, como observado nos experimentos 01 e 02. A maior parte das perdas de gestação ocorreram entre os dias 24 e 31 (n=20; 20%), seguido pelos dias 31 e 38 (n=8; 10%), 38 e 45 (n=6; 7,5%) e 45 a 59 (n=1; 1%). Conclusão, em vacas gestantes a concentração de PAGs no d31 detecta perdas de gestação após o d31.

SBTE 103 IATF, TETF e IA

IATF de acordo com o diâmetro do folículo pré-ovulatório aumenta a taxa de gestação de vacas de corte lactantes

Natália Castro[1]; Luiz Francisco Machado Pfeifer[2]; Jamyle Cestaro[3]; Vitor Torres Melo[3]; Paulo Neves[3]
1.Universidade Federal De Pelotas; 2.EMBRAPA - RONDÔNIA; 3.Faculdades Integradas Aparício Carvalho.

Palavras-chave: Bovinos; iatf; fertilidade

O objetivo deste estudo foi avaliar se a inseminação artificial em tempo-fixo (IATF) realizada de acordo com o diâmetro do folículo pré-ovulatório (FPO) aumenta as taxas de gestação em vacas de corte lactantes. Para o estudo, foram utilizadas 413 vacas Nelore lactantes com peso-vivo de 430 – 640 Kg, as quais foram submetidas à um protocolo de IATF baseado no uso de progesterona e estradiol. No Dia 0, todas as vacas receberam um implante intravaginal de progesterona (1,9g de Progesterona; CIDR®, São Paulo, Brasil) associado a 2mg de benzoato de estradiol (Bioestrogen®, Curitiba, Brasil), i.m., para sincronizar a onda folicular. No Dia 8, o CIDR foi removido e as vacas receberam 500 µg, i.m., de d-Cloprostenol (Lutalyse®, São Paulo, Brasil), 1 mg de cipionato de estradiol (E.C.P. ®, São Paulo, Brasil) i.m. e 300 UI, , de eCG (Novormon®, São Paulo, Brasil) i.m.. No Dia 10 (às 7:00), as fêmeas foram examinadas através de ultrassonografia transretal para avaliar o diâmetro do FPO e foram aleatoriamente separadas em Grupo Controle (n=209) ou Grupo Blocos (n=204). As vacas do Grupo Controle foram inseminadas 48h após a remoção do CIDR, logo após o exame ultrassonográfico (8:00 do Dia 10), e as vacas do Grupo Blocos foram inseminadas em quatro momentos distintos, de acordo com o diâmetro do FPO, conforme descrito por Pfeifer et al. (Reproduction, Fertility and Development, abstract, p. 97, 2015) da seguinte forma: B0 (FPO ≥ 15 mm, IATF às 8:00 do Dia 10; n=51), B1 (FPO com 13 a 14,9 mm, IATF às 14:00 do Dia 10; n=70), B2 (FPO com 10,1 a 12,9 mm, IATF às 8:00 do Dia 11; n=54), e B3 (FPO ≤ 10 mm, IATF às 14:00 do Dia 11; n=28). O diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias após a IATF, através de exame ultrassonográfico. As análises estatísticas foram feitas pelo programa estatístico SAS 9.0. O diâmetro médio dos FPO foi analisado pela análise de variância – Fatorial ANOVA, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey e a taxa de gestação foi analisada pelo teste do Qui-quadrado. Não houve diferença entre os grupos quanto ao diâmetro do FPO (P=0,4). Entretanto, a taxa de gestação foi maior no Grupo Blocos (63,2%, 129/204) do que no Grupo Controle (48,8%, 102/209; P=0,002). Os resultados demonstram que a IATF apresenta melhor resultado quando é realizada de acordo com o diâmetro do folículo pré-ovulatório. Esta técnica pode ser uma ferramenta eficiente para melhorar a fertilidade de vacas de corte lactantes submetidas a protocolo de IATF que utilize estradiol como indutor de ovulação.

SBTE 104 IATF, TETF e IA

Impacto da gonadotrofina coriônica equina associada ao desmame temporário, ao benzoato ou ao cipionato de estradiol na IATF em vacas primíparas *Bos indicus*.

André Luís Bastos Souza[1]; Luiz Ernandes Kozicki[2]; Marcio Saporski Segui[2]; Romildo Romualdo Weiss[3]; Danilo Amadori Martins Oliveira[2]; João Filipi Scheffer Pereira[2]; Melina Andrea Formighieri Bertol[3]
1.Vetmax Assessoria Tecnica; 2.Pontificia Universidade Catolica Do Paraná; 3.Universidade Federal Do Paraná.

Palavras-chave: Remoção bezerros; ecg, iatf; bovino corte

Este estudo objetivou determinar os efeitos da gonadotrofina coriônica equina (eCG) associada a diferentes protocolos para a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) sobre a taxa de prenhez (TP) em vacas *Bos taurus indicus*, previamente tratadas com progesterona (P4) e benzoato de estradiol (BE). Quinhentas e cinquenta e sete vacas primíparas foram divididas em três grupos: no dia 0 (d0) o grupo eCGDT (eCG+desmame temporário (DT); n=178) recebeu 0,558g de P4 longa-ação intravaginal+1,0 mg de BE (IM); no d8 (remoção da P4+0,075 mg de D-cloprostenol+400UI de eCG + DT por 48 h); no d10 procedeu-se a inseminação artificial (IA)+retorno do bezerro; GeCGBE (grupo eCG+BE;n=176); o mesmo que GeCGDT sem o DT+1,0 mg de BE no d9; GeCGCE(grupo eCG+cipionato de estradiol (CE); n=203), o mesmo que GeCGDT sem DT+1,5 mg de CE(IM) no d8. No d35 após a IATF executou-se o diagnóstico de prenhez. Animais não-prenhes permaneceram com touros por 90 dias e procedeu-se ao diagnóstico de prenhez (ultrassonografia). As drogas usadas provieram da Biogenesis Bagó (Curitiba, PR) exceto a eCG (Foligon, MSD, SP) e CE (Zoetis, SP). Os dados foram analisados pelo Qui-Quadrado ao nível de significância de P<0,05. A TP oriunda da IATF foi respectivamente 51,1, 47,1 e 47,8 % nos grupos GeCGDT, GeCGBE e GeCGCE (P>0.05) e a TP do repasse de touros foi de 94,4; 72,1 e 64,0 % respectivamente (P<0,05). Concluiu-se não haver diferenças entre os protocolos relativas à TP à IATF; a TP do GeCGDT oriunda do repasse dos touros mostrou-se mais elevada que os demais (P<0.05); a TP final da IATF+repasse foi significativamente maior no CeCGDT frente aos demais.

SBTE 105 IATF, TETF e IA

Impacto da modulação hormonal do proestro sobre a expressão gênica uterina associada à proliferação de células de vacas de corte lactantes em anestro

Manoel Francisco Sá Filho[1]; Angela Maria Gonella-Diaza[1]; Guilherme Pugliesi[1]; Mariana Sponchiado[1]; Márcio Ferreira Mendanha[1]; Roney Santos Ramos[1]; Marcelo Demarchi Goissis[1]; Fernando Silveira Mesquita[2]; Pietro Sampaio Baruselli[1]; Mário Binelli[1]
1.FMVZ-USP; 2.UNIPAMPA.

Palavras-chave: Cipionato de estradiol; gonadotrofina coriônica equina; inseminação artificial em tempo fixo

Estudos anteriores demonstraram que a suplementação com cipionato de estradiol (ECP) no início do proestro altera o transcriptoma uterino de vacas de corte em anestro (Sá Filho et al, IETS, 2015. p 102-Resumo). Neste estudo, as vias enriquecidas pela suplementação com ECP envolviam genes associados à proliferação celular. Assim, o presente estudo avaliou o impacto da suplementação com gonadotrofina coriônica equina (eCG) e/ou ECP no início do proestro sincronizado sobre a expressão de genes associados com a proliferação celular no endométrio de vacas de corte lactantes em anestro. Os genes avaliados foram: receptor de progesterona (PGR), receptor de estradiol Tipo 1 (ESR1), receptor de estradiol Tipo 2 (ESR2), receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), fator de crescimento semelhante ao EGF de ligação a heparina (HB-EGF), colágeno tipo IV alfa 1 (COL4A1), patched homolog 2 (PTCH2) e integrina beta 3 (ITGB3). Um total de 46 vacas receberam dispositivos de P4 e 2 mg de benzoato de estradiol IM. Oito dias após, os dispositivos de P4 foram removidos e foi administrado IM 500 ug de cloprostenol. As fêmeas foram divididas em blocos pela condição corporal e pelo diâmetro do maior folículo (LF) no momento da remoção do dispositivo de progesterona (P4). Neste momento, as fêmeas foram aleatoriamente divididas em quatro grupos com os seguintes tratamentos: controle (CON; n=11), ECP (1mg; n=11), eCG (400UI; n=12) e ECP+ECG (1mg e 400UI, respectivamente; n=11). Quarenta e oito horas após, todas as vacas receberam 10 µg de acetato de buserelina e simultaneamente inseminadas artificialmente. Seis dias após o tratamento de GnRH, as vacas que apresentaram corpo lúteo formado tiveram tecido uterino coletado por biópsia transcervical. Os valores de P<0,10 foram considerados como significativos. Não houve interação (P>0,10) entre ECP e eCG sobre a expressão dos transcritos avaliados. O tratamento com ECP induziu maior abundância dos genes PTCH2 (P=0,07) e COL4A1 (P=0,02), enquanto que a transcrição de EGFR foi suprimida (P=0,09). O tratamento com ECP não afetou a expressão gênica de ESR1 (P=0,90), ESR2 (P=0,61), HB-EGF (P=0,80) e ITGB3 (P=0,57). Por outro lado, o tratamento com eCG induziu maior abundância na transcrição de HB-EGF (P=0,06), ESR2 (P=0,09), e de ITGB3 (P=0,05), ao passo que a expressão de ESR1 (P=0,05) foi reduzida. A suplementação com eCG não alterou a expressão de EGFR (P=0,34), PTCH2 (P=0,31) e COL4A1 (P=0,19). Além disso, a expressão de PGR não foi alterada por ambos os tratamentos [ECP (P=0,51) ou eCG (P=0,25)]. Portanto, os resultados suportam a hipótese de que as suplementações com ECP ou eCG no início do proestro de vacas de corte lactantes em anestro atuam sobre o tecido endometrial, alterando a abundância de genes associados com a proliferação celular durante o diestro inicial.
Agradecimentos: FAPESP (2012/14731-4) e Fazenda Empyreo.

SBTE 106 IATF, TETF e IA

Impacto do grupo genético (*B. indicus vs. B. taurus*) e da ingestão de matéria seca (alta vs. baixa) sobre a expressão gênica de enzimas hepáticas relacionadas ao metabolismo de progesterona

Emiliana Oliveira Santana Batista[1]; Carolina Habermann Macabelli[2]; Marcos Roberto Chiaratti[2]; Melina M. Yasuoka[1]; Rodrigo Vasconcellos Sala[1]; Mariana Dulce Delle Vedove Ortolan[1]; Elmeson Ferreira Jesus[1]; Tiago Antonio Del Valle[1]; Francisco Palma Renno[1]; Pietro Sampaio Baruselli[1]
1.USP; 2.UFSCAR.

Palavras-chave: Fígado; progesterona; metabolismo

O objetivo do trabalho foi avaliar a expressão hepática de seis genes (CYP2C19, CYP3A4, SRD5A1, SRD5A3, AKR1C4 e AKR1D1) relacionados ao metabolismo de progesterona (P4) em novilhas *B. indicus* (Nelore; n=16) e *B. taurus* (Holandesa; n=16) submetidas à alta (HDM, ganho de 900 g/dia) e baixa (LDM, manutenção, NRC 2001) ingestão de matéria seca durante protocolo de sincronização de ovulação. Novilhas cíclicas dos diferentes grupos genéticos e dietas foram alocadas em um arranjo fatorial 2x2. A dieta foi administrada por 33 dias antes da realização da biopsia hepática. Novilhas pré-sincronizadas, sete dias após a ovulação receberam duas doses de $PGF_2\alpha$ com intervalo de 6 h. Doze horas após o último tratamento com $PGF_2\alpha$, as novilhas receberam um dispositivo de P4 novo (CIDR®, Zoetis, Brasil), 2 mg de benzoato de estradiol i.m. (BE, Sincrodiol®, Ourofino Agronegócio) e uma dose adicional de $PGF_2\alpha$. Após 48 h da inserção do dispositivo foram realizadas colheitas de tecido hepático para posterior análise de expressão gênica e amostras de sangue para dosagem de P4. Imediatamente após as coletas, as amostras de tecido foram armazenadas em 1 mL de solução estabilizadora de RNA (RNAlater Ambioc Inc., Austin, TX), mantidas a 4°C por 24 h, e posteriormente armazenadas a - 80°C para futura quantificação mRNA por qPCR. Para análise dos dados de concentração de P4 (média±EPM) foi utilizado PROC MIXED e para expressão gênica relativa o PROC GLIMMIX do SAS 9.3. Houve interação entre grupo genético e dieta para concentração de P4 (P=0.07). Novilhas zebuínas sob HDM apresentaram menor P4 circulante do que às sob LDM (2.3±0.2 vs 3.4±0.2 ng/mL, P=0.002). Entretanto, em novilhas taurinas a dieta não influenciou a concentração de P4 (2.0±0.2 vs 2.3±0.2 ng/mL, P=0.40). Ainda, novilhas Holandesas e Nelore sob HDM apresentaram similar concentração de P4, respectivamente (2.0±0.2 vs. 2.3±0.2 ng/mL, P=0.40). Entretanto, novilhas Nelore sob LDM apresentaram maior concentração de P4 comparadas às Holandesas sob mesma dieta (3.4±0.2 vs. 2.3±0.2 ng/mL, P=0.006). Em relação aos genes avaliados, não foram observadas interações entre grupo genético e dieta (grupo genético*dieta P>0.10). No entanto, novilhas taurinas tiveram maior expressão de SRD5A1 (P<0.0001), AKR1C4 (P<0.0001) e AKR1D1 (P=0.002) do que novilhas zebuínas. Entretanto, a expressão de CYP3A4 foi maior em zebuínas comparada às taurinas (P<0.0001). Independente do grupo genético, a expressão de AKR1D1 foi maior em novilhas sob HDM comparada à LDM (P=0.004) e a expressão de AKR1C4 foi maior em novilhas sob LDM comparada à HDM (P=0.01). A expressão de CYP2C19 e SRD5A3 não foi alterada pelos efeitos do grupo genético (CYP2C19: P=0.76, SRD5A3: P=0.18), bem como de acordo com a dieta (CYP2C19: P=0.27, SRD5A3: P=0.94). Os resultados são indicativos de que a expressão de enzimas hepáticas relacionadas ao metabolismo de P4 é, ao menos parcialmente, regulada pelo grupo genético e dieta.Agradecimentos: FAPESP 2012/00889-5.

SBTE 107 IATF, TETF e IA

Impacto dos tratamentos com progesterona injetável de longa ação e/ou hCG 3 dias após a IATF na taxa de concepção de vacas holandesas em lactação

Evandro Davanço Ferreira De Souza[1]; Tiago Carneiro[2]; Emiliana Oliveira Santana Batista[3]; Lais Mendes Vieira[3]; Manoel Francisco Sá Filho[3]; Pietro Sampaio Baruselli[3]
1.OUROFINO AGRONEGÓCIO; 2.M.V.AUTONOMO; 3.USP.

Palavras-chave: Progesterona injetável; iatf; holandesa

O objetivo deste estudo foi avaliar a administração de progesterona injetável de longa ação (P4LA), associada ou não ao tratamento com gonadotrofina coriônica humana (hCG) após a IATF sobre a taxa de concepção de vacas leiteiras. O estudo foi realizado em duas fazendas comerciais (Fazenda A: 27,4L de leite/vaca/dia e sistema de confinamento tipo free stall e Fazenda B: 40,9L de leite/vaca/dia e sistema de confinamento com ventilação cruzada), ambas no estado de São Paulo, Brasil. Vacas Holandesas em lactação (n=980) em dia aleatório do ciclo estral receberam tratamento para sincronização da ovulação [D0: P4 (Sincrogest®, OuroFino Agronegócio) + benzoato de estraiol (BE, 2 mg, i.m., Sincrodiol®, OuroFino Agronegócio), D8: retirada do dispositivo + prostaglandina (PGF, 0.53 mg, i.m., Sincrocio®, OuroFino Agronegócio) + cipionato de estradiol (CE, 1,0 mg, i.m., SincroCP®, OuroFino Agronegócio), D10 AM: IATF]. Três dias após a IATF, os animais foram homogeneamente divididos quanto a produção diária de leite, dias em lactação, número de partos e escore de condição corporal e distribuídos em quatro grupos experimentais (fatorial 2x2): 1. Controle, fêmeas sem tratamento adicional (n=250); 2. P4LA, com tratamento de 900 mg de P4LA i.m. (Sincrogest® injetável, OuroFino Agronegócio, n=245); 3. hCG, com tratamento de 2000 UI i.m. de hCG (Chorulon®, MSD Shering, n=235) e; 4. P4LA+hCG, com ambos tratamentos (n=250). Para análise dos dados utilizou-se o procedimento GLIMMIX do SAS 9.3®. Não houve efeito de hCG ou interação P4LA-900 e hCG para nenhuma das variáveis analisadas (P>0,05). Verificou-se maior taxa de concepção 30 dias após IATF (TC30) nos animais tratados com P4LA (34,3 vs 26,6%, P=0,002), independentemente do tratamento com hCG. As taxas de concepção aos 60 dias (TC60), bem como de perda gestacional entre 30 e 60 dias pós IATF (PG) não foram influenciadas pelos tratamentos (P4LA-900 ou hCG, P>0.05). Houve interação entre tratamento com P4LA e fazenda sobre a TC60 (P=0,09), sendo o efeito positivo da P4LA observado na Fazenda A [27,9 (362) vs 37,2% (363)] e não na Fazenda B [18,7 (123) vs 15,2% (132), sem e com P4LA, respectivamente]. Ainda, observou-se interação entre o tratamento P4LA e época do ano (quente vs. não quente) sobre TC30 (P=0,04) e TC60 (P=0,07). Verificou-se maior taxa de concepção nos animais tratados com P4LA durante a época quente do ano (TC30: 16,3 vs 30,2% e TC60: 15,2 vs 26,9%). Porém, esse aumento não foi verificado durante a época não quente do ano (TC30: 32,9 vs 36,7% e TC60: 31,9 vs 33,9%, sem e com P4LA, respectivamente). Desta forma, conclui-se que o tratamento com 900 mg de P4LA três dias após IATF em fêmeas lactantes da raça Holandesa aumentou a taxa de concepção aos 30 dias, principalmente durante a época quente do ano. Não se verificou efeito do tratamento com hCG na taxa de concepção. Agradecimentos: Fazenda Colorado; Fazenda JIDA e OuroFino Agronegócio.

SBTE 108 IATF, TETF e IA

Impacto na taxa de concepção e expressão de estro com o uso de diferentes estéres de estradiol ou GnRH como indutor de ovulação em protocolos de IATF em vacas de leite cruzadas

Romulo Germano Rezende[1]; Rodolfo Daniel Mingoti[1]; Rodrigo Vasconcellos Sala[1]; Emiliana Oliveira Santana Batista[1]; Bruno Gonzalez De Freitas[1]; Julia Gleyci Soares[1]; Lais Mendes Vieira[1]; João Mendes Padilha Gandara Mendes[1]; Pietro Sampaio Baruselli[1]; Gustavo Guerino Macedo[2]
1.Universidade De São Paulo; 2.Universidade Federal De Uberlândia.

Palavras-chave: Estradiol; girolando; iatf

O objetivo do presente estudo foi comparar a expressão de estro e taxa de concepção com o uso de diferentes ésteres de estradiol [Benzoto de estradiol (BE) ou cipionato de estradiol (CE)] ou hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) como indutores de ovulação em protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em vacas da raça Girolando (*Bos taurus* x *Bos indicus*). Em dia aleatório do ciclo estral (Dia 0), um total de 618 vacas Girolando com ECC médio de 3,04±02; DEL de 147,6±4,39, e produção média de 22,4±0,4 litros de leite, receberam um dispositivo intravaginal de liberação de progesterona (P4) e 2,0 mg de BE (IM, Gonadiol®, MSD Animal Health, São Paulo - Brasil). No dia da remoção do dispositivo de P4 (Dia 8), as vacas receberam 530 mg de cloprostenol sódico (IM, Ciosin®, MSD Animal Health, São Paulo,Brasil), 400 UI de gonadotrofina coriônica equina (IM, eCG; Novormon®, MSD Animal Health, São Paulo,Brasil) e marcadas com bastão para verificar posterior manifestação de estro. Em seguida as vacas foram alocadas em um dos três diferentes grupos experimentais: 1) CE [n=204; 0,5 mg CE, IM (ECP®, Zoetis, Sao Paulo, Brasil), no dia 8 e inseminação artificial (IA) 48h depois]; 2) BE (n=205; 2,0 mg BE, IM no dia 9 e IA 24 h depois) ou 3) GnRH [n=209; 10µg Burserelin (Prorelin®), IM e no momento da IA no dia 10]. As vacas que apresentavam a marcação do bastão removida foram consideradas como tido expresso estro. No dia 30 após IA as vacas foram submetidas a exame ultrassonográfico para avaliação da prenhez a IATF (transdutor transretal linear de 5.0 MHz, Chison D600VET, USProducts, Eletromedicina, Brasil), a prenhez foi caracterizada pela visualização do embrião com batimento cardíaco. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o PROC GLIMMIX do software SAS (SAS® 9.3). A expressão de estro foi maior no grupo BE quando comparada aos grupos CE e GnRH, respectivamente (79,5 vs 60,6 vs 46,9 %, P=0,0001), sendo similar entre os grupos CE e GnRH. Entretanto, não foi observada diferença estatística em relação à taxa de concepção [BE=32,7% (64/196); CE=26,6% (52/198); e GnRH=26,7 (55/206), P=0,83]. Portanto conclui-se que a expressão de estro foi maior quando utilizou-se BE se comparado com CE e GnRH. Em conclusão, os diferentes indutores de ovulação utilizados em vacas Girolando promoverem taxas de concepção similares após o protocolo de IATF, e a expressão de estro foi incrementada quando ésteres de estradiol são utilizados como indutores.
Agradecimentos: Fazenda Marajoara, Fazenda São Luiz, MSD Saúde Animal

SBTE 109 IATF, TETF e IA

Implantes de progesterona de 1 uso no desempenho reprodutivo de novilhas nelore num protocolo de IATF

Luiz Guilherme De Oliveira; Marilú Martins Gioso; Carlos Antônio De Carvalho Fernandes; Jose Antonio D Garcia; Tatimara Maria Miyauchi; Rodrigo Cesar Felicio
UNIFENAS.

Palavras-chave: Corpo lúteo; folículos; novilhas zebuínas

Alguns estudos indicam que altos níveis de progesterona (P4) plasmática diminuem a pulsatilidade de LH e, conseqüentemente, o crescimento folicular. Isto pode diminuir a eficiência de protocolos para inseminação artificial em tempo fixo (IATF) que se baseiam na utilização de dispositivos intravaginais contendo P4. Objetiva-se com o presente trabalho verificar se implantes de P4 de primeiro uso, contendo 1,2 g de P4, não interferem no desempenho de novilhas de corte num protocolo de IATF. Foram utilizadas nesse experimento novilhas nelore (n=33), sem a presença de corpo lúteo no exame ultrassonográfico, as quais foram distribuídas aleatoriamente em três grupos experimentais. No dia da inserção do dispositivo intravaginal (D0) todos os animais receberam 2 mg de benzoato de estradiol (BE) e um dispositivo intravaginal contendo 0,6 g de P4 (grupo monodose, n=11), 1,2 g, porém previamente utilizados por oito dias (grupo usado, n=11) e por último dispositivo contendo 1,2 g de P4 sem utilização prévia (grupo Max, n=11). Oito dias mais tarde (D8) administrou-se 2ml PGF2α, 300 UI de eCG e 0,5 ml de ECP em todos os animais e o dispositivo foi removido. Entre os dias D0 e D17, foram realizados exames ultrassonográficos dos ovários e mensurado o diâmetro folicular nos dias 4, 8, 10 e o CL no dia 17. Foram colhidas amostras de sangue para dosagem da P4 nos dias 0, 2, 4, 8 e 17. As variáveis diâmetro folicular, diâmetro do CL, e concentração de P4 passaram primeiramente pelos testes de homogeneidade e normalidade e após ao ANOVA. Aquelas variáveis que apresentaram P<0,05 foram comparadas pelo teste de DUNCAM. Não houve diferença estatística entre os grupos quando comparamos o diâmetro folicular nos dias 4, 8, 10, bem como o diâmetro do corpo lúteo do dia 17 (P>0,05). O dispositivo monodose (0,6 g de P4) liberou maior quantidade de P4 que o dispositivo Max (1,2 g de P4) e também que o dispositivo Max (previamente utilizado) nos dias 2 e 4, sendo estatísticamente diferente (P<0,05). No entanto conclui-se que o uso de implantes contento maiores quantidades de progesterona (1,2 g) em novilhas nelore não altera o perfil de desenvolvimento folicular, podendo ser indicado sem utilização prévia para novilhas nelore.

SBTE 110 IATF, TETF e IA

Indução de ciclicidade na eficiência reprodutiva de novilhas nelore de 14 meses de idade submetidas à inseminação artificial em tempo fixo

Bruno Gonzalez De Freitas; Bruna Martins Guerreiro; Rodolfo Daniel Mingoti; Manoel Francisco Sá Filho; Lais Mendes Vieira; Bruno Moura Monteiro; Pietro Sampaio Baruselli
FMVZ/USP.

Palavras-chave: Precocidade; sincronização; ia

Protocolos de indução de ciclicidade em novilhas zebuínas de 24 meses de idade aumentam as taxas de ciclicidade e concepção após a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), porém poucas informações são descritas em novilhas da raça Nelore de 14 meses de idade. O objetivo desse estudo foi avaliar a influência do protocolo de indução de ciclicidade na eficiência reprodutiva de novilhas da raça Nelore. Um total de 626 novilhas de 14,0±0,04 meses de idade, 261,3±0,94kg de peso vivo e ECC 3,05±0,01 (1-5), oriundas de duas fazendas comerciais (Camapuã e Três Lagoas – MS) e distribuídas em 5 lotes distintos foram utilizadas. As fêmeas foram aleatoriamente distribuídas, dentro de cada lote, em dois grupos experimentais: Indução (n=307) e Controle (sem tratamento adicional; n=319). O grupo Indução recebeu um dispositivo de progesterona (P4; CIDR®, Zoetis) usado previamente por 24 dias (Dia -22) e que permaneceu por 10 dias. Imediatamente após a remoção do dispositivo (Dia –12), foram administrados 0,6 mg IM de cipionato de estradiol (CE; E.C.P®, Zoetis). Doze dias após (Dia 0) todas as fêmeas foram submetidas ao mesmo protocolo de IATF, recebendo um implante auricular contendo 3,0 mg de Norgestomet (CRESTAR®, MSD) e 2,0 mg IM de benzoato de estradiol (BE; Gonadiol®, MSD). No Dia 8, removeu-se os implantes e administrou-se 0,6 mg IM de CE, 0,265 mg IM de cloprostenol (Ciosin®, MSD) e 300 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG, Novormon®, MSD). As novilhas foram inseminadas 48 h após (Dia 10; 1ª IATF). No Dia 32 (22 dias após a 1ª IATF), todas as novilhas foram ressincronizadas para receberem a 2ª IATF com o mesmo protocolo descrito acima, exceto pela dose de BE no início do tratamento (1 mg). No Dia 40, removeu-se os implantes auriculares e foi realizado o diagnóstico de gestação por ultrassonografia transretal (Chison 8200VET, Kylumax). As fêmeas não gestantes receberam o mesmo protocolo utilizado para a 1ª IATF. O segundo diagnóstico de gestação foi realizado no Dia 72 para avaliar a P/IA após 2ª IATF. Além disso, exames ultrassonográficos foram realizados nos Dias -22, -12 e 0 para avaliação da presença de corpo lúteo (CL). A análise estatística foi realizada utilizando o procedimento GLIMMIX do SAS® 9.3. A taxa de presença de CL no Dia -12 não diferiu entre os grupos (Indução=1,3% vs. Controle=1,3%; P=0,95) porém foi maior no Dia 0 nas fêmeas do grupo Indução (75,3%) em comparação ao grupo Controle (7,8%; P<0,0001). Com relação à P/IA, não foram observadas diferenças entre os grupos após a 1a IATF (Indução=43,0 vs. Controle=42,9%; P=0,99), após 2ª IATF (Indução=35,6 vs. 32,6%; P=0,67) e acumulada (1ªIATF + 2ª IATF; Indução=63,5 vs. Controle=61,8%; P=0,75). Dessa forma, conclui-se que o protocolo de indução de ciclicidade aumenta a porcentagem de novilhas da raça Nelore cíclicas de 14 meses de idade, entretanto, não altera a P/IA após a 1ª e a 2ª IATF. Agradecimentos: Fazendas São Mateus e Engano, Bovifértil e CNPq.

SBTE 111 IATF, TETF e IA

Influencia do diâmetro do folículo no momento da IATF sobre a ocorrência de estro e a taxa de concepção em vacas de corte taurinas em anestro

Mityelle Da Costa Chaves Rodrigues[1]; Lucas Balinhas Farias[1]; Monique Da Silva Costa[1]; Cassio Cassal Brauner[1]; Marcio Nunes Correa[1]; Manoel Francisco Sá Filho[2]; Carolina Bespalhok Jacometo[1]; Gilson Antonio Pessoa[3]; Fábio Gallas Leivas[4]; Giovane Wolffenbüttel Carloto[4]
1.Universidade Federal De Pelotas; 2.Universidade De São Paulo; 3.Universidade Federal De Santa Maria; 4.UNIPAMPA.

Palavras-chave: Diâmetro folicular; iatf; *Bos taurus*

O diâmetro folicular no momento da inseminação artificial em tempo fixo (IATF) é associado à resposta dos tratamentos de sincronização da ovulação. Desta forma, objetivou-se no presente estudo, avaliar o diâmetro do maior folículo (FL) presente no momento da IATF sobre a taxa de ocorrência de estro e a taxa de prenhez por IA (P/IA) de vacas de corte taurinas lactantes em anestro. Vacas acíclicas (n=435) oriundas de cinco fazendas comerciais localizadas em três regiões distintas do estado do RS e mantidas em campo nativo foram utilizadas. No início do protocolo de sincronização (D0), as vacas apresentavam escore de condição corporal de 2,77±0,02 (escala de 1 a 5) e receberam um dispositivo de progesterona (P4; CIDR®, Zoetis) e 2 mg IM de benzoato de estradiol (BE; Gonadiol®, Zoetis). No D9, o dispositivo foi removido e foram administrados IM 12,5 mg de dinoprost trometamina (Lutalyse®, Zoetis) e 1 mg de cipionato de estradiol (E.C.P.®, Zoetis). Neste momento as fêmeas tiveram a base da cauda pintada com bastão de cera (Raidl-Maxi, Raidex GmbH, Dettingen/Erms, Germany) para marcação das fêmeas que apresentaram estro. No D11 foi realizada a IATF, bem como a identificação e mensuração do FL por ultrassonografia transretal. Somente fêmeas apresentando ausência de corpo lúteo no momento da inserção e remoção do dispositivo de P4 foram utilizadas. A análise estatística foi realizada utilizando o programa SAS. O diâmetro médio do FL foi de 14,2±0,2 mm. Pela análise da curva ROC (Receiver operating characteristic), verificou-se que o diâmetro do FL crítico para o estabelecimento da gestação foi de 15 mm e a área sob a curva foi de 66,1 (intervalo de confiança de 95 % (CI) foi 0,661-0,780; P<0,001). As vacas que apresentaram FL > 15 mm (n=257; 17.0±0,1) apresentaram maior ocorrência de estro (84,8% vs. 63,0%; P<0,0001) e maior P/IA (53,9% vs. 22,6%; P<0,0001) do que aquelas com FL ≤ 15 mm (n=178; 12.5±0,1). Ainda, foi observada relação linear entre o diâmetro do FL e a probabilidade de ocorrência de estro [exp (1.5503+0.1802*FL/1+exp (-1.5503+0.1802*FL); P<0.0001)] e P/IA [exp (-3.4719+0.1985*FL/1+exp (-3.4719+0.1985*FL); P<0.0001)]. Não houve relação quadrática entre o diâmetro do FL e ocorrência de estro (P=0,19) ou P/AI (P=0,30). Desta forma, conforme aumenta o diâmetro do FL no momento da IATF, aumenta-se a ocorrência de estro e a P/AI, sendo 15 mm o tamanho crítico para o estabelecimento da gestação em vacas de corte taurinas em anestro submetidas a sincronização da ovulação para IATF.
Agradecimentos: Zoetis, Cabanha Aguada, Agropecuária Posto Branco, Agropecuária Odair Gonzáles, Fazenda Dois Angicos e Estância Nova Aurora.

SBTE 112 IATF, TETF e IA

Influência do ambiente uterino (matriz em lactação ou não) e fertilidade da matriz no desempenho reprodutivo futuro da sua prole em vacas holandesas

Alexandre Henryli Souza[1]; Maria Clara Costa Mattos[1]; Bruna Cerrutti De Godoi[1]; Emiliana Oliveira Santana Batista[2]; Pietro Sampaio Baruselli[2]
1.CEVA SAÚDE ANIMAL; 2.USP.

Palavras-chave: Ambiente uterino; fertilidade; holandesa

Este estudo retrospectivo teve o objetivo de avaliar se características de desempenho reprodutivo da matriz e seu ambiente uterino (matriz em lactação ou não) poderiam afetar o desempenho reprodutivo de suas filhas. Para tanto, dados de fertilidade em termos de taxa de concepção à 1ª IA ou (TC1); e intervalo parto-concepção ou (IPC)] e de produção de leite normalizada para 305 dias de lactação (média de 12.335 kg/lactação) de um total de 56.132 vacas Holandesas primíparas (filhas das matrizes selecionadas), localizadas em 226 fazendas leiteiras na região Central da Califórnia (E.U.A.) foram utilizadas nesta análise. Os dados de IPC assim como o número de lactações das mães de cada primípara analisada (matriz sendo uma novilha virgem n=25750, ou vaca em lactação n=30384) foram cruzados com dados de desempenho reprodutivo das filhas que estavam na sua primeira lactação. Os dados foram analizados com o proc HPMIXED do software SAS (versão 9.3). Quando dividiu-se o IPC das matrizes em classes (<50 d, 51-100 d, 101-150 d, 151-200 d, 201-300 d, e >300d), encontramos que ambas a TC1 e IPC das filhas durante sua primeira lactação foi afetada (P<0.01), respectivamente: matrizes < 50 d=38,4% e 113d; matrizes 51-100 d=36,9% e 120d; matrizes 101-150 d=35,1% e 121d; matrizes 151-200 d=35,8% e 123d; matrizes 201-300 d=34,7% e 124d; matrizes > 300 d=31,5% e 127d. Ao contrário do esperado, o ambiente uterino das matrizes não afetou (P=0.15) a fertilidade futura de sua prole sendo que filhas de novilhas apresentaram TC1=37,3% e IPC=119 d e filhas de vacas em lactação apresentaram TC1=36,0% e IPC=121 d. Estes resultados sugerem que matrizes de pior desempenho reprodutivo geram filhas com menor fertilidade, porém o status lactacional da matriz não pareceu afetar a fertilidade da suas descendentes.

SBTE 113 IATF, TETF e IA

Inseminação artificial e iatf em rebanhos leiteiros acrianos: relato de caso

Bruno Pena Carvalho; Francisco Aloísio Cavalcante; José Marques Carneiro Junior
EMBRAPA.

Palavras-chave: Inseminação artificial; iatf; bovinos leiteiros

O Acre apresenta uma das menores médias de produção de leite/vaca/dia do país. Esse dado é um reflexo de um rebanho pouco especializado para a produção leiteira. Tal fato tem gerado uma grande necessidade de melhoramento genético do rebanho para que os produtores possam aumentar sua eficiência produtiva. A inseminação artificial (IA) é uma técnica mundialmente difundida e tem por objetivo o melhoramento genético através do uso de touros geneticamente superiores. Mais recentemente, para contornar o principal entrave desta técnica, que é a observação de cio, tem sido crescente o uso da inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Porém, tanto a IA quanto a IATF devem ser implementadas de forma adequada para evitar redução na eficiência reprodutiva. O objetivo do presente trabalho foi relatar resultados obtidos após a introdução da técnica de IA com observação de cio associada à IATF em rebanhos leiteiros no Acre. O programa de IA foi iniciado a partir de um curso teórico-prático para produtores de leite de base familiar e foram utilizados dados de duas propriedades no município de Feijó, AC. Foi realizado diagnóstico de gestação por meio de ultrassonografia (Mindray DP 2200) e controle zootécnico do rebanho. As taxas de prenhez antes (monta natural a campo) e depois da implantação do programa de IA + IATF foram avaliadas. Inicialmente foi realizado o diagnóstico de gestação em todos os animais antes da implantação do programa [primeira avaliação (A1)] e repetido após 12 meses [segunda avaliação (A2)]. Na A1, na propriedade 01, a taxa de prenhez foi de 58% de um total de 83 animais em idade reprodutiva e utilizou-se IATF, IA e monta natural (durante um período determinado de 2 meses). Após essa avaliação inicial, 9 animais foram descartados devido à baixa produção e idade avançada. Na propriedade 02, a taxa de prenhez foi de 50% de um total de 26 animais em idade reprodutiva e utilizou-se IATF e monta natural (durante um período determinado de 2 meses). Nenhum animal foi descartado nesta propriedade. Na A2, na propriedade 01, a taxa de prenhez foi de 77% de um total de 74, sendo 82,5% destas prenhezes oriundas de IA (taxa de concepção de 48%) ou IATF (taxa de concepção de 38%). Na propriedade 02, a taxa de prenhez foi de 73% de um total de 26 animais, sendo 93% destas prenhezes oriundas de IATF (taxa de concepção de 50%). Assim, pelo presente relato, conclui-se que a utilização de IA associada à IATF foi capaz de elevar a taxa de prenhez em rebanhos leiteiros no Acre, gerando um número satisfatório de prenhezes oriundas destas técnicas.

SBTE 114 IATF, TETF e IA

Intensificação do manejo reprodutivo em um rebanho leiteiro

Pedro Leopoldo Jerônimo Monteiro Jr[1]; Jorge Alberto Hildebrand Gonzales[2]; Bruno Gonzales[2]; Roberto Sartori[1]
1.ESALQ / USP; 2.Fazenda São Jorge.

Palavras-chave: Vaca leiteira; iatf; manejo reprodutivo

Com o objetivo de avaliar o impacto da utilização intensiva de protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) nos índices reprodutivos em um rebanho leiteiro no estado de São Paulo, Brasil, foi realizada uma análise de 4512 inseminações artificiais (IA) entre 2009 e 2014. Para tanto, utilizou-se o banco de dados de 2009 a 2014 de uma agropecuária leiteira, com aproximadamente 320 vacas lactantes, criadas intensivamente, com produção média de 35,4±9,4 kg de leite/d. Foram analisados 1688 dados de primíparas e 2824 de multíparas. Para análise, dividiu-se os grupos baseado na estratégia de manejo reprodutivo: Não-intensivo (N-INT; 2009-2011), em que as vacas foram tratadas com duas aplicações de PGF2α aos 40±7 e 54±7 d em lactação (DEL), e apenas aos 73±7 DEL as vacas foram submetidas a IATF; e Intensivo (INT; 2012-2013), em que vacas receberam PGF2α (aos 40±3 DEL), e após 14 d (54±3 DEL) foram submetidas a IATF. Em ambos os grupos, após o período de espera voluntário (PEV; 40 DEL), vacas identificadas em estro foram inseminadas. No grupo N-INT a visita do médico veterinário era realizada a cada 14 d e no INT a cada 7 d. Os dados foram analisados por meio dos Procedimentos Freq, Glimmix e Lifetest do SAS. A porcentagem de inseminações realizadas por meio de IATF foi superior (P<0,001) no período de manejo intensivo (N-INT: 29,1% [559/1920] vs. 56,9% [1474/2592]). Na análise de sobrevivência, verificou-se atraso das vacas do grupo N-INT a receberem a 1ª IA (P<0,01) e a se tornarem prenhes (P<0,01) quando comparadas às do grupo INT. Aos 70 DEL, 65,4% (394/572) das vacas do grupo N-INT ainda não haviam sido inseminadas, enquanto que no grupo INT apenas 35,2% (314/892). Além disso, foi visto também que 34,2% (184/538) e 45,4% (408/899) das vacas tornaram-se prenhes até os 103 DEL (3 ciclos após o PEV), para os grupos N-INT e INT, respectivamente. O grupo N-INT apresentou menor P/IA aos 31 d pós inseminação (27,9% [539/1920] vs. 37,1% [903/2592]; P<0,01) e aos 59 d (23,8% [463/1920] vs. 32,4% [777/2592]; P<0,01), contudo não foi observada diferença na perda gestacional (13,6% [76/539] vs. 13,6% [126/903]; P>0,10). Quando analisado a interação entre grupos e número de IA não foi observado (P=0,17) efeito na P/IA aos 31d (23,6% [160/577], 28,4% [379/1343], 34,2% [341/898] e 34,8% [562/1694], para N-INT 1ªIA, N-INT ReIA, INT 1ªIA e N-INT ReIA, respectivamente), sendo que aos 59d esse efeito foi observado (22,6% [133/577], 25,0% [330/1343], 34,3% [302/898] e 30,5% [475/1694], para N-INT 1ªIA, N-INT ReIA, INT 1ªIA e N-INT ReIA, respectivamente; P=0,04). Portanto, a intensificação do manejo reprodutivo aumentou a taxa de serviço à 1ª IA, e consequentemente diminuiu o intervalo entre o parto e a concepção. Além disso, aumentou a fertilidade principalmente da 1ª IA pós-parto.
Agradecimentos: FAPESP, CAPES, CNPq, Fazenda São Jorge e GEA Farm Technologies.

SBTE 115 IATF, TETF e IA

Melhoria da taxa de prenhez com o protocolo de 6 dias j-synch em vacas receptoras de embriões produzidos *in vitro*

A. Menchaca[1]; S Dutra[1]; J M Carrau[1]; F Sapriza[1]; J Salazar[1]; J De La Mata[2]; G Bo[3]
1.Fundación Irauy; 2.Universidad Nacional De La Pampa; 3.IRAC.

Palavras-chave: Ovário; corpo lúteo; embrião

A duração do proestro afeta a capacidade de crescimento do folículo e atingir a ovulação, por isso, a taxa de prenhez pode ser melhorada se o proestro for prolongado. Levando este aspecto em consideração, um novo protocolo para IATF usando estradiol e progesterona foi proposto e nomeado como J-Synch. Neste novo tratamento a remoção do dispositivo é antecipada para o Dia 6 em vez do Dia 7 ou 8, e em vez de usar ECP quando o dispositivo é removido para induzir a ovulação, é utilizada uma dose de GnRH 72 h mais tarde. O objetivo deste estudo foi determinar a taxa de prenhez em fêmeas receptoras de embriões obtida com o tratamento com progesterona + ECP de 7 dias vs. 6 dias de tratamento com progesterona + GnRH. O experimento foi realizado em cinco repetições usando fêmeas cruzadas Hereford com condição corporal > 2,5 (escala de 1 a 5). Todas as fêmeas receberam um dispositivo intravaginal (0,5 g de progesterona, DIB, Syntex, Argentina) mais 2 mg de BE im (Syntex) (Dia 0). No grupo de tratamento de 7 dias (n=481) o DIB foi removido no dia 7 da manhã e 500 mg de cloprostenol (DL ciclase, Syntex), 400 UI de eCG (Novormon, Syntex), e 0,5 mg de ECP (Cipiosyn, Syntex) foi administrada via im. No grupo experimental J-Synch (n=464) o DIB foi removido no dia 6 momento em que foi administrada por via intramuscular uma dose de cloprostenol (500 mg de cloprostenol) e eCG (400 UI). Para este grupo as fêmeas receberam uma dose de análogo de GnRH (100 µg acetato gonadorelina, Gonasyn Gdr, Syntex) administrada 72 horas após a remoção do dispositivo. Para cada grupo a transferência de embriões em tempo fixo (TETF) foi realizada metade no Dia 16 e metade no Dia 17 com blastocistos produzidos por fertilização *in vitro* utilizando sêmen sexado. A taxa de prenhez foi determinada por ultrassonografia 40-45 dias após a transferência dos embriões. Os dados foram analisados por meio de regressão logística. A taxa de prenhez foi maior para o tratamento de 6 dias (49,3%, 229/464) comparado com tratamento convencional (40,9%, 197/481; P <0,05). Não foi encontrada nenhuma diferença quando analisamos o dia da transferência dos embriões (TETF no Dia 16: 45,9%, 249/543; TETF no Dia 17: 44,3%, 178/402; P=NS). Em conclusão, a prorrogação do período entre a queda de progesterona e o indutor da ovulação alcançado pelo avanço da remoção do DIB no dia 6 e administração de GnRH no Dia 9 (i.e. o protocolo J-Synch) poderia melhorar a taxa de prenhez em vacas receptoras.

SBTE 116 IATF, TETF e IA

O descongelamento simultâneo de dez palhetas de sêmen reduz a taxas de concepção de vacas de corte submetidas a IATF

Luciano Penteado[1]; Remolo Rey Quesada[1]; Iara Maris Pires Rosa[1]; Leandro Graeff[1]; Rodolfo Daniel Mingoti[2]; Manoel Francisco Sá Filho[2]; Pietro Sampaio Baruselli[2]
1.Firmasa Tecnologia Para Pecuária; 2.VRA / FMVZ / USP.

Palavras-chave: IATF; descongelamento de sêmen; nelore

O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos de dois diferentes métodos de descongelamento de sêmen sobre a taxa de concepção de vacas de corte submetidas à inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Um total de 1174 vacas (1130 lactantes e 44 não lactantes) com escore de condição corporal médio (ECC) 3.00±0.01, provenientes de sete fazendas comerciais, receberam, no início do tratamento (Dia 0), um dispositivo de liberação progesterona (P4; DIB®; MSD Saúde Animal), associado a 2,0 mg IM de benzoato de estradiol (BE; Gonadiol®, MSD Animal Health). Oito dias após (Dia 8), o dispositivo foi removido e foram administrados 1 mg IM de cipionato de estradiol (ECP, Zoetis Animal Health), 530 mg IM de cloprostenol sódico (Ciosin®, MSD Saúde Animal) e 300UI IM de gonadotrofina coriônica equina (Folligon®, MSD Saúde Animal). No Dia 10, as vacas foram inseminadas com palhetas de sêmen (0,25 ml) descongeladas por dois diferentes métodos, definidos como: 1) Convencional (n=575), no qual 10 palhetas de sêmen foram descongeladas simultaneamente a 35 ºC utilizando descongelador automático (CITO Warm Water Thaw; DSP-0063/AC); ou 2) Pausado (n=599) no qual apenas três palhetas de sêmen foram descongeladas simultaneamente, utilizando a mesma temperatura e descongelador automático para descongelamento. Após 30 segundos de descongelamento, as palhetas foram utilizadas sequencialmente (aproximadamente uma IATF por minuto). O diagnóstico de gestação foi realizado por ultrassonografia transretal (5.0 MHz, Aloka e Mindrey) 30 dias após a IATF. A análise estatística foi realizada utilizando o procedimento PROC GLIMMIX do SAS (SAS® 9.3 Institute Inc., Cary, NC, USA, 2003). O método Pausado resultou em maior a taxa de concepção (50.7%) em comparação ao método Convencional (42.3%; P=0.01). Em conclusão, o descongelamento simultâneo de três palhetas promove melhores resultados do que o descongelamento simultâneo de 10 palhetas em vacas de corte lactantes inseminadas em tempo fixo.
Agradecimento: Firmasa Tecnologia para Pecuária, Grupo Piveta, Camilha e Carolina Agulhon (Fazenda Romaria);

SBTE 117 IATF, TETF e IA

O processo da inseminação artificial altera a concentração plasmática de cortisol e a hemodinâmica uterina em bovinos?

Bruna Marcele Oliveira; Rubens Paes De Arruda; Milton Maturana Filho; Helder Esteves Thomé; Guilherme Cain De Oliveira; Carina Fátima Guimarães; Luciano A Silva; Eneiva Carla Carvalho Celeghini
USP.

Palavras-chave: Inseminação artificial; cortisol; radioimunoensaio

O objetivo desse trabalho foi verificar se o procedimento de inseminação artificial (IA) é capaz de influenciar a concentração plasmática de cortisol, devido ao estresse que os animais são submetidos, bem como correlacionar a concentração de cortisol e os dados da hemodinâmica uterina avaliados por ultrassonografia Doppler em vacas paridas da raça Nelore. Para isso foram utilizadas 18 fêmeas que foram divididas em dois grupos: Inseminado (IAG, n=9) e não inseminado (CG, n=9), sendo que todos os animais passaram por sincronização do estro e da ovulação; no entanto, apenas os animais do IAG tiveram sêmen depositado no corpo do útero. Todos os animais foram avaliados quanto à hemodinâmica uterina utilizando aparelho de ultrassonografia Doppler no modo color, para a avaliação do escore de vascularização (VS) dos cornos uterinos, e no modo espectral, para a avaliação do índice de resistência (RI) da artéria uterina, em cinco momentos: 30 horas antes da IA, 4, 24, 48 e 168 horas após a IA. Nos mesmos momentos, amostras de sangue foram coletadas da veia jugular externa de todos os animais. O plasma sanguíneo foi avaliado por radioimunoensaio com auxílio de kits específicos para a determinação da concentração de cortisol. Os valores de cortisol estão demonstrados em nmol/L. Os dados foram analisados pelo PROC MIXED para verificar a diferença entre os grupos e pelo PROC CORR do SAS para verificar a correlação entre as variáveis. Significâncias estatísticas foram consideradas quando P<0,05. Não foi observada diferença na concentração de cortisol entre os grupos (IAG=78,70±8,93; CG=68,71±5,30; P= 0,33). Com relação a hemodinâmica uterina, o IAG apresentou menores valores de RI (IAG=0,67±0,01; CG=0,73±0,02; p<0,05), indicando maior vascularização, no entanto, não foi observada diferença entre os grupos quanto ao VS (IAG=1,81±0,08; CG=1,75±0,05; p>0,05). Também não foi observada correlação entre a concentração de cortisol e VS (R= -0,00527; P=0,96) e nem entre a concentração de cortisol e RI (R= -0,00577; P=0,95). Nessas circunstâncias e utilizando essa quantidade de animais (n=18), não foi possível observar diferença na concentração plasmática de cortisol entre animais que foram inseminados e animais que não passaram pelo processo de inseminação, bem como não se observou correlação entre a concentração plasmática de cortisol e os dados da hemodinâmica uterina avaliados por ultrassonografia Doppler
Suporte financeiro pela FAPESP (processos 2011/22833-9 e 2014/12757-1).

SBTE 118 IATF, TETF e IA

O uso de protocolos de sincronização da emergência de onda folicular e ovulação e de ecg pode acelerar a prenhez de primíparas nelore (*B. Indicus*) entouradas

Roberta Machado Ferreira[1]; Talita Lara Conti[2]; Lucas De Araújo Souto[3]; José Nélio De Sousa Sales[4]; Pietro Sampaio Baruselli[5]
1.Departamento De Medicina Veterinária Da FZEA-USP; 2.Centro Universitário Anhanguera; 3.Biogénesis Bagó Saúde Animal Ltda; 4.Departamento De Medicina Veterinária Da UFLA; 5.Departamento De Reprodução Animal Da FMVZ-USP.

Palavras-chave: Anestro; indução de ciclicidade; touro

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do uso de protocolos de sincronização da emergência de onda folicular e ovulação com ou sem a administração de eCG sobre a velocidade de concepção na estação de monta (EM) de primíparas zebuínas (Nelore; ECC=2,74±0,03) mantidas a pasto. O estudo foi conduzido na Fazenda Vera Cruz IV, Barra do Garças – MT. No D0, 350 primíparas recém-paridas (30-50 DPP) foram avaliadas por ultrassonografia (Mindray DP2200VET) e somente aquelas com regressão uterina completa foram randomizadas (de acordo com o ECC) para compor um dos três grupos experimentais: sem tratamento (controle), tratadas (protocolo sem eCG) ou tratadas+eCG (protocolo com eCG). Vacas controle não receberam tratamento prévio ao entouramento, enquanto as demais receberam similar protocolo, diferindo apenas pelo uso de eCG (Ecegon®; Biogénesis-Bagó, Argentina). O protocolo usado nos grupos tratados foi a inserção de um dispositivo intravaginal com 1g de P4 (Cronipres Mono Dose®, Biogénesis Bagó, Brasil) e 2 mg de benzoato de estradiol (Bioestrogen®, Biogénesis Bagó, Brasil) IM no D0. No D9, o dispositivo foi removido e administrou-se 1 mg de cipionato de estradiol (Croni-Cip®, Biogénesis Bagó, Argentina) IM em todas as tratadas e 300 UI de eCG IM apenas nas tratadas+eCG. Todas as vacas foram mantidas em mesmo lote e entouradas no D9, mantendo-se a proporção touro:vaca de 1:10 nos primeiros 10d e 1:20 nos demais 110d da EM. Avaliações ultrassonográficas foram feitas a cada 40d, registrando-se a idade gestacional para predizer a quantidade de novas gestações a cada ciclo de 21d (C1, C2, C3, C4 e C5), a partir do entouramento (C1). Os dados foram analisados pelo PROC GLIMMIX do SAS. Vacas controle tiveram taxa de concepção em C1 muito inferior (5,7%^{c}, 7/123) a de tratadas (30,4%^{b}, 35/115), que por sua vez foi inferior à de tratadas+eCG (52,7%^{a}, 59/112; P=0,001). No segundo cio pós entouramento (C2) houve incremento das taxas de concepção de todos os grupos, mas a diferença entre eles se manteve: 17,1%^{c} (21/123), 42,6%^{b} (49/115), 58,9%^{a} (66/112); P=0,001. Comportamento similar foi observado para C3 [27,6% (34/123)^{c}, 52,2% (60/115)^{b} e 70,4% (79/112)^{a}; P=0,001] e C4 [42,3% (52/123)^{c}, 58,3% (67/115)^{b} e 74,1% (83/112)^{a}; P=0,001]. Apenas no último ciclo (C5), vacas controle se aproximaram de tratadas, enquanto tratadas+eCG permaneceram superiores: 65,0 (80/123)^{b}, 68,7% (79/115)^{ab} e 82,1% (92/112)^{a}; P=0,01. Portanto, comprovou-se que a aciclicidade pós-parto é um importante vilão da eficiência reprodutiva de primíparas criadas a pasto e que o tratamento com protocolos semelhantes à IATF são cruciais para melhorar e acelerar a concepção pós-parto. Ainda, o uso da eCG pode potencialmente melhorar a taxa de concepção pós-parto, fazendo com que mais da metade das vacas concebam ao primeiro serviço pós-parto, número bastante superior aos 5,7% do grupo controle e 30,4% do tratado sem eCG. Agradecimentos: Faz. Vera Cruz IV, FAPESP 2012/07510-1, CNPq 486089/2013-4.

SBTE 119 IATF, TETF e IA

Perdas de princípio ativo na higienização de dispositivos intravaginais de progesterona visando reutilização posterior

Lucas Freire Pereira; Tochimara Aparecida Miyauchi; Aécio Silveira Raymundy; Romeu Luiz De Podestá Junior; Junior Henrique De Oliveira; Carlos Antônio De Carvalho Fernandes; Ana Cristina Silva De Figueiredo; João Henrique Moreira Viana; Felipe Costa Gonçalves
UNIFENAS.

Palavras-chave: Concentração; dispositivos; progesterona

A reutilização dos dispositivos intravaginais de progesterona (IVP), embora sem indicação em bula nos produtos comerciais, é amplamente utilizada no Brasil. Tal prática, contudo, carece de fundamentação técnica (Neri, H,L.D, et al, Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.67, n.2, p.405-410, 2015), o que gera questionamentos quanto a possível perda de progesterona (P4) no processo. Objetivou-se no presente estudo quantificar a quantidade P4 perdida pelo IVP, quando deixado imerso em solução com ou sem detergente. Foram utilizados dez IVP novos de silicone, contendo de 1g de P4 (Primer, Agener União, Brasil). Cada IVP foi colocado em recipiente de plastico limpos com 5 litros de água filtrada com ou sem a adição de 1% de detergente liquido. Os implantes ficaram totalmente imersos na água. Imediatamente antes de cada coleta, nos tempos pré-estabelecidos amostras de 0,1mL da água foram coletadas com pipeta automática nos tempos 0 (antes da colocação do IVP) 30, 60 e 120 minutos após a colocação do IVP em imersão, sempre após homogeneização do conteúdo. As amostras colhidas foram diluídas 100x para se ajustarem a faixa de mensuração do kit de RIA utilizado, que é de 0,5 a 40,0 ng/mL, armazenadas em tubos tipo Epperdorf e congeladas a -20ºC para posterior avaliação por RIA (RIA IM 1188, Immunotech Inc., Prague, CzechRepublic). Considerou-se que originalmente cada implante possuia 1g de P4. A quantidade total de P4 perdida foi determinada pela correção para o volume total inicial (5 litros). Como a dosagem de P4 foi expressa em ng/mL, o percentual de perda foi calculado pela seguinte fórmula:(TotP4Sol/109)*100=TotP4Sol/107. A concentração média de P4 ([P4]) nos diferentes tratamentos e períodos de imersão foi analisada por ANOVA e diferenças entre médias comparadas pelo teste de Tukey. O período de imersão influenciou a [P4] tanto nos recipientes sem detergente quanto com detergente (26,6±8,7a; 35,0±9,2be 40,6±10,4b ng/mLou 42,2±11,2a; 57,0±13,5b e 69,2±15,1c para os tempos de 30, 60 e 120 minutos, respectivamente; P<0,05). Para um mesmo tempo de coleta o uso de detergente resultou em aumento na [P4] em solução (P<0,05). Contudo, estes resultados significaram perdas absolutas médias da P4 original de cada implante de 1,33%, 1,75% e 2,03% aos 30, 60 e 120 minutos quando não se utilizou detergente, e de 2,36%, 2,85% e 3,46% para 30, 60 e 120 minutos em solução com detergente. Conclui-se que a higienização de implantes intravaginais de P4 pela imersão em água com ou sem detergente resulta em perdas pouco significativas do princípio ativo.
Agradecimentos: Fapemig, Capes e CNPq.

SBTE 120 IATF, TETF e IA

Produção embrionária de ovelhas santa inês superovuladas com FSH

Demis Carlos Ribeiro Menezes[1]; Alexandre Floriani Ramos[2]; Ivo Pivato[1]; Jairo Pereira Neves[1]; Itacir Melara[3]; Pablo Oliveira Lopes[3]; Eduardo Meneses Da Silva[3]; Gilvan Rodrigues De Oliveira[3]; Ana Luiza Silva Guimarães[1]; Nathalia Hack Moreira[1]
1.Universidade Brasília; 2.Embrapa Recursos Genéticos E Biotecnologia; 3.Centro Universitário De Desenvolvimento Do Centro Oeste.

Palavras-chave: Embrião; ovelhas; superovulação

Neste estudo avaliou-se o efeito da administração de doses decrescentes de FSH de 12/12 ou de 24/24h sobre a resposta superovulatória e produção embrionária de ovelhas Santa Inês. Utilizou-se 34 ovelhas divididas em dois tratamentos. Para o protocolo de SOV a sincronização do estro foi obtida com colocação de CIDR vaginais com 0,3 g de P4 por 14 dias, com troca do dispositivo no sétimo dia, neste também foi aplicado 37,5 µg de D - cloprostenol. A estimulação ovariana foi efetuada com dose total de 133mg de FSH. No tratamento 1 (T1; n=17) as fêmeas receberam 8 aplicações em doses decrescentes a cada 12 horas e o tratamento 2 (T2; n=17) constou de 4 aplicações de FSH em doses decrescentes a cada 24 horas, que se iniciou 48 horas antes da remoção do CIDR, em ambos os tratamentos. Doze horas depois da retirada do CIDR administrou-se 25 µg de licerelina como indutor de ovulação; 12 e 22 horas após a aplicação desta realizou-se as IA com sêmen congelado por via laparoscópica e a coleta de embriões por hemilaparoscopia cinco dias após as IA. Realizou-se avaliação ultrassonográfica em 50% das doadoras. A análise estatística dos dadosfoi realizadacom programa SAEG 9.1 aplicando os testes paramétricos e não paramétricos. A média de estruturas coletadas (T1=3,47; T2=2,55) foram similares entre os tratamentos (P>0,05). Os embriões viáveis (T1=2,40; T2=0,82), embriões congeláveis (T1=2,07; T2=0,82) e o número médio de CL (T1=7,47; T2=5,73) no grupo de fêmeas superovuladas em doses decrescentes de FSH distribuídas em oito aplicações foi superior ao grupo de fêmeas que recebeu quatro aplicações de FSH (P<0,05) de 24/24h. A resposta superovulatória foi semelhante (P>0,05) entre as doadoras do T1 (88,24%) e T2 (64,70%). Os resultados sugerem que o protocolo oito doses de FSH a intervalos de 12 horas se mostra como a melhor opção para SOV em ovelhas Santa Inês.

SBTE 121 IATF, TETF e IA

Redução do manejo de vacas de corte para realização da inseminação artificial com sêmen sexado

Pietro Sampaio Baruselli[1]; Bruno Gonzalez De Freitas[1]; Bruna Martins Guerreiro[2]; Evanil Pires Campos Filho[2]; Gabriel Armond Crepaldi[2]; Marcio Wasilewski De Castro[3]; Anderson Faquim[3]; Bruno Moura Monteiro[1]; Manoel Francisco Sá Filho[1]
1.FMVZ/USP; 2.Sexing Technologies; 3.Aliança Assessoria.

Palavras-chave: Sêmem sexado; ésteres de estradiol; iatf

O presente estudo visou a comparação de diferentes indutores de ovulação (benzoato ou cipionato de estradiol) aplicados durante protocolos de inseminação artifical em tempo fixo (IATF) com sêmen sexado, visando a diminuição do manejo dos animais (3 vs. 4 manejos) e avaliação da eficiência reprodutiva de vacas de corte. Em fase aleatória do ciclo estral (Dia 0), 591 vacas Nelore (*Bos indicus*) multíparas paridas com ECC 2,45±0.02 receberam um dispositivo de progesterona (P4; CIDR®, Zoetis) e 2 mg de benzoato de estradiol (BE; Gonadiol®, Zoetis). No dia da retirada do dispositivo (Dia 8), as vacas receberam 25 mg IM de Dinoprost (Lutalyse®, Zoetis) e 300 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG; Novormon®, Zoetis) e foram aleatoriamente distribuídas em um de quatro grupos experimentais, com design fatorial 2x2: 1) 1 mg de cipionato de estradiol (CE; E.C.P®, Zoetis) na remoção do dispositivo e IATF com sêmem convencional (CE-0h-Conv; n=148); 2) mesmo tratamento que CE-0h-Conv, inseminadas com sêmem sexado (CE-0h-Sex; n=149); 3) 2 mg de BE 24 horas após a remoção do dispositivo e IATF com sêmem convencional (BE-24h-Conv; n=145); e 4) mesmo tratamento que BE-24h-Conv, inseminadas com sêmem sexado (BE-24h-Sex; n=149). Todas as IATFs foram realizadas por três inseminadores experientes, 60 horas após a remoção do dispositivo de P4, utilizando-se a mesma partida de três touros diferentes (touros A, B e C). O diagnóstico de gestação foi realizado por ultrassonografia transretal (Chison D600VET, Eletromedicina, Brasil) 30 dias após TAI. A Análise estatística foi realizada via procedimento GLIMMIX do SAS (SAS® 9.3). O ECC foi considerado como covariável e os inseminadores efeito aleatório. Não houve interação (P=0,07) entre os diferentes indutores de ovulação e o tipo de sêmem na prenhez por inseminação artificial (P/IA) que foi, de acordo com os tratamentos diferentes: CE-0h-Conv=68,2% (101/148); CE-0h-Sex=51,0% (76/149); BE-24h-Conv=52,4% (76/145); and BE-24h-Sex=49,0% (73/149). Entretanto, o CE promoveu maior P/IA em comparação com o BE [CE=59,6% (177/297) vs. BE=50,7% (149/294); P=0,03)] e o sêmem convencional resultou em maior P/IA comparado com o sêmem sexado [Convencional=60,4% (177/293) vs. Sexado=50,0% (149/298); P=0,007]. Além disso, houve uma diferença de acordo com os diferentes touros utilizados, independentemente do indutor de ovulação ou tipo de sêmem utilizado [Sexado: Touro A=39,8% (39/98); Touro B=50,0% (51/102) and Touro C=60,2% (n =59/98). Convencional: Touro A=54,5% (55/101); Touro B=62,1% (64/103) and Touro C=65,2% (58/89); P=0,01]. Portanto, sêmem convencional resulta em maior P/IA e diferentes touros promoveram P/IA diferentes. Ainda, CE resultou em uma maior P/IA em comparação ao BE, permitindo a redução do manejo de vacas de corte paridas inseminadas em tempo fixo com sêmem sexado, sem comprometer a P/IA. Agradecimentos: Sexing Technologies, Aliança Assessoria Agropecuária e Fazenda Sta. Cristina.

SBTE 122 IATF, TETF e IA

Relação entre população de folículos antrais e diâmetro uterino em novilhas nelore

Bárbara Pedro Novelli; Crícia Alves Gutjahr; Luiz Fernando Garro Monteiro; Henrique Goulart Ribeiro De Mendonça; Anna Raquel Grimas Almeida; Tamires Korchovei Sanches; José Carlos Arevalo Junior; Wanessa Blaschi; Thales Ricardo Rigo Barreiros
UENP.

Palavras-chave: População folicular; *Bos indicus*; puberdade

As relações entre o número de folículos e dosagens hormonais foram demonstradas como possíveis parâmetros para representar o potencial reprodutivo em fêmeas *Bos taurus* (Irelandet al., 2011, Reprod. Fertil. Dev. 23, 1–14). O objetivo desse estudo foi comparar a relação entre a população de folículos antrais e diâmetro uterino em novilhas da raça Nelore. Foram utilizadas, durante o mês de outubro de 2014, 336 novilhas da raça Nelore, com 25,0±3,2 meses de idade, com escore de condição corporal entre 3,0 a 3,5 (escala 1 a 5), manejadas em pastagem de Brachiaria brizanthae suplementação mineral ad libitum contendo 9% de fósforo. Os animais foram submetidos a dois exames de ultrassonografia transretal (7,5 mHZ, Mindray, China) com intervalo de 10 dias para avaliação da ciclicidade pela visualização de CL em um dos dois exames, contagem de todos os folículos antrais (CFA) visualizados e mensuração do diâmetro uterino, a partir da obtenção de três cortes transversais e cálculo da média entre as dimensões. Os resultados foram submetidos à análise de variância e correlação com significância de 5% e as novilhas foram classificadas em baixa (12,5±2,7; n=73), média (21,7±2,4; n=86) e alta CFA (35,0±7,7; n=177); (P=0,001). O diâmetro uterino foi semelhante (P=0,10) para novilhas com alta (11,0±1,9 mm), média (10,8±2,0 mm) e baixa CFA (10,3±2,7 mm). As novilhas pré-púberes (n=280) e púberes (n=56) tiveram diferença (P=0,03) nos valores para CFA, resultando em 27,3,1±11,1 vs 23,7±8,0 folículos, respectivamente. O diâmetro uterino foi maior (P=0,001) em novilhas púberes (12,2±2,6 mm) do que nas novilhas pré-púberes (10,6±1,9 mm). A CFA apresentou correlação positiva com o tamanho do útero (CR=0,11; P=0,03), entretanto observou-se correlação positiva apenas nas novilhas pré-púberes (CR=0,17, P=0,003); (púberes: CR=-0,05, P=0,6). Em conclusão, os resultados sugerem que a população folicular tenha possível influência no desenvolvimento uterino de novilhas Nelore pré-puberes.

SBTE 123 IATF, TETF e IA

Ressincronização melhora a eficiência reprodutiva de vacas taurinas lactantes submetidas à estação de monta durante o outono-inverno

Mara Iolanda Batistella Rubin[1]; Ana Paula Martini[1]; Diego Fontoura Simões[1]; José Alberto Rocha De Oliveira[2]; Janislene Mach Trentin[3]; Manoel Francisco Sá Filho[4]; Pietro Sampaio Baruselli[4]; Gilson Antonio Pessoa[1]
1.Universidade Federal De Santa Maria; 2.Universidade De Cruz Alta; 3.UFRGS; 4.Universidade De São Paulo.

Palavras-chave: Iatf; estação de monta; bovino

O impacto da ressincronização (RE) após a primeira inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em vacas de corte lactantes (n=960; Angus e Brangus) submetidas à estação de monta (EM) foi avaliado durante o outono-inverno. As fêmeas foram submetidas a quatro manejos reprodutivos: 1) somente monta natural (MN) durante 90 dias de estação de monta (EM) (n=266); 2) IATF realizada no início da EM (Dia 0) seguido de MN (IATF+MN; n=200); 3) IATF seguido de RE 30 dias após a 1ªIATF e MN até o final da EM (IATF+RE30+MN; n=245) ou; 4) IATF seguida de RE 22 dias após a 1ª IATF e MN até o final da EM (IATF-RE22+MN; n=249). As vacas foram distribuídas aleatoriamente no momento do parto nos tratamentos e alocadas em pastagens de inverno de Avena sativa, Trifolium reprens e Lolium multiflorum. Os protocolos de IATF utilizados, semelhantes para IATF e RE, consistiram da inserção do um dispositivo intravaginal de progesterona (P4; DIB®, MSD Saúde Animal) mais 2mg de benzoato de estradiol (BE, GONADIOL®, MSD Saúde Animal). Oito dias após removeu-se o dispositivo de P4 e administraram-se 500 mg de Cloprostenol sódico (CIOSIN ®, MSD Saúde Animal), 1mg de Cipionato de estradiol (ECP®, Zoetis), e 400UI de gonadotrofina coriônica equina (FOLLIGON®, MSD Saúde Animal). A IATF foi realizada 48 horas após a remoção do dispositivo de P4. As fêmeas do grupo MN foram expostas a touros durante toda a EM de 90 dias de duração, enquanto nos demais grupos, os touros foram introduzidos 10 dias após a última IATF, também na proporção de 1 touro para cada 20 vacas. Os diagnósticos de gestação (DG) foram realizados 30 (diagnóstico da MN ou da prenhez após a 1ª IATF), 70 (diagnóstico da MN ou da prenhez após a 2ª IATF) e 120 (diagnóstico final; 30 dias após o término da EM) dias após o início da EM. A análise estatística foi realizada por regressão logística utilizando o PROC GLIMMIX do SAS, considerando o efeito animal como efeito aleatório. Aos 30 dias de EM as fêmeas submetidas a MN (3.0%) resultaram menor taxa de prenhez (P<0,001) em relação aos demais manejos (IATF+MN= 40,0%; IATF+RE30+MN=40,0% e IATF+RE22+MN= 39,8%). Aos 70 dias de EM, os grupos que receberam RE [IATF+RE30+MN (69.4%) e IATF+RE22+MN (66.3%)] obtiveram maior taxa de prenhez (P<0,001) do que os outros grupos [MN (16,9%) e IATF+MN (48,0%)]. No entanto, o grupo IATF+MN apresentou maior taxa do que o grupo MN (P<0,001). A taxa de prenhez ao final da EM foi maior nos grupos submetidos a RE [RE30 (83.7%a) ou RE22 (81.5%a), em relação aos grupos MN (45,1%c) ou IATF+MN (71,0%b). Adicionalmente, fêmeas submetidas a IATF+MN resultaram em maior taxa de prenhez final do que aquelas submetidas somente a MN (P<0,001). Desta forma, o uso de programas de ressincronização, RE30 ou RE22, aumentam a taxa de prenhez provenientes de IA, bem como a eficiência reprodutiva de vacas taurinas submetidas a EM durante o outono-inverno.
Agradecimentos: MSD Saúde Animal, CAPES

SBTE 124 IATF, TETF e IA

Suplementação com acetato de melengestrol (MGA) pós IATF aumenta fertilidade em vacas nelore paridas

Wedson Maria Costa[1]; Everton Rodolfo Carvalho[2]; Marcos Henrique Colombo Pereira[1]; Rogerio Fonseca Guimaraes Peres[1]; Jose Luiz Moraes Vasconcelos[1]
1.UNESP; 2.ZOETIS.

Palavras-chave: Mga; progestágeno; iatf

Este estudo teve como objetivo avaliar se a suplementação oral de Acetato de Melengestrol (MGA®, Zoetis, SP, Brasil) após a IATF e se o período de suplementação aumenta a prenhez em vacas Nelore submetidas a protocolos de IATF com diferentes estímulos gonadotróficos (Remoção de bezerros (RB) ou eCG). Foram utilizadas 2301 vacas Nelore multíparas paridas, distribuídas em 24 lotes contemporâneos de parição, com acesso a pastagem de *Braquiaria* e água *ad libitum.* Todos os animais foram sincronizados com o protocolo: 2,0 mg de Benzoato de Estradiol im (2,0 ml de Gonadiol®, Zoetis, SP, Brasil) + dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR®, Zoetis, SP, Brasil) no d-11; 12,5 mg de PGF2α im (2,5 mL de Lutalyse®, Zoetis, SP, Brasil) no d-4; Retirada do CIDR® + 0,5 mg de Cipionato de Estradiol im (0,3 mL de ECP®, Zoetis, SP, Brasil) no d-2; IA no d0. No d-2 15 lotes (Fazenda 01) receberam 300UI de eCG im (1,5 ml de Novormon®, Zoetis, SP, Brasil) e 9 lotes (Fazenda 02) receberam a RB. Após a inseminação os lotes foram aleatoriamente distribuídos em três tratamentos: Controle- Animais não receberam MGA; MGA 6- Fornecimento de MGA por 6 dias, do dia 13 ao dia 18 após a IATF; MGA 14- Fornecimento de MGA por 14 dias, do dia 5 ao dia 18 após a IATF. A dose de Acetato de Melengetrol foi de 0,5 mg/dia (2,28 g de MGA®/dia) fornecidos junto ao sal mineral diariamente, sendo avaliado o consumo de sal por 3 dias antes do início da suplementação. O diagnóstico de gestação foi realizado por ultrassonografia 30 dias após a IATF. A Prenhez/IA (P/IA) foi determinada dividindo o número de vacas gestantes pelo número de vacas inseminadas. Foi utilizado o PROC GLIMMIX do programa SAS para análise dos dados, variáveis aleatórias foram incluídas no modelo e retiradas (critério de Wald) quando P>0,2. Foram realizados dois contrastes para determinar o efeito da suplementação de MGA [Controle vs. MGA (MGA 6 + MGA 14)] e para determinar o efeito da duração da suplementação com MGA (MGA 6 vs. MGA 14). Foram consideradas diferenças significativas quando P≤0,05. Não houve interação entre ECC ou estímulo (RB e eCG) na taxa de prenhez. Vacas suplementadas com MGA apresentaram maior P/IA [62,7% (983/1568)] em relação ao grupo Controle [56,2% (412/733)] independente do estímulo gonadotrófico. A duração da suplementação, independente do estímulo gonadotrófico, não interferiu na taxa de prenhez [MGA 6: 61,9% (520/840) vs. MGA 14: 63,6% (463/728)]. Conclui-se que a suplementação pós IATF com MGA aumentou a taxa de prenhez em vacas Nelore paridas, independente do estímulo gonadotrófico e da duração da suplementação.

SBTE 125 IATF, TETF e IA

Suplementação com semente de girassol altera a composição lipídica do endométrio em vacas de corte

Claudia Bertan Membrive[1]; Mariângela Bueno Cordeiro[1]; Dante Pazzanese Duarte Lanna[2]; Guilherme Pugliesi[2]; Thiago Santin[2]; Manoel Francisco Sá Filho[2]; Mário Binelli[2]
1.UNESP; 2.USP.

Palavras-chave: ácido linoleico; lipídios; pgf2a

Em estudos prévios (Cordeiro et al. 2015, Theriogenology, 83, 9, p. 1461-1468) observou-se que a taxa de concepção foi aumentada em vacas Nelore suplementadas com semente de girassol durante 22 dias a partir da IATF (66.7 % vs 47.8 %) e em novilhas cruzadas submetidas à TETF (55.7 % vs. 36.9 %). Objetivou-se testar a hipótese de que a suplementação com semente de girassol promove modificações endometriais na composição lipídica. Para tanto, comparou-se a composição de ácidos graxos no tecido endometrial de vacas suplementadas ou não com semente de girassol. Vacas Nelore (n=30) receberam um dispositivo intravaginal contendo progesterona (1g; DIB, Syntex Biochemistry & Pharmaceutical, Buenos Aires, Argentina) associado a uma injeção de benzoato de estradiol im (2mg; Benzoate HC, Hertape Calier Animal Health, Juatuba, Brazil). Os dispositivos foram removidos depois de oito dias, quando as vacas foram tratadas com cloprostenol sódico (2mg; Sincrocio®, Ourofino Animal Health, Ribeirão Preto, Brazil), cipionato de estradiol (0.5 mg; ECP®, Zoetis, São Paulo, Brazil) e eCG (300UI; Folligon®, MSD Animal Health, Madison, USA) via im. Dois dias após a remoção do dispositivo as fêmeas foram divididas em seis grupos para receberam 1,7 kg/animal/dia de suplemento contendo 40% farelo de soja com 44% de proteína bruta (PB) + 60% de semente de girassol por 6 (n=4), 14 (n=5) e 22 dias (n=6) ou suplemento contendo 53% farelo de soja com 44% de proteína bruta (PB) + 47% de milho por 6 (n=4), 14 (n=5) e 22 dias (n=6). Ambos os suplementos foram formulados com 72% NDT e 24% PB. As fêmeas foram abatidas 24 horas após o término da suplementação e o tecido endometrial foi isolado e armazenado a -196ºC. Os ácidos graxos do tecido endometrial foram avaliados por cromatografia gasosa. Os dados foram analisados pelo SAS Proc GLIMMIX. Dos ácidos graxos analizados (54 tipos), verificou-se a presença de 43 ácidos graxos no tecido endometrial. Os ácidos graxos ausentes no tecido endometrial foram C4:0, C11:0, C12:1, C: 13:0, C13:0 iso, C13:0 antiiso, C14:0 iso, C15:1, C18:1 T16, C18: 2 C12 T10 e C21:0. Os ácidos graxos presentes em maior porcentagem comparado ao Grupo Controle foram C18:1 T10-T11-T12 e C10:1. Os ácidos graxos presentes em menor menor porcentagem comparado ao Grupo Controle foram C15:0 iso, C20:5, C20:3N3, C23:0, C24:0 e C22:5. Conclui-se que, a suplementação com semente de girassol promove modificações no perfil de lipídios endometriais. Mais estudos são necessários para estudar a possibilidade de redução da mortalidade embrionária com tal suplementação. Agradecimentos: FAPESP, FUNDUNESP e Fazenda Santa Encarnação.

SBTE 126 IATF, TETF e IA

Taxa de concepção à IATF de vacas nelore (*Bos indicus*) submetidas ao protocolo de 3 ou 4 manejos com sincrogest® ou CIDR®

Rodolfo Daniel Mingoti[1]; Michele Richeri Bastos[2]; Alessandra Ambrósio Teixeira[2]; Marcus Luciano Guimarães Rezende[2]; Marcio Wasilewski De Castro[3]; Anderson Faquim[3]; Manoel Francisco Sá Filho[1]; Pietro Sampaio Baruselli[1]
1.VRA / FMVZ / USP; 2.Ourofino Agronegócio Ltda; 3.Aliança Assessoria Pecuária.

Palavras-chave: Dispositivo liberação de progesterona; 8 dias vs. 9 dias; manejo

O objetivo do presente estudo foi avaliar a taxa de concepção em vacas multíparas da raça Nelore (*Bos indicus*) utilizando dois dispositivos intravaginais de progesterona (P4) (Sincrogest®; 1,0g de P4 ou CIDR®; 1,9g de P4) utilizando protocolo de sincronização da ovulação com três (Dia 0, Dia 8 e Dia 10) ou quatro (Dia 0, Dia 7, Dia 9 e Dia 11) manejos. Um total de 372 vacas nelores multíparas, provenientes de uma fazenda localizada no município de Aquidauana/MS, foi homogeneamente distribuído de acordo com escore de condição corporal (média de 2,90±0,02) e dias pós-parto (média de 38,8±0,3 dias) no início do protocolo de IATF. No início do protocolo de IATF (Dia 0) os animais receberam tratamento com 2,0 mg de BE IM (Sincrodiol®, Ouro Fino, Brasil) e inserção do dispositivo intravaginal de P4 (SINCROGEST® ou CIDR®). Para evitar manejos adicionais, neste momento, as fêmeas foram separadas conforme o número de manejos (3 vs. 4 manejos). No grupo 3 manejos, no dia 8 foi efetuada a retirada dos dispositivos de P4 (Sincrogest® ou CIDR®), associado ao tratamento com 0,530 mg de cloprostenol sódico (Sincrocio®, Ouro Fino, Brasil), 300UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG; SincroeCG®, Ouro Fino, Brasil) e 1,0 mg de cipionato de estradiol (CE; ECP®, Zoetis, São Paulo, Brasil). A IATF foi 48 h após a remoção do dispositivo de P4. No grupo 4 manejos, no dia 7 foi administrado com 0,530 mg de cloprostenol sódico. No dia 9, realizou-se a retirada dos dispositivos de P4 (Sincrogest® ou CIDR®), associado ao tratamento com 300UI de eCG e 1,0 mg CE. A IATF foi realizada 48 horas após (Dia 11). Após a IATF os grupos de 3 e 4 manejos foram novamente reagrupados até o momento do diagnóstico de gestação realizado por ultrassonografia (Mindray, DP2200vet, São Paulo, Brasil) 30 dias após IATF. Os dados foram analisados utilizando o procedimento GLIMMIX do SAS 9.3. Não houve interação entre dispositivo de P4 e o número de manejos sobre a taxa de concepção [Sincrogest®*3Manejos=50.56% (45/89); CIDR®*3Manejos=54.90% (56/102); Sincrogest®*4Manejos=52.63% (50/95); CIDR®*4Manejos=44.2% (38/86); P=0.41). Ainda, não foram observadas diferenças na taxa de concepção entre os grupos tratados com os diferentes dispositivos de P4 [Sincrogest®=51.63% (95/184) vs. CIDR®=50.00% (94/188); P=0.46], bem como do número de manejos [3 manejos=52.88% (101/191); 4 manejos (48.62% (88/101); P=0.43]. Desta forma, é possível obter semelhantes taxas de concepção à IATF em vacas zebuínas lactantes tratadas com Sincrogest® ou CIDR®, independentemente do número de manejos empregados (3 ou 4 manejos) para a realização da IATF.
Agradecimentos: Aliança Assessoria Pecuária, Fazenda Santa Cristina e Ouro Fino Agronegócio.

SBTE 127 IATF, TETF e IA

Taxa de gestação de fêmeas nelore suplementadas com progesterona oral após a IATF

Marcos Chalhoub; Alessandro Bitencourt Nascimento; Aloisio Bitencourt Nascimento; Marcus Vinícius Galvão Loiola; Alexandra Soares Rodrigues; Priscila Assis Ferraz; Carlos Henrique Calazans Oliveira; Rodrigo Freitas Bittencourt; Alberto Lopes Gusmão; Antonio De Lisboa Ribeiro Filho
Universidade Federal Da Bahia.

Palavras-chave: Ciclicidade; progesterona; fertilidade

Objetivou-se determinar o impacto da suplementação com progesterona oral após a IATF sobre a taxa de gestação de fêmeas bovinas cíclicas e acíclicas da raça Nelore. Para isso, 283 vacas com 35 a 68 dias pós-parto e escore de condição corporal médio de 3,35 (escala de 1 a 5) foram submetidas a dois exames clínico-ginecológicos (intervalo de dez dias) com auxílio da ultrassonografia transretal utilizando-se transdutor linear com frequência de 6,0MHz (Pie-Medical, Falco 100, São Paulo, Brasil), para estimativa do status reprodutivo, sendo considerados em anestro os animais sem a presença de corpo lúteo (CL) nas duas avaliações. Posteriormente, todos os animais foram submetidos ao seguinte protocolo de sincronização: em um dia aleatóriodo ciclo estral (Dia 0) receberam um dispositivo intravaginal de progesterona (P4, CIDR®, Zoetis, São Paulo, Brasil) associado a 2mg de Benzoato de estradiol por via intramuscular (i.m.) (GONADIOL®, Zoetis, São Paulo, Brasil). No dia 8 (D8), foi removido o dispositivo intravaginal de progesterona e administrados 25mg de Dinoprost trometamina i.m. (LUTALYSE®, Zoetis, São Paulo, Brasil), 1mg de Cipionato de Estradiol i.m. (ECP®, Zoetis, São Paulo, Brasil) e 300UI de eCG i.m. (NOVORMON®, Zoetis, São Paulo, Brasil). No Dia 10, todos os animais foram inseminados. No décimo terceiro dia após a IATF, os animais foram uniformemente distribuídos segundo a ciclicidade prévia ao início do protocolo em dois grupos experimentais: C/MGA (n=154) animais suplementados com o acetato de melengestrol (MGA PREMIX®, Zoetis, São Paulo, Brasil), na dose de 2,28g por animal/dia fornecido no cocho junto com o sal mineral por um período de seis dias (entre o décimo terceiro e o décimo oitavo dia após a IATF) e S/MGA (n=129) animais receberam no cocho apenas o sal mineral, sem a suplementação com a P4. O diagnóstico de gestação foi realizado por ultrassonografia transretal 30 dias após as inseminações. Para análise estatística das variáveis, aplicou-se o teste qui-quadrado, utilizando-se o índice de significância de 5% (SPSS – versão 19). Não houve diferença na taxa de gestação entre os grupos C/MGA e S/MGA [52,6 % (81/154) vs. 48,1 % (62/129); P=0,414]. Quando analisado separadamente, de acordo com o status reprodutivo previamente ao protocolo, também não houve diferença entre os grupos: cíclicas C/MGA e S/MGA [58,7 % (27/46) vs. 52,3 % (23/44); P=0,540] e acíclicas C/MGA e S/MGA [50,9 % (55/108) vs. 40,0 % (34/85); P=0,131]. Entretanto, houve um aumento numérico expressivo na taxa de gestação dos animais acíclicos que foram suplementados com P4, quando comparado com o controle. Dessa forma, a suplementação com P4 entre o décimo terceiro e décimo oitavo dia após IATF não interferiu nas taxas de gestação de fêmeas Nelore acíclicas e cíclicas, contudo, faz-se necessário a realização de outros estudos com um maior volume de animais por grupo experimental.

SBTE 128 IATF, TETF e IA

Taxa de prenhez e tamanho de ninhadas de cadelas da raça bulldog inglês inseminadas com sêmen fresco

Gustavo Henrique Marques Araujo[1]; Bruna M. S. Hernandes[2]; Flavio C. Leme[2]; Anelise Carla Camplesi[3]; Carla Fredrichsen Moya-Araujo[4]
1.UFG/REJ; 2.Veterinário Autônomo; 3.FCAV/UNESP; 4.FMVZ/UNESP.

Palavras-chave: Biotécnicas reprodutivas; citologia vaginal; canino

O presente estudo teve por objetivo a avaliação do ciclo estral por meio de citologia vaginal e a inseminação artificial (IA) de cadelas da raça Bulldog com sêmen fresco, além da determinação da taxa de prenhez e o tamanho das ninhadas. Foram utilizadas 16 cadelas da raça Bulldog Inglês, com histórico de boa fertilidade reprodutiva e idade variando de 1,5 a 6 anos. Associada a detecção do proestro (sinais externos: edema vulvar e corrimento sero-sanguinolento) realizou-se a citologia vaginal da fêmea para detecção do estro, bem como a observação do comportamento de aceitação do macho. As inseminações foram realizadas, quando a citologia vaginal apresentava pelo menos 90% de células superficiais, a cada 48 horas até mudança na citologia vaginal para metaestro (aumento no número de células nucleadas) e/ou quando a fêmea deixava de aceitar o macho. Para a colheita do sêmen, empregou-se a manipulação digital, os reprodutores passaram por um exame seminal previamente à IA sendo selecionados os animais com uma motilidade mínima de 70%, vigor 3 e pelo menos $200x10^6$ de espermatozóides. A inseminação foi realizada pela técnica intra-vaginal empregando-se todo ejaculado. O diagnóstico de gestação foi realizado entre os dias 25 a 30 após a última IA, por meio de exame ultrassonográfico percutânio transabdominal, sendo posteriormente feitos periodicamente para a escolha do momento apropriado para a cesariana. O exame da citologia vaginal, associado às características anatômicas e comportamentais, foi eficiente para detectar o estro em 100% das fêmeas. Das 16 fêmeas inseminadas, 87,5% (14/16) ficaram prenhes. As ninhadas tiveram em média 5,6 filhotes, desses 53,1% (42/79) eram machos e 46,8% (37/79) fêmeas. A IA com sêmen fresco proporcionou bons resultados de fertilidade bem como ninhadas grandes para a raça em questão nas presentes condições experimentais.

SBTE 129 IATF, TETF e IA

Taxa de prenhez em novilhas da raça nelore (*Bos taurus indicus*) tratadas com PGF-2α

Evellyn Aryanne Lopes Carvalho; Sebastião Tavares Rolim Filho; Haroldo Francisco Lobato Ribeiro; Keitiane Colares Sousa; Regivany Do Socorro Lima Chaves; Lucas Da Veiga Lima Bastos; Wilson Amaro Moreira Conde Sobrinho
Universidade Federal Rural Da Amazônia (UFRA-Belém).

Palavras-chave: Prostaglandina; inseminação artificial; cio

O objetivo do presente estudo foi avaliar o número de fêmeas prenhas em relação ao total de fêmeas do lote de novilhas da raça Nelore tratadas com PGF-2α. O experimento foi realizado em uma fazenda no município de Paragominas, Pará, nos meses de Julho e Setembro de 2011. Foram utilizadas 694 novilhas com idade média e EPM 24,1±2,0 meses e escore de condição corporal (ECC) médio de 3,5 (escala de 1 a 5), no qual todas passaram por exame ultrassonográfico transretal, modelo CHISON D600VET para avaliação dos ovários. Os animais que possuíam corpo lúteo (n=268) receberam uma dose de 1,5mL (375mg) de prostaglandina (Ciosin®) no dia zero (D0) pela manhã, e foram levadas ao pasto para observação de estro, pela manhã (6 a 7h) e tarde (17 a 18h). Após nove dias (D9) os animais que não apresentaram estro (n=110) receberam uma segunda dose de 1,5mL (375mg) de prostaglandina (Ciosin®), realizada por via intramuscular profunda (IM), e foram novamente levadas ao pasto. Os animais identificados em estro eram inseminados em média 12 horas depois, sendo realizadas inseminações durante manhã (n=124) e tarde (n=144). Foram realizadas inseminações do D2 ao D9 e do D10 ao D16 com o uso de sêmen de dois touros Nelore diferentes e por 6 inseminadores diferentes. O diagnóstico de gestação foi realizado com 35 dias após a última inseminação por meio de ultrassom, modelo Ultrasonic Transducer – Mindray/DP-2200vet. Os dados foram submetidos ao teste estatístico Qui-quadrado com nível de significância de 5%, utilizando software especializado SAS (2010). Foi avaliada a taxa de prenhez total, bem como a taxa de prenhez de acordo com número de aplicações de PGF-2α e período de inseminação (manhã/tarde). A taxa de prenhez total foi de 51,49% (n=138/268) em 16 dias de trabalho. Houve diferença estatística significativa (P<0,05) na taxa de prenhez de acordo com o número de aplicações de PGF-2α, onde apenas uma aplicação de PGF-2α foi suficiente para provocar uma indução de estro em 58,96% (n=158/268) do total de animais e uma consequente gestação de 56,96% (n=90/158) dos animais que receberam apenas uma aplicação e 43,64% (n=48/110) para duas aplicações. A taxa de prenhez em relação ao período da Inseminação foi de 45,16% (n=56/138) nas inseminações realizadas durante a manhã e de 56,94% (n=82/138) durante o período da tarde, sendo observada diferença estatística entre os períodos (P<0,05). Os resultados apresentados demonstram taxa satisfatória no programa de inseminação artificial convencional em novilhas Nelore tratadas apenas com PGF-2α. Conclui-se que uma única aplicação de PGF-2α é eficaz para se obter uma boa taxa de prenhez, onde o melhor índice de prenhez foi obtido nas inseminações realizadas no período da tarde.

SBTE 130 IATF, TETF e IA

Tolerana® aumenta a taxa de concepção em vacas inseminadas

Silvio Merenda Filho[1]; Andre Luis Ramos[1]; Elder Francisco Latorraca[1]; Camilo Del Cistia Andrade[2]; Marcelo Dias Baruffi[2]; Erika Silva Carvalho Morani[1]; Marcelo Roncoletta[1]
1.INPRENHA; 2.FCFRP-USP.

Palavras-chave: Tolerância materno-fetal; fertilidade; iatf

A fertilidade ou eficiência reprodutiva é um dos componentes mais importantes da eficiência em sistemas de produção bovina. O valor econômico relativo da eficiência reprodutiva de fêmeas seria 3,24 vezes maior que das características de consumo, indicando a importância da reprodução na produtividade de um sistema comercial que faz o ciclo de cria (MELTON, 1995). Tolerana® é um produto inovador que visa auxiliar nesse contexto, agindo na mediação de eventos fisiológicos do reconhecimento materno da gestação e da imunotolerância maternal (comunicação entre endométrio e embrião), culminando em prevenção da perda e/ou redução da mortalidade embrionária, que tem trazido aumento considerável sobre a taxa de concepção em fêmeas bovinas. O objetivo do presente trabalho foi comparar a taxa de concepção de vacas inseminadas distribuídas em 02 grupos (T)ratado e (C)ontrole, considerando que a comparação é sempre feita dentro de cada rebanho, dessa forma fatores como raça, score nutricional, protocolo de IATF, não são fatores de influência na taxa de concepção comparativa entre os grupos. Foram trabalhadas vacas de corte da raça Nelore (n=7.000 fêmeas, com score nutricional média de três e período médio de 75 dias pós-parto), distribuídas em 16 rebanhos; e vacas de leite da raça HPB (n=250 vacas HPB de 01 rebanho leiteiro com score nutricional médio de 3 e produção leiteira média de 28kg/dia). O tratamento foi sempre aleatório e sequencial dentro do lote protocolado (uma fêmea é tratada outra não e assim sucessivamente dentro do lote agendado). A estatística baseou-se no TESTE-T, em modelo linear (Prenhe/Vazia) dentro de cada categoria (corte/leite), analisado pelo SAS System versão 6.9. Fatores como raça, rebanho e categoria não foram considerados no modelo estatístico, pois foram fatores fixos no experimento. A dose utilizada de Tolerana® foi de 200µg/animal em uma única aplicação. Produto foi envasado em palheta francesa de 0,25mL. O procedimento de aplicação dependeu da retirada do aplicador do sêmen e na sequência, um segundo aplicador foi introduzido na cérvix para a aplicação da Tolerana® (deposição do produto na luz do útero). Os resultados obtidos até o momento demonstram ganho de 9,4 pontos percentuais no grupo T (gado de corte) e ganho de 11,94 no gado de leite. A taxa de concepção média para os rebanhos de corte foi de 46.2% (no grupo C) e 55,6% no grupo T. Já no rebanho de leite, a taxa de concepção média foi de 22% (grupo C) e 33,94% no grupo T. Outros delineamentos experimentais continuam em andamento, visando máxima otimização do produto, que ainda esta em fase experimental e registro junto ao MAPA, não possuindo portanto, informações de custo de aquisição, mas os dados obtidos até o presente momento já sinalizam um enorme potencial do produto, cujo impacto na eficiência reprodutiva dos rebanhos reduzirá drasticamente custos de produção e de aplicação da IATF, e ainda no progresso genético dos rebanhos.
Apoio: FAPESP/PIPE e CNPq/RHAE.

SBTE 131 IATF, TETF e IA

Transferência intrafolicular de ovócitos imaturos: uma alternativa para a multiplicação de fêmeas bovinas

José Felipe Warmling Sprícigo[1]; Severino Bernardino Sena Netto[1]; Luiz Manoel Souza Simoes[2]; Ligiane Oliveira Leme[1]; Ana Luiza Silva Guimarães[1]; Ivo Pivato[1]; Margot Alves Nunes Dode[3]
1.Universidade De Brasília; 2.Universidade Federal De Lavras; 3.EMBRAPA- Recursos Genéticos E Biotecnologia.

Palavras-chave: Injeção ovocitária; embriões; bovino

A produção *in vivo* de embriões por superovulação (SOV) ou produção *in vitro* de embriões (PIVE) são as opções disponíveis para a multiplicação rápida de germoplasma feminino. Apesar da SOV, produzir um embrião de melhor qualidade, tem de se respeitar um intervalo entre seguidos protocolos de superovulação, pois a utilização do FSH altera os padrões fisiológicos da dinâmica folicular, diminuindo os resultados nas superovulações subsequentes. Enquanto que na PIVE, a doadora pode ser submetida a OPU toda semana, porém, os embriões produzidos são de qualidade inferior. A utilização de uma técnica que associe as vantagens da OPU com as da produção *in vivo* de embriões seria a opção ideal para a multiplicação animal. Uma técnica que atende esses requisitos é transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI), em que ovócitos obtidos por OPU de uma doadora, são injetados no folículo dominante, de uma receptora sincronizada. O objetivo deste experimento foi avaliar a produção de embriões após TIFOI. Foram utilizadas 12 novilhas Nelore, previamente sincronizadas. No D-10 foi inserido o implante de P4 (Primer®) junto a aplicação de 2 ml de benzoato de estradiol (Ric-BE®), no D-2 foi retirado a P4 e aplicado 2 ml de prostaglandina (Veteglan®), no D -1, 2 ml de BE e no dia 0 observado o cio. A injeção dos ovócitos foi realizada no folículo dominante, 58 horas após a retirada da P4, ainda durante o cio. A média do diâmetro dos folículos utilizados foi de 14±1.7 mm. Foi utilizado uma guia de OPU (WTA), com uma probe de ultrassom de 7,5 mHz (Aloka®), além de um sistema de aspiração modificado. O sistema foi preenchido com liquido folicular, onde uma agulha 27G foi acoplada. Ovócitos de graus 1 e 2 foram obtidos por punção de ovários de abatedouro. Após a seleção, 25 ovócitos foram alocados na agulha com aproximadamente 80 µL de liquido folicular. Uma seringa de insulina na outra extremidade do sistema serviu para injeção dos ovócitos. Uma única dose de sêmen foi utilizada para inseminação artificial (IA), realizada 6 horas após a TIFOI. A coleta de embriões por lavagem uterina foi realizada 7 dias após. Foram avaliadas as taxas de recuperação e viabilidade embrionária. Antes da coleta, os animais tiveram os ovários avaliados para a mensuração dos CL e para confirmar se a ovulação ocorreu no ovário em que foi realizado a TIFOI. O diâmetro médio dos CL foi de 20±2.3mm. Foram confirmados CL no mesmo ovário da TIFOI em 9 animais (75%). A média de estruturas em D7 foi 3.7±2.3, por animal, correspondente a 15% do total de ovócitos injetados. Do total de estruturas, 58% eram embriões viáveis (Mc, Bi, Bl ou Bx), uma média de 2,2±1.9 embrião por animal. Apesar da baixa eficiência, a TIFOI é uma alternativa menos onerosa, para multiplicação de fêmeas bovinas, e permite a produção de embriões de melhor qualidade. Além disso, é um modelo *in vivo* interessante, para pesquisas na área da embriologia.

SBTE 132 IATF, TETF e IA

Tratamento com melatonina ou progesterona em búfalas lactantes durante o anestro estacional

Nelcio Antonio Tonizza De Carvalho[1]; Diego Cavalcante De Souza[2]; Manoel Francisco Sá Filho[3]; Julia Gleyci Soares[3]; Ed Hoffmann Madureira[3]; Sarvpreet Singh Ghuman[4]; Pietro Sampaio Baruselli[3]
1.APTA; 2.CATI; 3.FMVZ-USP; 4.GADVASU.

Palavras-chave: Anestro estacional; implante de melatonina; progesterona

Avaliou-se o efeitodo tratamento com implantes subcutâneos de melatonina (MEL) ou com dispositivo intravaginal de progesterona (P4) na indução da ovulação e na prenhez de búfalas em anestro estacional (primavera e verão) submetidas ao protocolo Ovsynch. No início do experimento (D -20), 139 búfalas em anestro foram divididas de acordo com o escore de condição corporal, paridade, dias pós-parto e diâmetro do maior folículo ovariano (FL) em 3 grupos: Controle (GC, n=46), Progesterona (GP4, n=47) e Melatonina (GM, n=46). Neste dia, em cada búfalas do GM foram inseridos doze implantes de MEL (216mg; Regulin®, Ceva Saúde Animal, Reino Unido). Após 20 dias (D0), todas as fêmeas receberam 10µg im (intramuscular) de GnRH (Acetato de buserelina, Prorelinn®, Innovare Biotecnologia e Saúde Animal, Brasil) e, nas búfalas do GP4, foi inserido um dispositivo intravaginal de P4 (1g, Cronipres®, Biógenesis-Bagó Saúde Animal, Brasil), que permaneceu por 7 dias. No D7, todas as fêmeas receberam 150µg im de PGF2α (D-Cloprostenol, Croniben®, Biógenesis-Bagó). Dois dias após (D9), as búfalas receberam 10µg im de GnRH (Prorelinn®) e, 16h mais tarde (D10), foram submetidas à IATF. Decorridos dez dias (D20), as fêmeas foram submetidas à monta natural, para a cobertura no retorno ao estro. Todas as búfalas foram avaliadas por ultrassonografia (Mindray DP2200Vet, China) no D -20 para verificar a presença de corpo lúteo (CL), no D0 e no D9 para mensurar o diâmetro do FL, no D7 para aferir a taxa de ovulação ao 1oGnRH (Tx-ov), no D20 para avaliar a porcentagem e o diâmetro do CL, no D30 para o diagnóstico de gestação e no D60 para quantificar as perdas gestacionais (PdG) e a taxa de prenhez por monta natural (PrM). A análise estatística foi realizada pelo procedimento GLIMMIX do SAS®. Não houve diferença entre os grupos experimentais (GC vs. GP4 vs. GM) para as variáveis analisadas, respectivamente: FL no D0 (11,5±0,3 vs. 12,0±0,3 vs. 11,4±0,3 mm; P=0,37), Tx-ov (45,6 vs. 38,3 vs. 39,1 %; P=0,67), FL no D9 (12,9±0,5 vs.12,9±0,4 vs. 12,8±0,5 mm; P=0,88), PdG (0,0 vs. 12,9 vs. 16,7 %; P=0,40) e PrM (28,6 vs. 12,5 vs. 36,6 %; P=0,37). O GP4 apresentou maiores diâmetro do CL no D20 e taxa de prenhez à IATF que o GC e o GM (19,2±0,5 vs.16,2±0,8 vs. 16,6±0,6 mm e 66,0 vs. 8,7 vs. 13,0 %; P<0,01); maiores porcentagem de CL no D20 e de prenhez acumulada (IATF+PrM) que o GC e semelhante ao GM (83,0a vs. 54,4b vs. 71,4ab % e 61,7a vs. 34,8b vs. 41,3ab %, P<0,03) e menos dias em aberto que o GC e o GM (18,5±1,5 vs. 36,1±1,3 vs. 34,2±1,5 dias; P<0,01). Conclui-se que o tratamento com P4 associado ao protocolo Ovsynch promove melhores resultados em relação a associação com MEL em termos de diâmetro de CL e taxa de prenhez, reduzindo os dias em aberto no período de cobertura de búfalas em lactação durante o anestro estacional.

SBTE 133 IATF, TETF e IA

Tratamento com prostaglandina no início do protocolo em vacas de corte com cl aumenta a taxa de concepção após a IATF

Antonio Francisco Chaves Neto[1]; João Guilherme Sartori[2]; Roney Santos Ramos[3]; Michele Richeri Bastos[3]; Marcus Luciano Guimarães Rezende[3]; Lais Mendes Vieira[4]; Pietro Sampaio Baruselli[4]
1.Mamelle Serviços Agropecuários; 2.UNOPAR; 3.Ourofino Saúde Animal; 4.FMVZ / USP.

Palavras-chave: Prostaglandina; iatf; corpo luteo

Em bovinos de corte as concentrações de progesterona (P4) antes do proestro estão associadas com o tamanho do folículo pré-ovulatório que por sua vez está associado com a fertilidade. Desta forma, estratégias que manipulam as concentrações de P4 durante o protocolo de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) poderiam ser úteis para melhorar os resultados de programas de IATF em operações comerciais. Uma simples forma de fazer isto é adicionar uma aplicação de prostaglandina (PGF) no início do protocolo de IATF (momento da inserção do dispositivo de P4) de vacas cíclicas. Assim, este trabalho objetivou comparar a taxa de concepção aos 30 dias (TC) de vacas de corte após IATF com ou sem corpo lúteo (CL) no início do protocolo. Em um dia aleatório do ciclo estral (D0) um total de 3.134 vacas de corte (Exp. 1, 10 fazendas diferentes, 1.001 vacas com CL e 2.133 vacas sem CL) receberam um dispositivo intravaginal de P4 (Sincrogest®, Ourofino Saúde Animal) e 2 mg i.m. de benzoato de estradiol (Sincrodiol®, Ourofino Saúde Animal). No dia 8, o dispositivo de P4 foi removido e as vacas receberam 500 ug i.m. de cloprostenol sódico (Sincrocio®, Ourofino Saúde Animal), 1 mg i.m. de cipionato de estradiol (SincroCP®, Ourofino Saúde Animal) e 300 UI i.m. de eCG (SincroeCG®, Ourofino Saúde Animal). IATF foi realizada no dia 10. No Exp. 2, 3.802 vacas (14 fazendas diferentes, 1.374 vacas com CL e 2.428 vacas sem CL) receberam o mesmo protocolo previamente descrito. Entretanto, uma dose de 500 ug i.m. de cloprostenol sódico (Sincrocio®, Ourofino Saúde Animal) foi adicionada no Dia 0 nas vacas que apresentaram um CL no início do protocolo. A análise estatística foi realizada pelo PROC GLIMMIX (SAS). No Exp. 1 não houve diferença (P=0,08) na TC entre vacas com (48%; N=1.001) ou sem CL (51.3%; N=2.133). Por outro lado, no Exp. 2 (PGF no Dia 0 nas vacas com CL) o grupo de vacas com CL no Dia 0 apresentaram maior TC (55,5% [N=1.374] vs. 52,1% [N=2.428], P=0,05). Não foi detectado efeito de fazenda. Em conclusão, semelhantes TC foram observadas entre vacas com ou sem CL no início do protocolo quando a PGF não foi aplicada no D0. Ainda, a adição de uma dose de PGF no início do protocolo em vacas com CL aumentou a TC em relação ao outro grupo experimental.

SBTE 134 IATF, TETF e IA

Tratamento de infecções puerperais em vacas leiteiras com antibióticos

Jairo Pereira Neves; Moises Soares; André Oliveira Andrade; Marilú Martins Gioso; Ana Cristina Silva De Figueiredo; Carlos Antônio De Carvalho Fernandes
UNIFENAS.

Palavras-chave: Antibioticoterapia; cefquinoma; cloprostenol sódico

As infecções uterinas estão entre as principais causas de redução de fertilidade em vacas leiteiras. Objetivou-se avaliar, a eficácia de dois antibióticos, associados ou não ao cloprostenol sódico no tratamento de infecções puerperais em vacas leiteiras. Os animais foram distribuídos de forma homogênea de acordo com ordem de partos e escore de condição corporal e submetidos aos tratamentos, todos aplicados via intramuscular: T1 (n=25): cefquinoma (Cobactan® – MSD, Brasil), 1ml/25kg PV – 1x dia, durante 3 dias, T2 (n=25): cefquinoma 1ml/25kg PV – 1x dia, durante 3 dias, acrescido de 0,5mg de cloprostenol sódico (Ciosin® – MSD, Brasil) no 1º e 3º dia de tratamento, T3 (n=25): cloridrato de oxitetraciclina (Terramicina LA®, Zoetis, Brasil) durante dois dias com intervalo de 48h e T4 (n=25) oxitetraciclina durante dois dias com intervalo de 48h, acrescido de 0,5mg de Cloprostenol no 1º e 3º dia de tratamento. Os animais foram reavaliados entre a 3ª e 5ª semanas pós-parto, por palpação transretal, ultrassonografia e vaginoscopia, para avaliar a presença e grau da infecção uterina. Avaliou-se a ocorrência de infecção uterina entre a 3ª e 5ª semana pós-parto, a taxa de concepção à 1ª inseminação, o número de animais gestantes até os 250 dias pós-parto, o número médio de serviços/concepções, o intervalo parto 1ª IA e período de serviços. As variáveis foram avaliadas num esquema fatorial 2x2. Foram consideradas significativas diferenças inferiores a 5% de probabilidade. Não houve interação entre os fatores. O % de infecção entre a 3º e 5ª semana foi de 36,0 a; 24,0a; 64,0b e 48,0%ab. A taxa de concepção à 1ª IA foi de 24,0; 32,0; 16,0 e 20,0 (P>0,05). O % de animais gestantes até os 250 dias pós-parto foi de 76,0bc; 88,0c; 56,0a e 68,0ab%. O intervalo parto a 1ª IA foi de 67,7+18,6b; 53,2+13,8a; 74,0+22,7c e 64,7+15,1b dias. O número de serviços/concepção foi de 3,2 + 1,8; 2,9 + 1,5; 3,5 + 2,0 e 3,3 + 1,9 (P>0,05) e o período de serviços foi de 158,5+86,4b; 144,6 + 72,0a; 179,8+96,2c e 161,3 + 81,2b dias, para T1, T2, T3 e T4 respectivamente. Para um mesmo antibiótico a associação com o cloprostenol melhorou o período de serviços (P>0,05). Conclui-se que a cefquinoma é mais eficiente que a oxitetraciclina no tratamento de infecções uterinas puerperais em vacas leiteiras. A associação dos antibióticos com um análogo da protaglandina melhora o desempenho reprodutivo dos animais.
Agradecimentos: Fapemig, Capes e CNPq.

SBTE 135 IATF, TETF e IA

Uso de vacinas bioabortogen h® e bioleptogen® como estratégia para reduzir a perda gestacional entre 30 e 60 dias em novilhas de corte

Talita Lara Conti[1]; Lucas De Araújo Souto[2]; José Nélio De Sousa Sales[3]; Pietro Sampaio Baruselli[4]; Roberta Machado Ferreira[5]
1.Centro Universitário Anhanguera; 2.Biogénesis Bagó Saúde Animal Ltda; 3.Departamento De Medicina Veterinária Da Ufla; 4.Departamento De Reprodução Animal Da FMVZ-USP; 5.Departamento De Medicina Veterinaria Da FZEA-USP.

Palavras-chave: Aborto; eficiência reprodutiva; imunização

O objetivo do estudo foi avaliar o efeito do uso das vacinas reprodutivas Bioabortogen H® e Bioleptogen® (proteção contra IBR, BVD e leptospirose) previamente (D-40 e D0) ou durante e após o protocolo de IATF (D0 e D40) de novilhas de corte sobre as taxas de concepção 30 e 60d após a IA e a perda gestacional neste período. O estudo foi conduzido na Fazenda Vera Cruz IV, Barra do Garças – MT. Novilhas (n=700) de 15-24m foram avaliadas por ultrassonografia e as consideradas pré-púberes (útero infantil e ausência de CL) foram submetidas à indução de ciclicidade 40d antes do protocolo de IATF [D-40: inserção de dispositivo com 0,558g de P4 (Cronipres Mono Dose®, Biogénesis Bagó, Brasil) previamente usado por 8d; D-30: remoção do dispositivo e 1 mg de benzoato de estradiol (BE; Bioestrogen®, Biogénesis Bagó, Brasil) i.m.]. Nesse dia, tanto novilhas cíclicas quanto não cíclicas foram homogeneamente distribuídas (ciclicidade, ECC e peso) para receber (VacAntes) ou não (VacD0 e controle) a primeira dose das vacinas Bioabortogen H® e Bioleptogen® (5 mL SC de cada, Biogénesis Bagó, Brasil). Novilhas VacAntes receberam dose reforço de ambas as vacinas no D0, início do protocolo de IATF. Novilhas VacD0 receberam a primeira dose no D0 e o reforço no D40, dia do diagnóstico de gestação 30d após a IATF. Novilhas controle não receberam vacinação. Todas as novilhas foram reavaliadas no D0 e somente as púberes (n=619) seguiram no estudo. O protocolo de IATF consistiu na inserção de um dispositivo intravaginal com 0,558g de P4 e 2 mg de BE IM no D0; retirada do dispositivo e administração de 0,150 mg de D-Cloprostenol (Croniben®, Biogénesis Bagó, Brasil) IM e 300 UI de eCG (Novormon®, MSD, Brasil) IM no D8; administração de 1mg de BE IM 24h após (D9) e IATF 48h após a remoção do dispositivo. O diagnóstico de gestação foi feito 30 e 60d após a IATF por ultrassonografia (Mindray DP2200VET. A análise dos dados foi feita por regressão logística (PROC GLIMMIX do SAS). Semelhantes médias de ECC (P=0,97) e peso (P=0,48) foram observadas para novilhas dos grupos controle (3,02±0,02 e 297,6±3,1), VacAntes (3,02±0,01 e 301,4±3,3) e VacD0 (3,02±0,02 e 299,4±4,3), demonstrando a homogeneidade entre os grupos. Não foi observada diferença na taxa de prenhez aos 30 [(controle: 37,0% (71/192), VacAntes: 40,5% (90/222) e VacD0: 35,1% (72/205); P=0,55] e 60 dias pós-IATF [(controle: 33,3% (64/192), VacAntes: 40,1% (89/222) e VacD0: 34,2% (70/205); P=0,33]. No entanto, a perda gestacional entre 30 e 60d de gestação foi inferior nas novilhas do grupo VacAntes [1,1%b (1/90)] comparada as controle [9,9% (7/71)a] e similar as VacD0 [2,8% (2/72)ab; P=0,05]. Portanto, apesar do uso das vacinas Bioabortogen H® e Bioleptogen® não interferir na taxa de prenhez aos 30 e 60d após a IATF, seu uso foi eficaz para diminuir a perda gestacional durante este período, especialmente quando utilizadas previamente à IATF. Agradecimentos: Faz. Vera Cruz IV, FAPESP 2012/07510-1, CNPq 486089/2013-4.

SBTE 136 IATF, TETF e IA

Utilização de duas doses de cloprostenol em diferentes intervalos na sincronização do estro em ovelhas da raça santa inês

Sheylla Foligno De Carvalho Menezes De Almeida[1]; Jeferson Ferreira Da Fonseca[2]; Mário Felipe Alvarez Balaro[1]; José Gabriel De Almeida[1]; Pedro Henrique Nicolau Pinto[1]; Ana Beatriz Moura[1]; Rômulo Mendonça Da Rosa[1]; Felipe Zandonadi Brandao[1]
1.Universidade Federal Fluminense; 2.EMBRAPA Caprinos E Ovinos, Núcleo Regional Sudeste.

Palavras-chave: Ovino; prostaglandina; ovulaçao

O objetivo deste estudo foi comparar protocolos de sincronização do estro, utilizando duas doses de cloprostenol em diferentes intervalos, durante o mês de março, dentro da estação reprodutiva, em ovelhas da raça Santa Inês, no município de Cachoeiras de Macacu-RJ. Um total de 30 ovelhas (43,9±6,4 kg; 2,9±0,3 ECC e 3,4±1,6 anos de idade), desmamadas há pelo menos três meses, foram divididas equitativamente, em três tratamentos, com intervalos de: 11,5 dias (G11,5: n=10), 9 dias (G9: n=10) ou 7 dias (G7: n=10). A dose utilizada, por aplicação, foi de 37.5 µg de cloprostenol (Estron®, Agener União, São Paulo, Brasil) por via intramuscular. Avaliações ultrassonográficas foram realizadas pela via transretal (modo-B, SonoScape®, Shenzhen, China) para acompanhamento da dinâmica folicular e luteal, diariamente a partir de 5 d antes da primeira dose, e a cada 12 h após ambas aplicações, novamente por 5 d, ou até a ocorrência da ovulação. Para a detecção do estro, as fêmeas foram rufiadas, individualmente, a cada 12 h, após cada aplicação, por no máximo 5 d com duração de 5 min por animal. As variáveis quantitativas normais foram submetidas à ANOVA seguida pelo teste de Tukey (P<0,05). Os dados relativos a taxa de ovelhas em estro (%) foram avaliados pelo teste Exato de Fisher (P<0,05). O percentual de animais em estro após a primeira dose não diferiu (P> 0,05) entre os grupos: G11,5 – 60% (6/10); G9 – 80% (8/10) e G7: 80% (8/10) assim como a duração do estro (G11,5: 24,0±13,1 h; G9: 37,5±7,7h e G7: 28,5±11,0h. Após a segunda dose, as taxas de apresentação do estro e de duração do estro também não diferiram (P>0,05) entre os grupos, respectivamente: G11,5 – 90% (9/10) e 29,3±12,2 h; G9 – 100% (10/10) e 36,0±10,4 h; e G7 – 80% (8/10) e 31,5±8,9 h. Não houve diferença estatística (P>0,05) nos intervalos da segunda dose ao início do estro, fim do estro, e do estro à ovulação entre G11,5 (48,5±8,9 h; 80,0±8,5 h; 35,0±20,1 h), G9 (50,3±13,1 h; 83,0±9,1 h; 25,5±12,2 h) e G7 (36,5±6,2 h; 68,0±14,0 h e 20,3±6,1 h). O intervalo da aplicação da segunda dose à ovulação diferiu (P<0,05) entre os grupos G11,5 (78,7±9,4 h) e G7 (56,8±6,2 h). O G9, por sua vez, foi similar (P>0,05) a ambos (75,5±8,3 h). O G7 antecipou a ovulação e apresentou menor desvio padrão (P<0,05). É provável que os animais do G7 estivessem próximos do período de dominância folicular, ou que já estivessem com os folículos dominantes, enquanto G11,5 e G9 poderiam estar ainda no início da onda folicular. Os três protocolos foram eficientes para a sincronização de estro em ovelhas da raça Santa Inês.

SBTE 137 IATF, TETF e IA

Vetscore: novo método para avaliação nutricional e seleção de vacas de corte para IATF

Luiz Francisco Machado Pfeifer[1]; Natália Castro[2]; Jamyle Cestaro[3]; Vitor Torres Melo[3]; Paulo Neves[3]
1.EMBRAPA; 2.UFPEL; 3.FIMCA.

Palavras-chave: Condição corporal; iatf; vacas

O potencial reprodutivo de vacas de corte lactantes está diretamente ligado ao seu estado nutricional. Fêmeas com adequado escore de condição corporal (ECC) no momento da inseminação artificial em tempo-fixo (IATF) apresentam maior taxa de prenhez do que fêmeas com baixo ECC. Apesar dos benefícios que a avaliação do ECC pode representar para selecionar fêmeas para IATF, o principal método de avaliação ainda é visual e, portanto, subjetivo. Desta forma, os objetivos deste estudo foram: 1) avaliar a relação entre o ângulo da garupa e o ECC, e 2) desenvolver uma ferramenta objetiva para selecionar vacas para IATF de acordo com a condição nutricional. No Experimento 1, foram utilizadas 801 vacas Nelore lactantes, entre 3 e 12 anos de idade e 400 - 625 Kg de peso-vivo. Todos os animais foram avaliados quanto ao ECC (escala de 1 a 5; 1=emaciada e 5=obesa; Ferguson et al., J Dairy Sci, v.77, p.2695-2703, 1994). Além disso, foi realizada a aferição do ângulo entre os lados da garupa de todas as vacas através de um aparelho chamado goniômetro. Todas as análises estatísticas foram realizadas no pacote estatístico do SAS 9.0. A relação entre o ECC e mensurações do ângulo da garupa foi analisada utilizando modelos de regressão. Os resultados demonstraram que há uma correlação positiva entre o ângulo da garupa e o ECC (P<0,0001) e a equação de regressão linear observada foi Ângulo=79,78 + 9,53 x ECC; R2=0,54. A partir dos resultados do Experimento 1, um dispositivo que visa avaliar a condição nutricional de forma simples, direta e objetiva foi desenvolvido para utilização no Experimento 2. Este aparelho, chamado Vetscore (registro INPI 1020140049916), avalia o ECC a partir do ângulo da garupa da vaca, de forma que classifica os animais em 3 condições nutricionais distintas, sendo elas: Vermelho, vacas com ECC < 2,75; Verde, vacas com ECC entre 2,75 e 4,25; e Amarelo, vacas com ECC > 4,25. Neste estudo 354 vacas Nelore multíparas lactantes, entre 4 e 8 anos de idade, foram submetidas a um protocolo de IATF (2 mg BE + CIDR no D0 / 2 mL PGF + 300 UI eCG + 1 mg ECP – CIDR no D8 / IATF 48 h). No D0 todas as vacas foram avaliadas com o Vetscore e classificadas segundo sua escala nutricional. Trinta dias após a IATF todas as vacas foram avaliadas por ultrassom para detecção da prenhez. A taxa de prenhez foi comparada entre os grupos através do teste do qui-quadrado. O Vetscore apresentou uma precisão de 80% e vacas classificadas como Verde tiveram maior taxa de prenhez do que as demais classificações (P<0.01). As taxas de prenhez de acordo com a classificação do Vetscore foram 38,6% (51/132), 56,74% (122/215), e 28,6% (2/7), para as classificações Vermelha, Verde e Amarela, respectivamente. A nova metodologia de avaliação de condição corporal de bovinos demonstrou ser um método eficaz para selecionar fêmeas mais adequadas a IATF e que poderá ser facilmente aplicado aos sistemas de produção de bovinos.

SBTE 138 OPU-FIV e TE

A progesterona injetável longa ação interfere na quantidade e qualidade oocitária e na produção de embriões *in vitro* em novilhas nelore pré-púberes

Rafael Rodrigues Corrêa[1]; Anelise Ribeiro Peres[1]; Jose Ricardo Garla Maio[2]; Joaquim Mansano Garcia[1]; Aderson Mauricio Ifran[1]; Ricardo Perecin Nociti[1]
1.UNESP Jaboticabal; 2.Ourofino Agronegócio.

Palavras-chave: Bovino; oócitos; puberdade

A progesterona e seus análogos têm sido utilizados para diversas finalidades na reprodução animal, a P4 permite que o folículo seja exposto por um maior período a pequenos pulsos de LH podendo melhorar a qualidade oocitária e consequentemente a produção de embriões. O objetivo deste estudo foi avaliar a influencia da progesterona injetável no número de oócitos recuperados, na qualidade oocitária e produção embrionária de novilhas Nelore pré-púberes. Foram utilizadas 31 fêmeas com idade entre 16 a 18 meses, não gestantes e sem presença de corpo lúteo (CL). As doadoras de oócitos foram divididas em 3 grupos experimentais em delineamento crossover da seguinte maneira: Grupo (P0, n=11), os animais deste grupo receberam duas aplicações de solução placebo (1 mL), com intervalo de 7 dias iniciando 14 dias (d-14) antes da primeira aspiração (d-0); Grupo (P7, n=10): os animais receberam uma aplicação de solução placebo (1 mL) 14 dias (d-14) e uma de progesterona (P4) injetável (150mg) 7 dias (d-7) antes da aspiração; Grupo (P7-14, n=10), neste grupo os animais receberam duas aplicações de P4 injetável (150mg) com intervalo de 7 dias, a primeira 14 dias (d-14) e a segunda 7 (d-7) dias antes da aspiração. Realizaram-se um total de três aspirações foliculares em intervalos de 28 dias e a partir da primeira aspiração os grupos foram subdividos para que todos os animais passassem por todos os tratamentos. Os oócitos recuperados foram selecionados e submetidos aos procedimentos da PIVE. Após a confirmação da homocedasticidade (BoxCox) e normalidade (teste de Cramér–von Mises) dos dados, realizou-se a análise de variância (ANOVA). O teste de Tukey foi utilizado para as comparações das médias das variáveis, para as correlações dos dados foi utilizado o teste de correlação de Pearson, considerados significantes quando $p \leq 0,05$. Não foram verificadas diferenças significativas ($p>0,05$) quanto ao número de oócitos recuperados (oócitos totais), oócitos viáveis (G I, II, III), entre os animais tratados (grupos P7 e P14-7) em relação aos animais que não receberam P4 (grupo P0). As doadoras apresentaram média de 14,98 ± 10,82 oócitos coletados por sessão de aspiração. As médias e desvio padrão das taxas (%) de oócitos viáveis e de embriões produzidos não diferiram ($p>0,05$) entre os grupos. Os grupos P0, P7, P14-7 obtiveram uma taxa de 76%, 80% e 68% de oócitos viáveis, e taxas de embriões produzidos de 36%, 42% e 43% respectivamente. Os grupos P0, P7 e P14-7 obtiveram uma média de 4,04, 5,03 e 4,43 embriões produzidos por sessão de aspiração. A utilização do tratamento com progesterona não melhorou as variáveis oocitárias e embrionárias analisadas.

SBTE 139 OPU-FIV e TE

Produção *in vitro* de embriões bovinos e bubalinos com adição do óleo essencial lippia origanoides no meio de maturação

Emílio César Martins Pereira[1]; Eunice Oba[1]; Álan Maia Borges[2]; Moysés Dos Santos Miranda[3]; Virgílio Barbosa Andrade[2]; Joyce Kelly Do Rosario Da Silva[3]; João Gabriel Viana De Grázia[2]; Marcus Vinicius Prado Silva[2]
1.UNESP/BOTUCATU; 2.UFMG; 3.UFPA.

Palavras-chave: Antioxidante; produção *in vitro* de embriões; búfalo

A utilização da produção *in vitro* de embriões (PIVE) tem crescido rapidamente nos últimos anos, no entanto, a eficiência do processo é baixa e os índices insatisfatórios. Acredita-se que diversos fatores podem influenciar neste processo, dentre eles, as espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas em razão das condições artificiais de maturação e cultivo. Assim, antioxidantes tem sido incorporado nos meios de MIV e CIV na tentativa de reduzir a formação de EROS e melhorar as taxas de produção final de embriões. Um potente antioxidante natural já utilizado em cultivos celulares, que tem como princípio ativo o carvacrol e timol, extraído da planta Lippia origanoides, representa um potencial promissor a ser utilizada no cultivo embrionário (Vicuña, et al., Fitoterapia, v. 81, p.343-349, 2010). Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da suplementação do meio MIV de bubalinos e bovinos com óleo essencial de Lippia origanoides (OELO) em diferentes concentrações. Foram utilizados para maturação 2052 oócitos bovinos e 1026 oócitos bubalinos recuperados de ovários oriundo de matadouro, divididos em 5 tratamentos constituídos de: T1 (Meio Base (MB): TCM 199 + 10% SFB + 22µg/mL Piruvato + 5UI/mL LH + 0,05µg/mL FSH + 1µg/mL Estradiol + 83,4 µg/mL de Amicacina), T2 (MB + 50 µM/mL de cisteamina), T3 (MB + 2,5µg/mL de OELO), T4 (MB + 5 µg/mL de OELO) e T5 (MB + 10 µg/mL de OELO). Os reagentes utilizados foram adquiridos na Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA. Os oócitos foram maturados à 5%CO2, 38,5ºC por 24 horas. A FIV ocorreu por um período de 18-20 horas e em seguida os zigotos foram desnudados e cultivados em meio SOF + 2,5% SFB por 7 dias. Foi avaliada a taxa de clivagem após 48 horas de cultivo e a produção de blastocistos nos dias 7 e 8. Para análise estatística foi utilizado a ANOVA com nível de significância de 5%. A taxa de clivagem (média ± erro padrão) não diferiu (P>0,05) entre os tratamentos para bubalinos (39,87±5,54; 35,64±5,60; 44,16±17,04; 45,19±5,56 e 43,57±6,86; respectivamente para os tratamentos T1, T2, T3, T4 e T5). Já a taxa de produção de blastocistos para bubalinos também foi semelhante entre os tratamentos e os valores foram 30,21±6,49; 19,52±5,92; 27,56±5,11; 32,87±6,49 e 23,35±4,77, para os tratamentos T1, T2, T3, T4 e T5 (p>0,05), respectivamente. Para bovinos as taxas de clivagem encontradas não diferiram entre os tratamentos e foram de 64,06±3,98; 62,65±3,59; 64,72±4,04; 53,32±3,84 e 65,51±4,90, para os tratamentos T1, T2, T3, T4 e T5 (p>0,05), respectivamente. A taxa de blastocistos para bovinos também não diferiu entre os tratamentos e foi 27,25±2,98; 26,82±3,94; 24,97±3,52; 23,36±2,57 e 27,14±2,87, para T1, T2, T3, T4 e T5 (p>0,05), respectivamente. O uso do óleo essencial de Lippia origanoides não alterou a capacidade de clivagem e desenvolvimento dos embriões bovinos e bubalinos produzidos *in vitro*.
Apoio Financeiro-CAPES 096/10.

SBTE 140 OPU-FIV e TE

Avaliação da produção *in vitro* de embriões de acordo com a ciclicidade de vacas nelore (*Bos indicus*) submetidas a aspirações foliculares em diferentes momentos do pós-parto

Júlia Cestari Pierucci[1]; Cecilia Rodrigues Alves Silveira[1]; Gustavo Luís Dos Santos[2]; Walt Yamazaki[2]; Luciana Terumi Sanomiya Yamazaki[2]; Erika Aline Ribeiro Dias[3]; Claudia Cristina Paz[3]; Fabio Morato Monteiro[3]; Pietro Sampaio Baruselli[4]; Lindsay Unno Gimenes[1]
1.FCAV - UNESP; 2.BIOEMBRYO; 3.Instituto De Zootecnia; 4.FMVZ-USP.

Palavras-chave: Corpo lúteo; ovum pick up; pós-parto

No presente estudo objetivou-se avaliar o efeito dos dias pós-parto e da ciclicidade aos 45 dias pós-parto na produção *in vitro* de embriões. Foram utilizadas 17 vacas Nelore, sem alterações no parto ou puerpério, mantidas com os bezerros durante todo período experimental. As fêmeas foram submetidas a aspirações foliculares (OPU; 20G; 90 mmHg; ALOKA SSDV 500), nos seguintes momentos pós-parto: T1- 11,5 dias; T2- 25,5 dias; T3- 39,5 dias; T4-53,5 dias; T5- 66,8 dias e T6- 81,4 dias. As médias (± EPM) de escore de condição corporal (1-5) dos animais durante os momentos foram: T1: 2,72±0,04; T2: 2,82±0,04; T3: 2,82±0,04; T4: 2,83±0,05; T5: 2,84±0,04 e T6: 2,88±0,06. Imediatamente antes da OPU, todos os folículos visíveis (≥2mm) foram quantificados e classificados de acordo com o diâmetro [folículos pequenos (FP≤6mm), folículos médios (FM=6 a 10mm) e folículos grandes (FG≥10mm)]. As variáveis foram analisadas no PROC GLIMMIX (SAS 9.2®). Foram analisados os efeitos de ciclicidade [presença (C) ou ausência (NC) de corpo lúteo] aos 45 dias, dias pós-parto e a interação entre esses fatores. Não houve interação para nenhuma das variáveis analisadas. A ciclicidade não influenciou o número de folículos aspirados (NC:38,3±3,2; C:44,5±2,9; P=0,35), a taxa de clivagem (NC=56,7% e C=60,0%; P=0,30) e a taxa de blastocistos (NC=30,2% e C=34,3%; P=0,37). Quanto ao período pós-parto, observou-se maior número de folículos aspirados quando os animais foram submetidos à OPU 81,4 dias após o parto em relação aos momentos anteriores (T1:36,8±4,9c; T2:35,9±5,0c; T3:37,8±4,5cb; T4:38,7±4,8cb; T5:43,4±5,6b; T6:54,3±7,0a; P<0,001). Também houve diferença entre os períodos quanto à taxa de recuperação de oócitos (T1:88,6%a; T2:73,3%b; T3:73,3%b; T4:81,4%ab; T5:87,1%a; T6:79,4%ab; P=0,03). Em relação à taxa de blastocistos, os animais aspirados 11,5 dias após o parto apresentaram valores inferiores em relação aos outros períodos (T1:23,3%b; T2:34,9%a; T3:38,9%a; T4:33,7%a; T5:32,5%a; T6:31,6%a; P=0,01]. Entretanto, o número de blastocistos (T1:7,6±1,5; T2:9,2±2,2; T3:10,8±2,2; T4:10,6±2,1; T5:12,3±2,2; T6:13,6±2,7; P=0,06), a taxa de clivagem (T1:60,4%; T2:49,0%; T3:61,7%; T4:64,7%; T5:59,8%; T6:54,1%; P=0,08) e o número de embriões clivados (T1:19,7±3,2; T2:12,9±2,8; T3:17,1±3,0; T4:20,4±3,3; T5:22,6±4,2; T6:23,3±4,6; P=0,10) por sessão de OPU não diferiram entre os diferentes períodos pós-parto. Dessa forma, apesar da ciclicidade aos 45 dias pós-parto não ter interferido na produção *in vitro* de embriões de vacas Nelore, o período do pós-parto afetou significativamente o número de folículos aspirados, a taxa de recuperação de oócitos e a taxa de blastocistos.

Agradecimentos: Bioembryo e Instituto de Zootecnia.

SBTE 141 OPU-FIV e TE

Avaliação da produção *in vitro* de embriões em vacas nelore (*Bos indicus*) com alta e baixa contagem folicular submetidas a aspirações foliculares em diferentes momentos do pós-parto

Cecilia Rodrigues Alves Silveira[1]; Júlia Cestari Pierucci[1]; Gustavo Luís Dos Santos[2]; Walt Yamazaki[2]; Luciana Terumi Sanomiya Yamazaki[2]; Erika Aline Ribeiro Dias[3]; Lais Mendes Vieira[4]; Fabio Morato Monteiro[3]; Pietro Sampaio Baruselli[4]; Lindsay Unno Gimenes[1]
1.FCAV - UNESP; 2.BIOEMBRYO; 3.Instituto De Zootecnia; 4.FMVZ-USP.

Palavras-chave: Embrião *in vitro*; pós-parto; vacas de corte

No presente estudo objetivou-se avaliar o efeito da população folicular, conforme os dias pós-parto, na produção *in vitro* de embriões de doadoras da raça Nelore. Foram utilizadas 17 vacas Nelore, sem alterações no parto ou puerpério, mantidas com os bezerros durante todo período experimental. As fêmeas foram submetidas a seis aspirações foliculares (OPU) consecutivas, nos seguintes momentos pós-parto: T1-11,5 dias; T2-25,5 dias; T3-39,5 dias; T4-53,5 dias; T5-66,8 dias e T6-81,4 dias. Imediatamente antes do primeiro procedimento de OPU (20 G; 90 mm Hg), todos os folículos visíveis (≥2mm) pelo exame ultrassonográfico (Aloka SSDV 500) foram quantificados e os animais divididos de acordo com a contagem da população folicular, considerando a mediana: Alta (APF:52,9±5,5 folículos antrais; n=9) e Baixa (BPF:20,8±2,5 folículos antrais; n=8). As médias (±EPM) de escore de condição corporal (1-5) dos animais durante os momentos foram: 2,72±0,04 (T1); 2,82±0,04 (T2); 2,82±0,04 (T3); 2,83±0,05 (T4); 2,84±0,04 (T5) e 2,88±0,06 (T6). As variáveis foram analisadas por medidas repetidas no tempo utilizando o procedimento GLIMMIX (SAS 9.3®). As taxas foram calculadas sobre o número de oócitos recuperados. Animais com APF apresentaram maior número de oócitos recuperados (APF:44,7±3,1; BPF:20,9±1,9; P=0,004) e maior número de embriões clivados (APF:25,4±2,3; BPF:12,9±1,3; P=0,05) quando comparados aos animais BPF. Observou-se interação entre população folicular e o momento pós-parto em que as vacas foram aspiradas para taxa de clivagem (APF/T1:58,0%abc; APF/T2:47,7%c; APF/T3:61,8%ab; APF/T4:65,0%ab; APF/T5:62,9%ab; APF/T6:47,2%c; BPF/T1:66,9%ab; BPF/T2:51,3%bc; BPF/T3:61,8%abc; BPF/T4:64,8%ab; BPF/T5:53,1%bc; BPF/T6:70,3%a; P=0,05), número de blastocistos produzidos por sessão de OPU (APF/T1:10,2±2,6ab; APF/T2:12,9±3,9ab; APF/T3:15±3,3a; APF/T4:14,4±3,7a; APF/T5:13,8±2,8a; APF/T6:14,1±4,2ab; BPF/T1:5,0±1,04b; BPF/T2:5,4±1,6b; BPF/T3:6,7±2,5b; BPF/T4:6,8±1,2ab; BPF/T5:10,6±3,4ab; BPF/T6:13,0±3,7a; P=0,01) e taxa de blastocisto (APF/T1:21,3%d; APF/T2:34,8%abcd; APF/T3:40,3%ab; APF/T4:35,7%abc; APF/T5:28,6%bcd; APF/T6:24,6%cd; BPF/T1:29,1%bcd; BPF/T2:34,6%abcd; BPF/T3:37,0%abc; BPF/T4:30,0%bcd; BPF/T5:40,8%ab; BPF/T6:47,6%a; P=0,001). Em relação ao momento pós-parto em que as vacas foram aspiradas, independente de sua população folicular, observou-se diferença entre os períodos quanto ao número de oócitos recuperados (T1:32,6±5,4bc; T2:26,3±4,6d; T3:27,7±4,5cd; T4:31,5±4,7bc; T5:37,8±6,1ab; T6:43,1±6,1a; P<0,0001) e taxa de recuperação (T1:88,5%a; T2:73,3%b; T3:73,3%b; T4:81,4%ab; T5:87,1%a; T6:79,4%ab; P=0,03). Dessa forma, conclui-se que a quantidade de oócitos recuperados foi maior em animais de maior contagem folicular. Adicionalmente, em vacas com alta contagem folicular, a taxa de blastocistos foi maior no período entre 25,5 e 53,5 dias pós-parto, enquanto em animais de baixa contagem folicular, a taxa foi superior entre os 25,5 a 39,5 dias e entre 66,8 e 81,4 dias pós-parto.

SBTE 142 OPU-FIV e TE

Avaliação do uso do micro-ondas como método alternativo para esterilização de materiais usados em reprodução animal assistida

Priscila Helen Duda[1]; Andrea Maria Lazzari[2]; Gislaine Gomes Gonçalves[2]; Marilia Viviane Snel Oliveira[2]; Andrei Antonioni Fidelis[2]
1.Médica Veterinária Autônoma; 2.UPIS – Faculdades Integradas.

Palavras-chave: Microbiologia; staphylococcus aureus; escherichia coli

O material plástico é rotineiramente utilizado em laboratórios de reprodução animal assistida, por serem descartáveis oneram o custo de produção dos embriões. O óxido de etileno na esterilização é eficaz, porém, o processo é lento e caro, além de ter alto potencial carcinogênico. Desta forma, o uso de micro-ondas como alternativa é comumente aplicado por profissionais que prestam serviço nesta área. Entretanto, poucos relatos afirmam a eficácia de esterilização. O trabalho teve por objetivo avaliar a eficiência do método de esterilização por micro-ondas. A metodologia consistiu em lavagem manual do material plástico (com detergente neutro), secagem em estufa, embalagem em papel craft e uso de micro-ondas de 2450MHz por duas vezes, durante 5 minutos. Utilizou-se um recipiente com 500 mL de água, substituído por outro com temperatura ambiente entre as etapas. Dois ensaios foram propostos, o primeiro avaliou a eficácia do processo em eliminar dois micro-organismos enquanto o segundo a eficácia em esterilizar filtros coletores de embrião. Foram utilizados dois criotubos contaminados com 10 µL de uma solução contendo 108 UFC/mL de Staphylococcus aureus e outros dois com a mesma carga de Escherichia coli, distribuídos aleatoriamente em quatro grupos, nos quais dois foram submetidos a cultivo direto em caldo Müller Hinton (MH) e os outros dois passaram pelo micro-ondas antes do cultivo. A segunda etapa consistiu na colheita transcervical de líquido uterino bovino. Uma fêmea bovina foi previamente anestesiada por via epidural, a sonda uretral foi posicionada no corpo do útero e acoplada a um sistema "Y" com solução salina em uma extremidade e um Erlemeyer na outra, do qual foram drenados dois litros de solução. O conteúdo foi homogeneizado e distribuído uniformemente em 12 filtros coletores de embrião. O líquido passou pela malha e foi desprezado. Quatro grupos foram delineados, com 3 filtros cada. Grupo 1 (G1): o filtro não sofreu nenhum tipo de limpeza e seguiu para cultivo; G2: uso do micro-ondas e posterior cultivo; G3: lavagem manual, secagem e cultivo; G4: lavagem manual, secagem, micro-ondas e cultivo. Os materiais (criotubos e filtros) permaneceram em caldo MH por 48 horas a 37°C. O parâmetro de avaliação foi a turvação do caldo com 24 e 48 horas de incubação em comparação ao controle negativo, semeadura de todos os meios em ágar sangue (AS) ovino 5% e confecção/coloração de lâmina pelo método de Gram (somente no primeiro ensaio). No primeiro e segundo experimentos, houve turvação do caldo Müller Hinton em 24 horas. Ocorreu crescimento bacteriano em todas as placas (AS) semeadas com os caldos turvos. A coloração de Gram, efetuada com amostras oriundas do primeiro ensaio, mostrou compatibilidade morfológica e tintorial com as bactérias inoculadas. Diante dos resultados, o uso do micro-ondas, na frequência e tempo estipulados, não foi eficiente em esterilizar os materiais selecionados.

SBTE 143 OPU-FIV e TE

Capacitação *in vitro* de espermatozoides com L-arginina e heparina em ausência de complexos cumulus-oócitos e seu impacto na produção de embriões

Gester Breda Aguiar; Maria Clara Caldas-Bussiere; Natália Ferreira Torres; Valter Luis Maciel; Claudio Luiz Melo De Souza
UENF.

Palavras-chave: Capacitação espermática; l-arginina; embriões

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da L-arginina (L-arg, precursora da síntese de NO) na qualidade da capacitação *in vitro* de espermatozoides bovinos criopreservados induzidos pela heparina e seu reflexo na produção *in vitro* de embriões. Todos os reagentes utilizados no processo de capacitação e testes espermáticos foram adquiridos da Sigma Aldrick Chemical Co. (St Louis, USA). O meio-base utilizado na capacitação foi o de Tyrodes modificado (TALP-sp). O meio de lavagem empregado na capacitação espermática foi o de Tyrodes (Chamberland, Theriogenology, v. 55, p. 823-835, 2001). Os meios utilizados no processo de produção *in vitro* de embriões foram obtidos da empresa Progest Biotecnologia em Reprodução Animal (Botucatu, Brasil). No experimento 1, os grupos experimentais foram: Controle 0h sem capacitação prévia, e as capacitações por 30 min em ausência de COC com heparina (controle 30 min); L-arg; e L-arg + heparina. Foram avaliados a capacitação e reação acrossômica (RA) pelo teste de clortetraciclina, e a integridade das membranas plasmática (MP) e acrossomal (MA) pela associação de 3 sondas fluorescentes (IP; hoescht; FICT-PSA). A capacitação com L-arg + heparina aumentou o percentual de espermatozoides capacitados quando comparado ao controle 0h e capacitação com heparina (61,1 vs 18,24 e 47,01%, respectivamente) e diminuiu a RA (19,6 vs 25,20%) em relação a capacitação com heparina (P<0,05). Não houve diferença na porcentagem de espermatozoides com MP e MA integras quando comparado com o controle 0h (P>0,05). No experimento 2, os espermatozoides foram incubados com os COCs em presença de heparina (controle) ou previamente incubados em ausência de COCs por 30 min com heparina, L-arg ou L-arg + heparina e depois lavados e transferidos para as gotas de FIV sem heparina. A qualidade espermática foi avaliada pela taxa de produção de blastocistos *in vitro*. Não houve diferença significativa na taxa de clivagem entre os tratamentos (P>0,05), entretanto a capacitação com L-arg + heparina aumentou a taxa de blastocistos em 31,8% em relação ao controle capacitado com heparina em presença de COCs (53,71 vs 40,76%, P<0,05). Os resultados nos permitem concluir que 1) a adição de L-arg ao meio capacitante contendo heparina aumenta o número de espermatozoides capacitados *in vitro* com 30 min de cultivo; 2) mantém uma menor porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal lesada e 3) a adição de L-arg ao meio capacitante com heparina, em ausência de COCs, foi o método mais efetivo na produção de blastocistos.
Apoio financeiro: CNPq, FAPERJ.

SBTE 144 OPU-FIV e TE

Comparação de diferentes soluções de armazenamento de ovários sobre os parâmetros quanti-qualitativos avaliados por critérios morfológicos e teste de azul cresil brilhante em oócitos bovinos

Luiza Bento De Queiroz Neta; Maria Valéria De Oliveira Santos; Cibelle Anne Dos Santos Costa; Alana Azevedo Borges; Pedro Henrique Fernandes De França; José Teixeira Da Rocha Neto; Magda Lorena Turbano Dos Santos; Alexandre Rodrigues Silva; Alexsandra Fernandes Pereira
Universidade Federal Rural Do Semi-Árido.

Palavras-chave: Produção *in vitro*; qualidade oocitária; teste acb

O objetivo do presente trabalho foi avaliar diferentes soluções [meio essencial mínimo modificado por Dulbecco (DMEM) *vs.* solução salina (NaCl) *vs.* solução tampão fosfato (PBS)] acrescidos de 10% soro fetal bovino (SFB) para o armazenamento a 5°C de ovários bovinos por 24 h. Para tanto, ovários oriundos de abatedouro foram transportados a 37°C por 15 min e no laboratório divididos em quatro grupos: não resfriado (controle) e resfriado (5°C) em soluções de DMEM/SFB, NaCl/SFB e PBS/SFB. Imediatamente após a colheita dos ovários (controle) ou armazenamento (demais tratamentos), foram aspirados com agulha e seringa (21G/5 mL) folículos (2-8 mm). Em seguida, oócitos recuperados foram classificados de acordo com as células do *cumulus* (CCs) e homogeneidade do citoplasma em Grau I (≥3 camadas de CCs e citoplasma homogêneo), Grau II (1-2 camadas de CCs e citoplasma homogêneo), Grau III (<1 camada de CCs e citoplasma heterogêneo) e Grau IV (oócito degenerado). Oócitos grau I e II foram considerados viáveis enquanto que grau III e IV não viáveis. Após a classificação morfológica convencional, oócitos foram submetidos ao corante azul cresil brilhante (Sigma, EUA, ACB, 26 μM, 60 min) e classificados em ACB^+ (citoplasma azul/oócito viável) e ACB^- (citoplasma incolor/oócito não viável). Todos os dados foram analisados pelo teste exato de Fisher (P<0,05). Após cinco repetições, um total de 120 ovários resultou em 1047 estruturas recuperadas, perfazendo uma média de 8,8 oócitos/ovário e taxa de recuperação total (oócitos recuperados/folículos aspirados) de 51,9% (1047/2016). Nenhuma diferença (P=0,12) foi observada na taxa de recuperação entre os grupos DMEM/SFB [221/463 (47,7%)] e NaCl/SFB [157/372 (42,2%)], os quais foram diferentes e menores (P<0,01) que os tratamentos controle [322/559 (57,6%)] e PBS/SFB [347/622 (55,8%)]. Quanto à qualidade oocitária por critérios morfológicos, um maior percentual de oócitos viáveis (P<0,05) foi obtido de ovários armazenados em DMEM/SFB [152/221 (68,8%)] e NaCl/SFB [111/157 (70,7%)] quando comparados ao controle [194/322 (60,2%)] e PBS/SFB [208/347 (59,9%)], os quais não diferenciaram entre si (P=0,94). Quanto à qualidade oocitária por ACB, um percentual similar ao grupo controle [131/322 (40,7%)] de oócitos viáveis foi obtido somente de ovários armazenados em NaCl/SFB [52/157 (33,1%), P=0,13]. Diferenças foram observadas entre os grupos; contudo enquanto PBS/SFB apresentou um maior número de oócitos recuperados, NaCl/SFB apresentou um maior número de oócitos viáveis em ambas as avaliações de qualidade oocitária. Possivelmente, soluções de composições mais simples para armazenamento de ovários resfriados por 24 h não afetam a qualidade das estruturas recuperadas. Em conclusão, o uso da solução de NaCl/SFB pode ser empregada para o armazenamento de ovários a 5°C durante 24 h. Outros estudos são necessários para investigar a competência de desenvolvimento desses oócitos bovinos.

SBTE 145 OPU-FIV e TE

Comparação dos resultados de produção de embriões FIV bovinos e de gestação, com sêmen convencional e sêmen sexado de macho

Patricia Furtado Malard; Luiz Gustavo Araujo Oliveira; Arthur Levantezi Santos; Luis Mauro Valadao Queiroz
BIO BRASÍLIA.

Palavras-chave: Fiv; sêmen sexado; gestação

O objetivo desse trabalho foi avaliar a eficiência do sêmen sexado de macho na produção *in vitro* de embriões e gestações em 4 touros da raça Nelore. Para a comparação, embriões bovinos foram também produzidos *in vitro*, utilizando para tanto, sêmen convencional dos mesmos touros. Oócitos provenientes de aspiração folicular (OPU) foram maturados e fertilizados *in vitro* utilizando sêmen convencional (Grupo SC) e sêmen sexado (SM). Posteriormente, os zigotos foram cultivados por 7 dias sob as mesmas condições de cultivo *in vitro*, para avaliação das taxas de desenvolvimento embrionário. Já as taxas de prenhezes foram avaliadas por ultrasonografia 60 dias após a transferência dos embriões. Nossos resultados demonstraram que a taxa de blastocisto no grupo SM foi menor que no grupo SC (29% -2709 blastocistos - vs 37,1% - 3167 blastocistos, respectivamente P<0,001). No entanto, a taxa de prenhez no grupo SM foi maior que no grupo SC (36,9% vs 30,1%, respectivamente P<0,001). Comparando as performances individuais dos 4 touros, apenas um apresentou maior taxa de produção de embriões *in vitro* quando comparado ao sêmen convencional (touro I, 26,6% vs 33.5%; touro II, 40.0% vs 36,3%; touro III 22,3% vs 39,4%; e touro IV 20,7% vs 35,9%, respectivamente). No entanto, apesar da menor taxa de produção de embriões, o grupo SM apresentou maior taxa de prenhez comparado ao grupo SC (touro I, 42,5% vs 24,1%; touro II 39,7% vs 34,8%; touro III 24,3% vs 36,0%; e touro IV 40,5% vs 33,3%, respectivamente). Em conclusão, baseado em nossos resultados, o grupo sêmen convencional apresentou maior taxa de produção de embriões *in vitro*, porém a taxa de prenhez aos 60 dias foi superior para o Grupo Sêmen Sexado de Macho.

SBTE 146 OPU-FIV e TE

Comparação entre o número de estruturas recuperadas e embriões viáveis de ovelhas submetidas a protocolo de superovulação suplementadas com glicerol.

Alberto Lopes Gusmão; Carlos Henrique Calazans Oliveira; Alexandra Soares Rodrigues; Alana Santana Carvalho; Rodrigo Freitas Bittencourt; Cláudia Kazumi Kiya; Mariana Alves De Andrade Silva; Marcus Vinícius Galvão Loiola; Marcos Chalhoub; Antonio De Lisboa Ribeiro Filho
Universidade Federal Da Bahia.

Palavras-chave: Flushing energético; embrião; reproduçao

Objetivou-se avaliar a influência do flushing energético ultracurto com glicerol sobre a quantidade de estruturas recuperadas e embriões viáveis provenientes de ovelhas superovuladas. Sessenta ovelhas da raça Dorper foram submetidas a um protocolo de superovulação que consistiu na inserção de um dispositivo intravaginal contendo 0,33g de progesterona (CIDR-G®, Zoetis, São Paulo, Brasil) no Dia 0, sete dias após o dispositivo foi substituído e administrou-se 125µg de cloprostenol sódico IM (Ciosin®, MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil). A estimulação ovariana teve início no D12 utilizando 200mg de FSHp em 8 aplicações intervaladas de 12h em doses decrescentes IM (20, 20, 15, 15, 10, 10, 5, 5%). Às 18h do D14, concomitante a 6ª aplicação de FSHp, foi administrado 200UI de eCG IM (Novormon®, MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil). Às 20h deste mesmo dia o CIDR-G foi removido e os animais foram divididos em dois grupos experimentais, G-SUP (n=24) ovelhas tratadas com 100ml de glicerol, via oral, como fonte glicogênica para efeito de flushing energético ultracurto e G-CONTROLE (n=36) composto pelos que animais receberam, para efeito placebo, 100ml de água, via oral. Às 20h do D15 para indução das ovulações foi aplicado 0,1mg de gonadorelina IM (Fertagyl®, MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil). As ovelhas foram inseminadas 36 e 44h após a retirada do dispositivo contendo P4 pelo método laparoscópico, utilizando sêmen fresco, e os embriões foram coletados pelo método cirúrgico na manhã do D21. Para análise estatística foi utilizado o pacote estatístico Stastical Package for Social Science (SPSS) versão 19, as variáveis foram comparadas por meio do teste *t de student*, levando em consideração o nível de significância de 5%. A média total de estruturas e embriões viáveis neste estudo foi, respectivamente, de 5,87±5,97 e 3,73±4,27. A produção média de estruturas totais e embriões viáveis do G-SUP foi, respectivamente, de 5,83±6,64 e 3,67±4,08, estatisticamente semelhante àquela obtida no G-CONTROLE que foi de 5,89±5,58 e 3,78±4,45 ($p>0.05$), respectivamente. Desta forma pôde-se concluir que a suplementação com glicerol na forma de flushing energético ultracurto não influenciou na quantidade de estruturas recuperadas e embriões viáveis em ovelhas superovuladas.

SBTE 147 OPU-FIV e TE

Descrição de duas novas técnicas cirúrgicas para o tratamento de prolapso vaginal em vacas doadoras zebuínas: vaginectomia parcial e vaginopexia dorsal

José Abdo De Andrade Hellú
Transfix Transplante De Embriões LTDA.

Palavras-chave: Prolapso; vaginectomia; vaginopexia.

Atualmente, a redução do prolapso vaginal em vacas doadoras zebuínas não prenhes mostrou-se com alta incidência. As técnicas convencionais como: Caslick, Bühner ou Flessa não são eficientes e apresentam recorrência significativa desta afecção. Assim, este trabalho propõe a avaliação de duas novas técnicas cirúrgicas na correção do prolapso vaginal em fêmeas doadoras, nos quais denominam: vaginectomia parcial e vaginopexia dorsal. Essas técnicas foram aplicadas a campo, por um período de quatro anos, dispondo-se de vacas zebuínas adultas (n=812) das raças: Nelore, Gir e Brahman, pertencentes a propriedades diversas. O prolapso vaginal foi diagnosticado através da avaliação semiológica, e após determinava-se a técnica a ser aplicada conforme a severidade e duração do processo. Os procedimentos de vaginectomia parcial e vaginopexia dorsal demonstraram alta percentagem de recuperação, 93,4% e 96,1%, além de baixo índice de recidivas (6,3% e 3,7%) e baixa mortalidade (0,2% e 0,3%), respectivamente. Portanto, sugerimos que as duas técnicas propostas promovem redução definitiva de prolapso vaginal em fêmeas doadoras zebuínas não prenhes.

SBTE 148 OPU-FIV e TE

Desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro* após refrigeração em meio 199 e botuembryo®

Fernanda Nunes Marqui; Alício Martins Jr; Diego Gouvêa Souza; Fernando Franco Polizel; José Antonio Junior Dell`Aqua; Eunice Oba
UNESP.

Palavras-chave: Embrião; refrigeração; meios de cultivo.

A produção *in vitro* de embriões bovinos obtêm acréscimo anualmente, porém ainda depara-se com um entrave, a escassez de receptoras sincronizadas para o momento da transferência de embrião (TE). Assim, a congelação ou vitrificação de embriões excedentes é uma opção, porém, os resultados de prenhez ainda são inconsistentes. As pesquisas recentes sugerem o emprego de embriões refrigerados como alternativa viável e acessível economicamente. Este estudo propõe a avaliação dos efeitos referentes ao meio e tempo de refrigeração sobre o subsequente desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Os ovários utilizados para obtenção de oócitos foram provenientes de abatedouros. Os oócitos foram lavados e selecionados no meio PBS com 10% de SFB e, a seguir, maturados (MIV; grupos de 20-25/gota) em Meio 199, acrescido de bicarbonato de sódio, piruvato de sódio, penicilina, SFB, FSH e LH, por 24 horas. A seleção espermática foi realizada através da centrifugação em gradiente descontínuo (45 e 90%) de Percoll®; e o meio TALP acrescido de PHE e heparina para utilização na fertilização *in vitro* (FIV). Os gametas foram coincubados por 20 horas e os prováveis zigotos cultivados (CIV) no meio SOF, mantidos por sete dias. As etapas de MIV, FIV e CIV efetuaram-se na incubadora com CO_2 a 5% em ar, a 38,7ºC e alta umidade. Após sete dias da FIV, os blastocistos foram avaliados e divididos aleatoriamente em cinco grupos, a saber: blastocistos mantidos em meio SOF, sob as mesmas condições de cultivo previamente mencionadas para a CIV, por 6 horas (grupo controle); blastocistos refrigerados em meio BotuEmbryo® (Botupharma, Botucatu, Brasil), por 24 (grupo B24) e 48 horas (grupo B48); e blastocistos refrigerados em Meio 199, acrescido de bicarbonato de sódio, piruvato de sódio, HEPES (25 mM), SFB (50%) e penicilina, por 24 (M24) e 48 horas (M48), em caixa de isopor (BotuFlex®; Botupharma), previamente equilibrada a 5°C. Após o período de refrigeração, os blastocistos dos grupos refrigerados por 24 e 48 h foram transferidos para o meio SOF e incubados em estufa de CO_2 por 6 horas, para avaliação do subsequente desenvolvimento. ANOVA e teste t de Bonferroni foram utilizados para verificar diferenças entre os grupos, com $P<0,05$ indicando significância. Não houve diferença entre os grupos controle (100% vs. 100%), B24 e M24 (85,6% vs. 65,8%) e B48 e M48 (58,4% vs. 43,8%) para a taxa de blastocisto/blastocisto expandido (B/Bx). Contudo, maior porcentagem ($P<0,05$) de B/Bx foi observada entre os grupos controle comparados aos grupos B48 e M48, com resultados similares entre os grupos controle, B24 e M24. Portanto, o meio BotuEmbryo® por 24 horas, mostrou-se eficiente para refrigeração de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

SBTE 149 OPU-FIV e TE

Diferentes métodos de coleta de embriões e protocolos de superovulação em fêmeas ovinas da raça crioula lanada.

Arnaldo Diniz Vieira; Monike Dos Santos Quirino; Karina Lemos Goularte; Carlos Eduardo Ranquetat Ferreira; Gustavo Desire Antunes Gastal; Ligia Margareth Cantarelli Pegoraro; Rafael Gianella Mondadori; Bernardo Garziera Gasperin
Universidade Federal De Pelotas.

Palavras-chave: Hormônio; ovelha; reprodução.

As raças ovinas com adaptação genética ambiental proporcionam benefícios econômicos para o produtor, que requer a sua conservação. Na região Sul do Brasil, a raça Crioula Lanada apresenta resistência a endoparasitas e afecções podais. A inserção de outras raças, refletiu em cruzamentos e disseminação do padrão racial, necessitando de alternativas que facilitem a mantença e preservação de adaptações genéticas da raça. Este trabalho propõe a determinação da eficiência de distintas formulações comerciais de FSH no protocolo de superovulação em diferentes vias de coleta de embriões. Fêmeas ovinas multíparas (n=8), provenientes do núcleo de preservação *in situ* da Embrapa Pecuária Sul (Bagé, RS), previamente selecionadas para cateterização cervical, foram submetidas ao tratamento superovulatório. Formaram-se dois grupos com (n=4), no qual obtiveram o ciclo estral sincronizado, para que a superovulação ocorra 60 horas pós-estro. Um grupo recebeu FSH (200mg, Foltropin V®) e o outro FSH + LH (250 + 250, Pluset®), duas vezes ao dia por quatro dias consecutivos. No primeiro dia, foi implantado o CIDR-G®; no qual foi removido após 72h, junto à aplicação oral de *flushing* superagudo de glicerina e aplicação IM de PGF2α. O estro foi detectado por rufião e logo as fêmeas foram inseminadas (12 e 24h), por via cervical superficial, com sêmen resfriado (150 x 106 cel/mL) de dois machos da raça. Duas fêmeas de cada grupo foram selecionadas para coleta de embriões por laparotomia (LT) ou via transcervical (TC). No quinto dia após o estro, as fêmeas foram submetidas a jejum hídrico e alimentar. As ovelhas destinadas à coleta TC receberam uma dose IM de BE e ocitocina, 12h e 15min antes do procedimento, respectivamente. No D6, as ovelhas do grupo LT foram anestesiadas (xilazina+cetamina) e submetidas à coleta e contagem de corpos lúteos (CLs). No grupo TC, esta contagem foi feita posteriormente por laparoscopia. As fêmeas do grupo FSH apresentaram resposta média de 5,5 CLs, no qual no grupo TC a taxa de recuperação de cada animal foi de 50% e 100%, e no grupo LT as taxas foram de 67% e 100%. Nas fêmeas do grupo FSH+LH, a média foi 11,2 CLs, com taxa de recuperação no grupo TC de 100% e 0%, e no grupo LT de 73% e 66%. A maioria das estruturas coletadas não foram fecundadas. A coleta por LT ofereceu resultados mais constantes, porém, a via TC propiciou uma taxa aceitável de recuperação embrionária. Devido aos efeitos negativos da LT, este resultado deve ser considerado em raças com número limitado de exemplares. O número de CLs obtidos com o tratamento FSH+LH foi superior ao obtido com FSH, propondo novas investigações reprodutivas de fêmeas ovinas da raça crioula.

SBTE 150 OPU-FIV e TE

Dilatação cervical em ovelhas da raça santa inês induzida por misoprostol, ocitocina e estradiol para desenvolvimento de método não cirúrgico para coleta de embriões

Felipe Zandonadi Brandao[1]; Ceci Ribeiro Leite[1]; Jeferson Ferreira Da Fonseca[2]; Daniel Andrews De Moura Fernandes[1]; Mário Felipe Alvarez Balaro[1]; Ana Clara Sarzedas[1]; Carolina Cerqueira Sarmento Olivares[1]
1.UFF; 2.EMBRAPA CAPRINOS E OVINOS.

Palavras-chave: Transcervical; transferência de embriões; ovino.

Objetivou-se com este estudo desenvolver um protocolo farmacológico de dilatação cervical em ovelhas da raça Santa Inês visando a coleta de embriões por via transcervical. Foram utilizadas ovelhas multíparas (n=30), cíclicas, com idades entre 24 e 48 meses, apresentando peso médio de 50,7 ± 5,4 kg e escores corporais entre 2,75 e 3,5 (1-5) em delineamento experimental no modelo "cross-over". O estro das fêmeas foi sincronizado com protocolo curto e os procedimentos de coleta foram realizados no 14º dia após o estro. Cada animal recebeu uma dose de 0,5mL de d-cloprostenol 12 horas antes do procedimento. Todos os grupos receberam injeções epidurais de 2,0 mg/kg cetamina (Ketamina Agener® Agener União Saúde Animal – São Paulo, Brasil) administradas no espaço intervertebral L7-S1. Os grupos experimentais foram: GC = controle; GMi = misoprostol; GMiOE = misoprostol, estradiol e ocitocina; GOE = estradiol e ocitocina. Os grupos que utilizaram misoprostol receberam, 5h antes do procedimento, 200µg do fármaco (Prostokos®, Laboratório Hebron, Caruaru, Brasil) diluídos em 1,5 mL de solução salina depositados diretamente sobre o óstio cervical. O benzoato de estradiol (RIC-BE® Tecnopec, São Paulo, Brasil) foi aplicado via IV na dose de 100 µg por animal, diluídos em 2,5mL de solução salina + 2,5mL de etanol, 12h antes do procedimento. A ocitocina (Ocitocina Forte UCB®, Centrovet, Goiânia, Brasil) foi administrada via IV, na dose de 100UI por animal, 15 minutos antes do procedimento. Os animais foram sedados com uma associação de acepromazina (0,1mg/kg Acepran®, Vetnil, Louveira, Brasil) e diazepam (0,2mg/kg Diazepam, Teuto, Anápolis, Brasil) via IV e após dez minutos, receberam a injeção epidural. A cérvix era pinçada, tracionada até a comissura vulvar e fixada com duas pinças de Pozzi laterais ao óstio cervical. As tentativas de transposição cervical eram realizadas com uma vela de Hegar aos 10, 20 e 40 minutos após a epidural, cada tentativa perdurava cinco minutos. A transposição era confirmada pela injeção e recuperação de 20 a 40mL de solução salina. Os dados foram analisados no programa SAEG (Sistema para Análises Estatísticas, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes - UFV - Viçosa, 2007) e submetidos ao teste exato de Fisher com nível de significância de 95%. A taxa de transposição cervical variou entre os grupos, no qual GOE apresentou taxa de 90% (27/30), não diferindo do GMiOE, com taxa de 86,2% (25/30), porém demonstrou superioridade aos demais grupos. No grupo GMi foi possível transpor 68,9% (20/29) das cérvices, valor equivalente (P>0,05) ao GMiOE e ao GC (62,1% - 18/29). O estudo comprovou a possibilidade de aumentar a taxa de transposição cervical em ovelhas Santa Inês com o uso de associações hormonais, viabilizando a coleta de embriões por via transcervical em ovelhas, evitando o procedimento cirúrgico.

SBTE 151 OPU-FIV e TE

Diminuição de grânulos lipídicos de embriões bovinos produzidos *in vitro* com baixas concentrações de forskolin

Daniela Martins Paschoal[1]; Mateus José Sudano[2]; Rosiara Rosaria Dias Maziero[3]; Midyan Daroz Guastali[3]; Luis Carlos Oña Magalhães[3]; Fernanda Cruz Landim Alvarenga[3]; Alício Martins Jr[4]; Cláudia Lima Verde Leal[1]
1.FZEA/USP; 2.UNIPAMPA; 3.FMVZ/UNESP; 4.FMVA/UNESP.

Palavras-chave: Forskolin; lipídios; PIV.

Este estudo propõe a indução de lipólise química com adição de forskolin no sexto dia de cultivo embrionário, com o intuito de aumentar a taxa de sobrevivência dos embriões PIV. Foram realizadas oito réplicas, utilizando 1.519 oócitos, os quais foram lavados e transferidos para gotas de MIV em TCM 199 acrescido de 10% de SFB, permanecendo em estufa com 5% de CO_2 em ar, sob temperatura de 38,5°C e umidade absoluta, durante 24h. O sêmen foi selecionado pelo gradiente Percoll obtendo uma concentração ajustada para $2x10^6$ espermatozóides/mL. Os oócitos foram incubados durante 24h, em estufa com 5% de CO_2 em ar, sob temperatura de 38,5°C e umidade absoluta. Os prováveis zigotos foram cultivados em meio SOF e 2,5% de SFB. Os embriões foram mantidos em estufa com 5% de CO_2, 5% de O_2, e 90% de N_2, sob temperatura de 38,5°C e umidade absoluta até o D 6 (D 0=FIV), momento o qual foram divididos em quatro grupos para a adição do Forskolin® (F-6886): Controle (grupo cultivado na ausência de forskolin, durante sete dias consecutivos); F 2,5µM (grupo cultivado com 2,5µM de forskolin durante 24h); F 5µM (grupo cultivado com 5µM de forskolin durante 24h); F 10µM (grupo cultivado com 10µM de forskolin durante 24h). A apoptose foi analisada através da técnica TUNEL (Terminal deoxinucleotil transferase Uracil Nick End Labeling) e a análise do conteúdo lipídico foi realizada com o Sudan Black B (S-0395). Para análise estatística os dados foram analisados utilizando a ANOVA através do PROC GLM do SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA). Fontes de variação no modelo incluindo tratamento e réplicas foram considerados como efeito fixo e aleatório, respectivamente. Os dados são apresentados como média dos quadrados mínimos e erro padrão. Para todas as análises foi adotado o nível de significância de 5%. Não foi observada diferença na taxa de formação de blastocisto: Controle (37,0±4,0); F 2,5µM (38,6±4,0); F 5µM (40,7±4,0); F 10µM (31,4±4,0). Ao passo que todos os grupos tratados com forskolin apresentaram diferença sobre a quantificação lipídica: Controle ($50,6±1,1^{ab}$); F 2,5µM ($46,2±1,1^{c}$); F 5µM ($49,9±1,2^{b}$); F 10µM ($53,9±1,2^{a}$); número total de células íntegras: Controle ($140,1±10,7^{ac}$); F 2,5µM ($173,±9,0^{b}$); F 5µM ($120,6±11,5^{c}$); F 10µM ($157,0±13,9^{ab}$) e apoptose celular: Controle ($12,1±3,5^{a}$); F 2,5µM ($16,7±4,1^{b}$); F 5µM ($11,1±6,5^{a}$); F 10µM ($14,2±4,6^{ab}$) ($P<0,05$). Concluiu-se que o forskolin é um agente lipolítico eficiente mesmo em baixas concentrações (F 2,5 µM), levando a formação de blastocistos com maior número de células, comparando-o ao grupo controle. Porém, a concentração de 5 µM de forskolin induziu ao menor índice de morte celular programada.

Agradecimento: FAPESP 2014/21289-1

SBTE 152 OPU-FIV e TE

Efeito da adição de butafosfan no meio de maturação oocitária na produção de embriões bovinos *in vitro*

Lucas Teixeira Hax[1]; Augusto Schneider[1]; Marcio Nunes Correa[1]; Sofia Del Carmen Bonilla De Souza Leal[2]; Carlos Eduardo Gomez Martin[2]
1.Universidade Federal De Pelotas; 2.INVITROSUL.

Palavras-chave: Butafosfan; piv; miv

A qualidade da maturação oocitária está diretamente relacionada com a taxa de desenvolvimento embrionário, pois este depende do estoque de mRNA oocitário armazenado durante esse período. Durante a maturação, ocorrem diferentes processos no oócito que dependem de cascatas de fosforilação e desfosforilação. Existem indicações da administração de compostos contendo butafosfan, uma molécula de fósforo orgânico, em fêmeas bovinas doadoras de embrião ou oócito para melhora dos resultados de programas de reprodução assistida. Dessa forma, nossa hipótese foi a de que a adição de butafosfan ao meio de maturação *in vitro* (MIV) poderia melhorar a maturação oocitária, aumentando o número de embriões produzidos. Foram realizadas 8 rotinas de PIV, totalizando 800 complexos cumulus oócito coletados de ovários provenientes de abatedouro. Para realização da PIV, foram utilizados os meios da empresa Cenatte® (Cenatte®, Pedro Leopoldo – MG – Brasil). Em cada rotina, os oócitos foram aleatoriamente divididos em quatro grupos de 25 oócitos e o meio de MIV foi suplementado com doses crescentes de butafosfan (Capot Chemical Company Limited, Hangzhou, Zhejang, China) (Gc = 0,0mg/L; G1 = 50mg/L; G2 = 100mg/L e G3 = 200mg/L). A MIV ocorreu por 24h em estufa com 5% de CO2 a 39°C. Foi utilizado o método de minipercoll para seleção dos espermatozóides e utilizado 10µL com 1x106 espermatozóides/mL para realização da FIV. Após 18h, os prováveis zigotos foram transferidos para meio de cultivo de embriões em condições controladas (5% CO2, 5% O2, 90% N2) a 39°C por 7 dias. A análise estatística foi realizada no programa SAS (SAS, Cary, NC, EUA) através do procedimento GLM para verificação do efeito linear, quadrático e cúbico da adição de doses crescentes de butafosfan ao meio de MIV sobre o percentual de embriões no D7 em relação ao número de oócitos maturados. A produção de embriões no D7 foi de 34,7%, 28,5%, 33,5% e 31,6% paras os grupos Gc, G1, G2 e G3 respectivamente, não havendo efeito (P>0,05) do grupo. Conclui-se que a adição do butafosfan no meio de MIV não interfere de maneira direta na maturação oocitária, visto que não afetou a produção de embriões bovinos *in vitro*.

SBTE 153 OPU-FIV e TE

Efeito da sincronia do estro entre receptoras e doadoras de embriões, qualidade e estado (congelado ou fresco) do embrião sobre a taxa de prenhez em transferência de embriões

Cassio Cassal Brauner[1]; Mityelle Da Costa Chaves Rodrigues[1]; Ana Lucia Martins Bonotto[2]; Carolina Bespalhok Jacometo[1]; Alice De Moura Benites[1]; Marcio Nunes Correa[1]
1.Universidade Federal De Pelotas; 2.Iniciativa Privada.

Palavras-chave: Transferência de embriões; qualidade de embriões; sincronização estro

O objetivo do presente estudo foi avaliar a sincronia do estro entre a doadora e a receptora, os efeitos da qualidade e estado (fresco ou congelado) do embrião sobre a taxa de prenhez em receptoras bovinas. O trabalho foi realizado no período de dois anos, em uma central de transferência de embriões (TE), localizada na cidade de Santiago, Rio Grande do Sul. Foram utilizadas 90 vacas da raça Aberdeen Angus, as quais foram submetidas a protocolos de superovulação (SOV) seguido de coleta de embriões que gerou um total de 1.097 TE. O protocolo de SOV era iniciado dez dias após a detecção de cio natural da doadora e a coleta dos embriões realizada, em média, sete dias após o cio subsequente. O cio das receptoras foi observado e no dia da TE as receptoras eram selecionadas de acordo com a sincronia do cio entre doadora e receptora, buscando utilizar animais que apresentaram cio o mais próximo possível. Foram formados 11 grupos, com intervalos de 6 horas, desde - 30 até + 30 horas, em relação à ocorrência do cio receptora vs doadora. A classificação quanto à qualidade dos embriões foi realizada de acordo com IETS (1998), sendo apresentado em graus I–excelente; II-Regular; III-Pobre e IV-Morto ou degenerado. As análises estatísticas foram realizadas com o pacote GLM do software R, através de modelos de regressão logística. A prenhes foi analisada como uma variável resposta binomial. Para todas as análises, a significância foi considerada quando P<0,05. Posteriormente, as razões de chances (odds ratio) para prenhez foi calculada para cada variável. A taxa de prenhez geral foi de 52%. Não houve efeito da sincronia da doadora e receptora em relação à taxa de prenhez, variando entre 42% à 56% (P>0,05). O grau de qualidade dos embriões afetou a taxa de prenhez, apresentando Grau I 58%, Grau II 56% e Grau III 44% de prenhez (P<0,001). Assim como o estado do embrião (congelado ou a fresco) afetou a taxa de prenhez, sendo de 84% para embriões frescos e 16% para embriões congelados (P=0.04). Quando utilizou-se as razões de chances para prenhez, foi observado que embrião de grau III apresenta 43% menos chances de conceber quando comparado com o grau I, assim como o estado do embrião, apresentando o congelado 37% menos chances de conceber quando comparado ao embrião fresco. A sincronia da doadora e da receptora considerando-se um intervalo de ±30 h não afeta a taxa de prenhez. Porém, a qualidade e o estado embrionário (fresco ou congelado) afetam a taxa de prenhez.

SBTE 154 OPU-FIV e TE

Efeito da suplementação com metionina e colina protegidas em embriões de vacas da raça holandês

Diego Andres Acosta[1]; Ana Denicol[2]; Maria Ines Rivelli[3]; Cassandra Skenandore[3]; Daniel Luchini[4]; Marcio Corrêa[1]; Peter Hansen[2]; Felipe Cardoso Cardoso[3]
1.Universidade Federal De Pelotas; 2.University Of Florida; 3.Uiversity Of Illinois; 4.Adisseo.

Palavras-chave: Metionina; colina; embriões

O objetivo deste estudo foi determinar os efeitos da suplementação com metionina e colina durante os períodos pré- e pós-parto em embriões de vacas da raça Holandês. Vacas multíparas foram distribuídas em blocos casualizados em quatro tratamentos a partir de 21 dias pré-parto até 30 dias de lactação. Os tratamentos (TRT) foram: CON (n=8, alimentadas com dieta pré-parto e início de lactação com uma relação Lis:Met = 3,5:1), MET (n=9, alimentas com dieta basal + metionina, Smartamine® M, para uma relação Lis:Met = 2,9:1), CHO (n=8, alimentadas com dieta basal + 60g/d de colina, Reashure®), e MIX (n=11, alimentadas com dieta basal + Smartamine® M, para uma relação Lis:Met = 2,9:1 + 60g/d de Reashure®). De 30 a 72 dias pós-parto as vacas foram distribuídas ao acaso em dois grupos (GRP): controle (CTL, n=16, alimentadas com uma dieta basal com um relação Lis:Met = 3,5:1) e metionina (SMT, n=20, alimentadas com dieta basal + Smartamine® M, para uma relação Lis:Met = 2,9:1). No dia 60 pós-parto, as vacas que apresentaram folículos maiores que 5 mm foram aspiradas, foi inserido um CIDR®, e o protocolo de superovulação iniciado no dia 61,5, usando o tratamento com FSH equivalente a 400 mg de NIHFSH-P1 (Folltropin®) em oito doses decrescentes em intervalos de 12 horas durante o período de 4 dias. As vacas receberam duas doses de PGF2α nos dias 63 e 64 (concomitantes com a 5 e 7 doses de FSH) e o CIDR® foi retirado no dia 65. Vinte e quatro horas após a retirada do CIDR®, a ovulação foi induzida com GnRH. As vacas foram inseminadas 12 e 24 horas após a aplicação do GnRH. Os embriões foram coletados 6,5 dias após a inseminação artificial. A metilação global dos embriões foi determinada for imunofluorescência marcada com 5-metilcitosina, a deposição de gordura foi determinada através da coloração por Nile Red. A coloração nuclear (Iodeto de propídeo ou Hoescht 33342) foi usada para calcular o número de célular por embrião. A análise estatística foi realizada utilizando o MIXED PROCEDURE através do programa SAS. A metilação do DNA não foi diferente (P>0,05) entre tratamentos, entretanto foi observada uma interação TRT x GRP (P=0,03). Os embriões de vacas CON (-21 até 72 dias) apresentaram uma maior (P=0,04) metilação (0,87 ± 0,09) comparados a MET e CTL (0,44 ± 0,07). Embriões das vacas SMT apresentaram maior (P=0,04) deposição de gordura (7,02 = 1,03) comparados a CTL (3,61 ± 1,20). Não houve diferença (P>0,05) no número de células por embrião, taxa de recuperação embrionária, número de embriões recuperados, qualidade embrionária, estágio de desenvolvimento embrionário e número de CL por lavagem (CTL: 61.48±5.12, 0.69 %, 7.69±1.39, 1.63±0.25, 3.92±0.12, 9.33±1.18; and SMT: 54.92±3.9, 0.80 %, 8.72±1.18, 1.99±0.20, 4.13±0.10, 11.47±0.99, respectivamente). A suplementação com metionina, colina ou a combinação de ambas afeta a metilação embrionária e a deposição de gordura.

SBTE 155 OPU-FIV e TE

Efeito da utilização do sistema de maturação *in vitro* spom sobre o escore lipídico de embriões bovinos

Gabriela Ramos Leal[1]; Clara Ana Santos Monteiro[2]; Helena Fabiana Reis De Almeida Saraiva[1]; Paola Maria Da Silva Rosa[2]; Agostinho Jorge Dos Reis Camargo[3]; André Luís Rios Rodrigues[1]; Carlos Otávio De Paula Vasconcelos[1]; Luiz Altamiro Garcia Nogueira[1]; Clara Slade Oliveira[4]; Raquel Varella Serapião[3]
1.Universidade Federal Fluminense; 2.Embrapa Gado De Leite; 3.Pesagro-Rio; 4.Embrapa Gado De Leite -LRA CESM.

Palavras-chave: Escore lipídico; forskolin; embrião bovino

A qualidade oocitária determina a proporção de oócitos que se desenvolverão até blastocisto, e embora o teor de lipídios seja importante no desenvolvimento do oócito, a alta concentração desses em embriões está associada à redução da criotolerância, tornando essa uma questão relevante para os sistemas de PIVE. O sistema de maturação *in vitro* (MIV) Simulated Physiological Oocyte Maturation (SPOM) mimetiza os eventos fisiológicos da maturação pelo uso de moduladores de AMPc que promovem o aumento da competência oocitária. Dentre os moduladores, está o Forskolin, que possui ação delipidante. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do sistema SPOM (Albuz, Hum. Reprod,v25, p12; 2010) sobre o escore lipídico embrionário (relação entre conteúdo lipídico e número total de células,NTC). Foram realizadas quatro repetições em que os oócitos foram obtidos de ovários de abatedouro, selecionados e distribuídos aleatoriamente em 3 grupos: SPOM, CONTROLE 1 (C1) e CONTROLE 2 (C2). A MIV durou 24h no C1 (meio TCM 199 sem SFB) e C2 (meio comercial Bioklone® Reprodução Animal, São Paulo, Brasil/com SFB) em estufa de cultivo a 38,5ºC, 5% de CO2 em ar atmosférico e alta umidade. Já no SPOM, os oócitos ficaram por 2h, na pré-MIV(Meio TCM 199 com 100µM Forskolin e 500µM IBMX) e seguiram para a MIV estendida (meio convencional+ 20µM de cilostamide) por 28h sob as mesmas condições dos outros grupos. Após a MIV, os oócitos foram fertilizados, e seguiram para as gotas de cultivo, onde permaneceram por 7 (n= 25-46 por grupo) ou 9 dias (n=6-9 por grupo). A análise do conteúdo lipídico foi realizada pela coloração com Oil Red e o NTC foi mensurado após coloração com HOECHST 33342. O escore lipídico foi obtido pela área de lipídeos corada dividida pelo NTC de cada embrião e as médias foram comparadas de acordo com o dia (D7 ou D9), para cada tratamento, pelo teste Kruskal-Wallis no programa Instat GraphPad, a nível de significância de 5%. Não houve diferença ($P<0,05$) entre os grupos (SPOM: 298,5± 139,9; C1: 226,0 ±75,7; C2: 211,3 ±100,3) no D7, sugerindo que o tempo de exposição ao Forskolin não foi suficiente para que houvesse ação delipidante. No D9, apenas o C2 demonstrou aumento em relação aos demais (SPOM: 154,0±27,1a; C1: 135,7±26,2a; C2: 291,8±71,4b); possivelmente devido ao efeito do SFB sobre o acúmulo lipídico. Entre o D7 e o D9, houve redução ($P<0,05$) do escore lipídico no grupo SPOM (298,5±139,9 vs 154,0±27,1) e C1 (226,0 ±75,7 vs 135,7±26,2), que pode ser explicado pelo aumento do consumo metabólico embrionário com o avançar do desenvolvimento. Por sua vez, o C2 (211,3 ±100,3 vs 291,8 ±71,4) não diferiu ($P>0.05$) entre os dias, sugerindo que o efeito do SFB sobre o acúmulo lipídico foi maior que a atividade metabólica dos embriões. Concluiu-se que o sistema SPOM não exerceu efeito sobre o índice de escore lipídico dos embriões produzidos.
APOIO FINANCEIRO: FAPERJ (E26/111.155/2013), FAPEMIG e CAPES.

SBTE 156 OPU-FIV e TE

Efeito de dietas com diferentes níveis de proteína degradável e não degradável no rúmen na apoptose de oócitos e células do cumulus-oophurus de vacas girolando

Luciano De Rezende Carvalheira[1]; Jasmin Jasmin[2]; Gustavo Bervian Santos[1]; Clóvis Ribeiro Guimarães[3]; Bruna Rios Coelho Alves[4]; Fernanda Samarini Machado[4]; Mariana Magalhães Campos[4]; André Luís Rios Rodrigues[1]; Luiz Altamiro Garcia Nogueira[1]; Bruno Campos De Carvalho[4]
1.Universidade Federal Fluminense; 2.Universidade Federal Do Rio De Janeiro; 3.Universidade Federal De Minas Gerais; 4.Embrapa Gado De Leite.

Palavras-chave: Reprodução; uréia; nutrição

A amônia produzida no rúmen durante a degradação proteíca e não utilizada na síntese de proteína microbiana, é absorvida pela parede ruminal e convertida em uréia no fígado. Elevadas concentrações séricas de uréia e amônia provocam o aumento das mesmas em tecidos e fluidos reprodutivos, interferindo negativamente na fertilidadee produção *in vitro* de embriões. Este trabalho objetivou avaliar o efeito de dietas com diferentes níveis de proteína degradável (PDR) e não degradável no rúmen (PNDR) sobre apoptose de oócitos e células do cumulus-oophorus em vacas mestiças Girolando. Foram avaliadas 22 vacas Girolando (n=10 3/4 HG; n=12 7/8 HG) com peso médio 475,8±7,75 Kg, ECC 3,22±0,03 e 105,33±23,15 dias pós-parto. Os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais alimentados duas vezes ao dia, por 68 dias, com dieta total a base de silagem de milho e concentrado. A dieta de cada grupo variou na relação entre PDR:PNDR, com manutenção da proteína metabolizável (1888g/dia) e redução da proteína bruta (PB) (PDR:PNDR1,68= 15,4% PB, 62,7% PDR, 37,3% PNDR; PDR:PNDR1,31= 13,6% PB, 56,7% PDR, 43,3% PNDR; PDR:PNDR1,08= 13% PB, 52% PDR, 48% PNDR; PDR:PNDR0,83= 12,4% PB, 45,4% PDR, 54,6% PNDR). OPU's foram realizadas nos dias 33 e 63 após o início dos tratamentos. A onda folicular foi sincronizada 72 horas antes por punção de todos os folículos presentes em ambos os ovários. Os complexos cumulus-oócito (COC) foram recuperados em meio PBS com 20 UI/mL de heparina, classificados como viáveis (graus 1, 2 e 3) e não viáveis. Os COC viáveis foram fixados em formalina 10%, álcool PVA, agrupados por tratamento, dia de coleta e corados com DAPI e TUNEL (Promega, Wisconsin, USA). As estruturas foram fotografadas em microscópio de fluorescência confocal Leica TCS SP5II (Leica Microsystems®, Wetzlar, Germany) em aumento de 40x. Imagens obtidas a cada 16µm foram avaliadas no software Leica LAS AF Lite. Foram avaliados o número e índice de células do cumulus apoptóticas e percentual de oócitos apoptóticos. As variáveis foram submetidas a análise de variância, utilizando um modelo linear generalizado (PROC GLM) e as médias foram comparadas pelo teste t de Student (P<0,05). Foram recuperados 78 COC (PDR:PNDR1,68=3; PDR:PNDR1,31=19; PDR:PNDR1,08=21; PDR:PNDR0,83=35). Não foi encontrado efeito significativo no número de células do cumulus apoptóticas (PDR:PNDR1,68= 9,33±15,3; PDR:PNDR1,31= 40,94±98,76; PDR:PNDR1,08= 11,12±20,0; PDR:PNDR0,83= 4,35±10,11) e índice de células do cumulus apoptóticas (PDR:PNDR1,68= 0,027±0,02; PDR:PNDR1,31= 0,1±0,16; PDR:PNDR1,08= 0,12±0,14; PDR:PNDR0,83= 0,03±0,1), mas houve efeito no percentual de óocitos apoptóticos (PDR:PNDR1,68= 0%ab; PDR:PNDR1,31= 26,32%a; PDR:PNDR1,08= 4,76%ab; PDR:PNDR0,83= 0%b). A variação na relação PDR:PNDR da dieta interferiu na apoptose dos oócitos, porém, a maior relação PDR:PNDR não diferiu das duas menores relações.

SBTE 157 OPU-FIV e TE

Efeito do tratamento com progesterona e FSH na aspiração folicular da primeira onda folicular em ovelhas

Jose Federico Cuadro[1]; P. C. Dos Santos-Neto[1]; Diego Bosolasco[1]; Victoria Brum[2]; Martina Crispo[3]; Alejo Menchaca[1]
1.Instituto De Reproducción Animal; 2.Facultad De Veterinariaroducción Animal; 3.Instituto Pasteur De Montevideo.

Palavras-chave: Ovócito; progesterona; folículo

O objetivo deste estudo foi determinar o efeito da progesterona e FSH de liberação lenta na quantidade e qualidade de ovócitos ovinos recuperados por aspiração da primeira onda folicular. O experimento foi conduzido durante a estação reprodutiva (33 º S, Uruguay) em ovelhas Merino Australiano usando o tratamento *Day 0 protocol* para superestimular a primeira onda folicular (Menchaca et al., 2010, Reproduction Fertility and Development, Volume 22, pp 113-118). Foram inseridas esponjas intravaginais de acetato de medroxiprogesterona, (Progespon, Syntex, Argentina) durante 6 dias associados a uma dose de 125 ug de cloprostenol sódico (Ciclase DL, Syntex) e 200 UI eCG (Novormon, Syntex) administrados no momento de retirada do dispositivo, e uma dose de GnRH análogo (8.4 mg of buserelin acetate, Receptal; Hoechst, Germany) administrada 36 horas após a retirada do dispositivo. Este tratamento garante à ovulação (Dia 0 do ciclo) e a emergência da 1ª onda folicular ao redor de 72-84 horas posterior a retirada do dispositivo. Foram divididos em 4 grupos experimentais: Grupo Controle (n=21); Grupo P4 (n=24) receberam um dispositivo intravaginal com P4 (0.3 g, DICO, Syntex); Grupo FSH (n=16) receberam uma dose de 80 mg FSHp (Folltropin, Bioniche Animal Health, Canada) reconstituído em ácido hialurônico (10 ml, MAP-5, Bioniche Animal Health); e Grupo P4+FSH (n=14) que receberam um dispositivo intravaginal com P4 associado a uma dose de 80 mg FSHp in MAP-5. As aspirações foliculares foram realizadas mediante laparoscopia 72 h pós dia 0 em todos os animais e em ambos os grupos tratados com progesterona, os dispositivos intravaginais foram mantidos até o momento da aspiração folicular. Analise estatística foi realizada usando ANOVA, Kruskall Wallis teste não paramétrico e teste Qui-quadrado. Quando o tratamento com P4 foi analisado como efeito principal não se observou efeito sobre o número de folículos aspirados (4.1±0.7 vs. 3.8±0.6) e o número de ovócitos coletados (2.1±0.7 vs. 1.9±0.4) comparado ao grupo não tratado com P4. (P=NS). Quando o tratamento com FSH foi analisado como efeito principal o número de folículos aspirados aumentou (6.5±0.7 vs. 4.1±0.7; P<0.05) assim como o número de ovócitos recuperados (3.4±0.7 vs. 2.1±0.7) em comparação ao Grupo sem FSH. Foram encontradas interações entre os tratamentos (P<0,05), sendo observados resultados mais altos naquelas ovelhas do Grupo P4+FSH. Não foram encontrados efeitos sobre a taxa de recuperação e qualidade ovocitária em nenhum dos tratamentos (P=NS). Em conclusão, o tratamento com progesterona associado com uma dose de FSH em MAP-5 de liberação lenta aumenta a resposta folicular e recuperação ovocitária quando aspiramos folículos da primeira onda em ovelhas.

SBTE 158 OPU-FIV e TE

Efeito do uso de moduladores de AMPc na etapa de pré-maturação *in vitro* sobre taxas de produção e conteúdo lipídico de embriões mestiços bovinos

Helena Fabiana Reis De Almeida Saraiva[1]; Gabriela Ramos Leal[1]; Clara Ana Santos Monteiro[1]; Paola Maria Da Silva Rosa[2]; Agostinho Jorge Dos Reis Camargo[3]; Raquel Varella Serapião[3]; Felipe Zandonadi Brandao[1]; Clara Slade Oliveira[2]
1.Universidade Federal Fluminense; 2.Embrapa Gado De Leite; 3.PESAGRO-RIO.

Palavras-chave: Forskolin; piv; bovinos

O sistema Simulated Physiological Oocyte Maturation (SPOM; Albuz, Hum. Reprod, v. 25, p. 12; 2010) foi desenvolvido para melhorar a qualidade dos oócitos a partir da utilização de moduladores de AMPc, entre os quais temos o forskolin, que também possui ação delipidante, desejável para estruturas destinadas à criopreservação. Neste sistema, duas etapas são propostas: pré-MIV e MIV extendida. O objetivo deste estudo foi avaliar o emprego apenas da etapa de pré-MIV associada ao uso dos moduladores forskolin e IBMX sobre as taxas de produção e conteúdo lipídico de embriões bovinos mestiços produzidos *in vitro*. Os COCs, obtidos de ovários de matadouro em três repetições, foram selecionados quanto ao número de células do cumulus e homogeneidade do citoplasma e distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais: controle [GC, n=84; MIV convencional por 24h em meio de maturação comercial (Bioklone® Reprodução Animal, São Paulo)] e pré-MIV [GPM, n=99; pré-MIV por 2h em meio pré-MIV (TCM 199-Hepes, BSA 1,6mg/mL, piruvato de sódio 100mM, ITS 100x, penicilina 10.000UI, estreptomicina 10mg/mL, forskolin 100µM e IBMX 500µM) seguida de MIV convencional]. Após a MIV, os grupos foram submetidos no mesmo horário à FIV em meio TALP e CIV em meio SOF, ambos da Bioklone®. As taxas de clivagem e de blastocisto foram avaliadas no D3 e D7, respectivamente. Os blastocistos obtidos foram fixados em PFA 4% no D7 e armazenados a 4°C até serem submetidos à coloração pela técnica de Oil Red para avaliação de conteúdo lipídico, com análise de fração de área corada pelo programa ImageJ. As taxas de clivagem e blastocistos foram comparadas pelo teste exato de Fisher (médias diferentes identificadas com letras distintas), e as médias de fração de área corada para lipídeos comparadas pelo teste Mann Whitney. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa Instat GraphPad, considerando-se um nível de significância de 5%. Não houve diferença ($p>0.05$) entre as taxas de clivagem do GC e GPM (80,95%a - 68 vs 82,83%a - 82), taxa de blastocisto/oócitos totais (39,28%a - 33 vs 28,28%a - 28) e taxa de blastocisto/clivados ($p=0,0951$; 48,53%a vs 34,14%a) respectivamente. A média de fração de área corada para lipídeos para o GC foi 30,60 ± 5,48 vs 40,23 ± 4,01 para o GPM ($p>0.05$). Estes resultados sugerem que, isoladamente do sistema SPOM e empregada em sistema de PIVE com meio comercial, a pré-MIV não resultou em melhoria nas taxas de produção, tampouco o efeito delipidante do forskolin observado no conteúdo lipídico dos blastocistos submetidos a esta etapa.
APOIO FINANCEIRO: Faperj E26/200.710/2014

SBTE 159 OPU-FIV e TE

Efeitos da seleção espermática em camada única de percoll®, antes da congelação, sobre as características cinéticas de espermatozoides bovinos pós-descongelação

Jaqueline Poleto Bragato[1]; Fernanda Nunes Marqui[2]; Tatiana Issa Berton[3]; Yamê Fabres Robaina Sancler-Silva[2]; Edjalma Rodrigues Silva-Junior[2]; Diego Gouvêa Souza[2]; Mateus José Sudano[2]; Daniela Martins Paschoal[2]; Fernando Franco Polizel[1]; Alício Martins Jr[1]
1.FMVA - UNESP; 2.FMVZ - UNESP; 3.Tairana Inseminação Artificial.

Palavras-chave: Seleção espermática; cinética espermática; gradiente de percoll

O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos da seleção espermática, através de centrifugação em camada única de Percoll® a 90% (CCUP), antes da congelação do sêmen, avaliando-se os parâmetros cinéticos dos espermatozoides pós-descongelação, mediante análise computadorizada. O sêmen de três touros da raça Nelore (três ejaculados de cada touro), mantidos em centro de coleta e processamento de sêmen, foi coletado através de vagina artificial. No dia de cada coleta, após a avaliação espermática de rotina, o ejaculado de cada touro foi misturado e dividido igualmente na concentração de 1.000 x 106 de espermatozoides (independentemente do volume) entre o grupo controle (P0; sem CCPU) e os grupos P9 e P6, os quais foram submetidos à centrifugação em tubos de 15 mL com 9 mL e 6 mL de Percoll®, respectivamente. Após a centrifugação (700 x g/13 min) o sobrenadante foi removido e o "pellet" de espermatozoides diluído em meio de congelação (tris-frutose, ácido cítrico, gema, glicerol e antibióticos). A seguir, palhetas de 0,5 mL foram envasadas com 25 x 106 de espermatozoides, refrigeradas por cinco horas, em câmara fria, a 4º C e, então, congeladas em congelador programável (Digitcool, IMV, França). Decorridos 30 dias da estocagem, quatro palhetas de cada grupo e de diferentes coletas foram descongeladas em água a 46º C/20 s e, imediatamente, avaliadas quanto à cinética espermática (CASA, Hamilton Thorne®, Beverly, EUA). Os seguintes parâmetros foram analisados: motilidade progressiva (MP; %), velocidade curvilínea (VCL; µm/s), velocidade média de trajeto (VAP; µm/s), velocidade linear progressiva (VSL; µm/s), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH; µm), frequência de batimento flagelar cruzado (BCF; Hz), retilinearidade (STR; %), linearidade (LIN; %) e rapidez (RAP; %). ANOVA e teste de Tukey foram empregados para a análise dos resultados, com valores expressos em média±desvio padrão, e com P<0,05 aceito como significativo. Diferença significativa (P<0,05) foi observada entre os grupos P0 e P9, respectivamente, para as variáveis ALH (5,67±0,24 vs. 5,1±0,26), BCF (26,7±0,72 vs. 30,2±1,19), LIN (52,0±2,16 vs. 62,5±2,88) e STR (81,7±2,63 vs. 88,8±1,6). Entretanto, nenhuma diferença foi constatada entre todos os grupos para as variáveis MP, VCL, VSL, VAP e RAP. Os resultados de P6 foram similares àqueles obtidos nos grupos P0 e P9. Com base nos resultados, CCUP foi efetiva na identificação de subpopulações de espermatozoides com diferentes características cinéticas, as quais podem determinar aumento na taxa de oócitos fertilizados em programas de PIV de embriões. Outras análises em progresso, incluindo integridade de membrana acrossomal, função mitocondrial, determinação de ROS intracelular, peroxidação lipídica de membrana e FIV, permitirão maiores esclarecimentos sobre o protocolo proposto. Agradecimentos: FAPESP (processo no. 2014/19261-1) e Tairana Inseminação Artificial, Presidente Prudente, SP.

SBTE 160 OPU-FIV e TE

Efeitos moleculares e celulares de exossomos do fluido folicular de vacas nelore submetidas à superestimulação ovariana

Fernanda Fagali Franchi[1]; Patrícia Kubo Fontes[1]; Priscila Helena Santos[1]; Juliano Coelho Da Silveira[2]; Marcelo Fabio Gouveia Nogueira[1]; Ciro Moraes Barros[1]; Anthony César Souza Castilho[1]
1.UNESP; 2.USP.

Palavras-chave: Exossomos; superestimulação ovariana; maturação *in vitro*

A comunicação célula-célula dentro do folículo ovariano envolve diversas moléculas de sinalização, e este processo pode ser mediado pela secreção e captura de exossomos (Exo) que contêm várias moléculas bioativas. Assim, para ampliar os conhecimentos sobre os efeitos dos tratamentos de superestimulação nos ovários bovinos, Exo obtidos do fluido folicular de vacas Nelore (*Bos taurus* indicus) submetidas à superestimulação ovariana por FSH (protocolo P36) e Exo de vacas apenas sincronizadas foram adicionados durante a maturação *in vitro* (MIV) para avaliar a maturação nuclear, fragmentação do DNA e abundância de mRNA de complexos cumulus-oócito (CCOs) bovinos. Vacas Nelore foram abatidas, o fluido de folículo pré-ovulatório aspirado e os Exo foram obtidos por ultracentrifugação. Cinco réplicas de CCOs (20 CCOs/grupo) foram maturados *in vitro* por 22-24h em TCM 199 suplementado com BSA, FSH, estradiol, amicacina, piruvato e: 10% Exo de vacas Não-Superestimuladas (grupo Exo-NS); 10% Exo de vacas P36 (grupo Exo-P36) ou sem Exo (grupo controle). No experimento 1 (Exp.1), após a maturação, os oócitos foram submetidos ao ensaio de TUNEL e corados com Hoesch-33342. No experimento 2 (Exp.2), os oócitos e suas células do cumulus foram submetidas à extração de RNA total e transcrição reversa com random primer, separadamente. A abundância de RNAm de H2AFZ e PDE3 em oócitos; GREM1 e COX2 no cumulus; e GDF9 e BMP15 em ambos tipos celulares foi mensurada por RT-qPCR utilizando o sistema SYBR green e normalizada pela expressão do gene endógeno mais estável: ciclofilina A (PPIA). A abundância de RNAm (gene alvo/PPIA) foi calculada usando o método $\Delta\Delta Ct$ corrigido pela equação de Pffafl. Os efeitos da adição de Exo sobre a progressão da meiose (%), as taxas de apoptose (%) e abundância de RNAm dos genes alvos foram testados por análise de variância ($p \leq 0,05$: diferença significativa e $0,05 < p < 0,10$: tendência). No Exp.1, não houve diferença nas taxas de apoptose em oócitos maturados, no entanto, a adição de Exo-P36 tendeu a aumentar o percentual de oócitos em meiose II (74±3,2) quando comparado com o grupo Exo-NS (60,2±4,5; p=0,09). No Exp.2, não houve diferença ($p > 0,10$) na abundância de RNAm de GDF9, BMP15, H2AFZ e PDE3 nos oócitos, no entanto, a abundância de RNAm de GDF9 tendeu a ser maior nas células do cumulus tratadas com Exo-P36 (20,3±13,16) quando comparada ao controle e Exo-NS (2,2±0,8; 4,1±3,2; p=0,06). Assim como a abundância de RNAm de BMP15 também tendeu a ser maior nas células do cumulus tratadas com Exo-P36 (5,7±3,2), quando comparada ao controle e Exo-NS (0,8±0,5; 1,2±1,2; p=0,06). Em conclusão, os efeitos da adição de Exo-P36 durante a MIV mostraram que a superestimulação ovariana usando FSH parece modular o conteúdo do fluido folicular de bovinos e, consequentemente, isso poderia ser usado para melhorar a competência do oócito *in vitro* através do aumento da progressão da meiose e expressão gênica de GDF9 e BMP15. Apoiado pela FAPESP.

SBTE 161 OPU-FIV e TE

Efeito do cultivo *in vitro* no tamanho e sexo de embriões bovinos no D14 de desenvolvimento

Ana Luiza Silva Guimarães[1]; José Oliveira Carvalho[2]; Ligiane Oliveira Leme[1]; José Felipe Warmling Sprícigo[1]; Ivo Pivato[1]; Margot Alves Nunes Dode[3]
1.Universidade De Brasilia; 2.Universidade De São Paulo- Usp; 3.Embrapa Recursos Genéticos E Biotecnologia.

Palavras-chave: Embriões; sexagem; produção *in vitro*

Vários estudos têm sido realizados visando avaliar o efeito do cultivo na qualidade de embriões produzidos *in vitro*. A maioria desses estudos utiliza como método de avaliação a produção de blastocisto até o dia 7 (D7) ou dia 8 (D8) de desenvolvimento. Poucos estudos focam em estágios mais avançados do embrião, ou mesmo se o cultivo *in vitro* afeta o desenvolvimento embrionário após a transferência do embrião para a receptora. Dentro dessa perspectiva, avaliação de embriões no dia 14 (D14) de desenvolvimento permite uma avaliação mais acurada da qualidade dos mesmos, produzidos por diferentes técnicas de reprodução assistida ou aqueles que foram submetidos a diferentes tratamentos e manipulações. O objetivo desse estudo foi avaliar se a produção *in vitro* de embriões (PIVE) afeta o tamanho e o sexo de embriões em um estágio mais avançado do desenvolvimento (D14). Para a PIVE, ovócitos obtidos de ovários de abatedouro foram maturados, fecundados (D0) e cultivados *in vitro* até D7. No D7 de cultivo os blastocistos grau um foram selecionados e transferidos em número de 15 para o corno uterino de receptoras previamente sincronizadas (grupo vitro/vivo). Como controle, foram utilizados embriões coletados no dia 7 pós-inseminação de doadoras superestimuladas. Após a lavagem uterina os blastocistos em estágio e qualidade semelhante aos *in vitro* foram transferidos em número de 12 para receptoras sincronizadas (grupo vivo/vivo). Embriões de ambos os grupos foram coletados em D14 e mensurados individualmente. Posteriormente, foi realizada biópsia do trofoblasto de cada embrião, sendo a biópsia armazenada para a extração do DNA genômico e determinação do sexo. A taxa de recuperação dos embriões e os dados de proporção macho:fêmea entre embriões produzidos *in vivo* ou *in vitro* foi analisado pelo teste do Qui-quadrado ($P<0,05$) e as mensurações dos embriões foram comparadas utilizando o teste de Kruskal-Wallis ($P<0,05$) pelo programa Prophet 5.0. Observou-se uma maior taxa de recuperação de embriões do grupo vitro/ vivo (45,5%±55,8) em relação ao grupo vivo/vivo (26,7±55,1). Entretanto, quando analisa a proporção de embriões macho:fêmea do grupo vitro/vivo (28:19) e do grupo vivo/vivo (12:12), nenhuma diferença foi detectada. Em relação ao tamanho dos embriões coletados em D14, não foi encontrada diferença entre embriões machos e fêmeas produzidos *in vitro* (722,6±116,8 e 608,2±121,3, respectivamente) ou *in vivo* (1194,9±244,3 e 1181,5±214,7, respectivamente). Além disso, o tamanho dos embriões machos e fêmeas provenientes do mesmo grupo também foram semelhantes. Esses resultados sugerem que os embriões em D14 de desenvolvimento não são afetados pelo cultivo *in vitro*, pois não sofrem alteração na proporção macho/fêmea), nem no tamanho quando comparados aos produzidos *in vivo*.
Apoio Financeiro: CNPq/FAP-DF e CAPES

SBTE 162 OPU-FIV e TE

Efeito do inibidor da enzima conversora de angiotensina na taxa de blastocisto bovino

José Adalmir Torres Souza[1]; Antonio Sousa Junior[1]; Yndyra Nayan Teixeira Carvalho[1]; Luis Harliton Cavalcante Monteiro Mota[1]; Isolda Marcia Rocha Do Nascimento[1]; Marlon De Araújo Castelo Branco[1]; Leopoldina Almeida Gomes[1]; Filipe Barros Nunes[1]; Amilton Paulo Raposo Costa[1]; Felipe Jesus Moraes Jr[2]
1.Universidade Federal Do Piauí; 2.Universidade Estadual Do Maranhão.

Palavras-chave: Captopril; angiotensina; piv.

O desempenho reprodutivo dos rebanhos necessita de conhecimentos aprofundados da endocrinologia da reprodução ovariana, *in vivo* e *in vitro*. O sistema renina agiotensina (SRA) é bastante conhecido como regulador da pressão arterial e tem sido descrito em muitos órgãos e tecidos. O captopril é um inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA), que impede a angiotensina I (Ang. I) de ser convertida em angiotensina II (Ang. II). A Ang. II é capaz de reverter o efeito inibitório das células foliculares sobre a maturação nuclear *in vitro* de oócitos bovinos e melhora a maturação citoplasmática dos complexos cumulus oócitos (CCOs). O objetivo do estudo foi avaliar o efeito do captopril na taxa de blastocisto bovinos. Foram utilizados CCOs de fêmeas bovinas provenientes de abatedouros do município de Teresina-PI. Foram utilizados 472 CCOs, distribuídos em quatro grupos experimentais: G1 (n=58) – 0 µM de captopril; G2 (n=83) - 5µM de captopril; G3 (n=81) - 10µM de captopril; e G4 (n=78) 15µM de captopril no meio de maturação. Após a maturação, 300 CCOs foram co-incubados com espermatozóides em temperatura de 38,5ºC por 20 horas, em 5% de CO2. Os presumíveis zigotos foram isolados das células do cúmulo mediante sucessivas aspirações e lavados três vezes em meio SOF (Nutricell®), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB). Posteriormente os mesmos foram transferidos para uma placa de Petri 60 x 15 mm, contendo microgotas de 100 µL de meio SOF (Nutricell®) suplementado com 5% de SFB e mantidos em estufa à temperatura de 38,5ºC, em 5% de CO2, durante 7 dias. No quinto dia de cultivo foi realizado o feeding (troca de 50% do meio SOF por um novo previamente estabilizado). A avaliação da taxa de blastocisto foi realizada após 168 horas (D7) do cultivo. As taxas de blastócitos foram avaliadas pelo teste não paramétrico de Qui-Quadrado (X^2). A utilização de distintas concentrações de captopril no meio de cultivo não alterou a taxa de blastocisto, pois não houve diferença estatística entre os grupos experimentais (G1=37%; G2= 48%; G3=53% e G4=62%). Conclui-se que a suplementação do meio de maturação com captopril não melhorou a taxa de blastocisto.

SBTE 163 OPU-FIV e TE

Efeito do resveratrol no meio de fecundação *in vitro* sobre a viabilidade espermática em bovinos

Carolina Marinho De Assunção[1]; Thamiris Dornelas Araújo[1]; Eliza Diniz De Souza[2]; João Gabriel Viana De Grázia[3]; Vivian Rachel Araújo Mendes[4]; João Henrique Moreira Viana[5]; Nadia Barbosa Rezende Raposo[1]; Luiz Sérgio De Almeida Camargo[5]
1.UFJF; 2.UFES/RENORBIO; 3.UFMG; 4.UFV; 5.Embrapa Gado De Leite.

Palavras-chave: Antioxidante; acrossoma; espermatozóide

Apesar do grande número de pesquisas serem voltadas para o efeito protetor dos antioxidantes na criopreservação do espermatozoide, poucos estudos envolvendo seus efeitos sobre a célula espermática na fecundação *in vitro* (FIV) têm sido realizados. O resveratrol (trans-3,5,4-tri-hidroxi-trans-estilbeno) é um composto encontrado em diversas espécies de plantas e possui várias propriedades farmacológicas dentre elas eficácia antioxidativa. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de resveratrol em meio de fecundação *in vitro* sobre a viabilidade espermática e integridade do acrossoma por período de até 24h. O sêmen foi descongelado à temperatura entre 35°-37°C e separados por método de gradiente de Percoll (90 e 45%). Os mesmos foram distribuídos nos seguintes tratamentos, de acordo com a concentração de resveratrol, em meio FERT: R0 (controle – 0µg/mL), R1 (7,5µg/mL), R2 (15µg/mL) e R3 (30µg/mL), e incubados em estufa a 38,5°C, 5% de CO2 e 95% de umidade na concentração de 10x106 espermatozoides/mL por 24h. Foram avaliadas as proporções de espermatozoides vivos e mortos, com acrossoma intacto e reagido, através do método de coloração azul de trypan-giemsa em intervalos de 6, 12 e 24h. Três repetições em triplicata foram avaliadas. Os dados foram analisados por ANOVA e as médias comparadas por Student-Newman-Keuls. Valores são mostrados como média±EPM. A proporção de espermatozoides vivos reduziu entre 6 e 24h de incubação nos tratamentos e controle (P>0,05), com uma queda acentuada entre os tempos de 6h (R0=23,8±1,7%; R1=27,9±2,5%; R2=28,3±1,7%; R3=24,7±2,8%) e 12h (R0=7,5±0,7%; R1=9,8±1,4%; R2=9,0±0,6%; R3=7,8±0,7%). Entretanto, não houve diferença significativa na proporção de espermatozoides vivos entre as diferentes concentrações de resveratrol e o controle, nos tempos de 6, 12 e 24 (P<0,05). O resveratrol, em todas as concentrações testadas, aumentou (P<0,05) a proporção de espermatozoides vivos com acrossoma reagido em relação ao controle, principalmente com 6h (R0=15,2±1,3%; R1=22,9±1,8%; R2=23,7±1,8%; R3=20,9±2,8%) e com 12h (R0=3,1±0,4%; R1=6,1±0,6%; R2=4,5±0,6%; R3=4,8±0,5%) de incubação. Em conclusão, as concentrações avaliadas de resveratrol não evitam a queda na viabilidade espermática em meio de fecundação *in vitro* dentro de um período de incubação de 6 e 24h e elevam o número de espermatozoides vivos com acrossoma reagido, mostrando possuir efeito sobre a integridade do acrossoma espermático. Apoio financeiro: Fapemig, CAPES, CNPq, Embrapa

SBTE 164 OPU-FIV e TE

Efeito do tempo de tratamento de FSH (4d vs 7d) na resposta superovulatória de vacas holandesas em lactação

Cesar Diniz Narciso[1]; Elliot Martinez[1]; Rafael Ruggeri[1]; Alvaro Garcia-Guerra[2]; Yeda Fumie Watanabe[1]; Marina Chiba[1]; Emiliana Oliveira Santana Batista[3]; Milo Wiltbank[2]; Reuben John Mapletoft[4]; Alexandre Henryli Souza[5]
1.Vitrogen West; 2.University Of Wisconsin; 3.USP; 4.University Of Saskatchewan; 5.Ceva Saúde Animal.

Palavras-chave: Fsh; superovulação; vaca leiteira

O objetivo do estudo foi avaliar se o tratamento prolongado com FSH melhora a resposta superovulatória de vacas de leite. Vacas (n=89) da raça holandês com 63 (±3) dias em lactação e média de produção de 40,2 ± 5,2 kg/dia foram submetidas a dois protocolos de superovulação aos : 1) Protocolo curto (FSH4d): D0 = 2mg de BE e inserção do CIDR, D4 a D7 = 400 mg of FSH (Folltropin®) aplicados AM/PM, D6 e D7 AM = PGF2alfa e remoção do CIDR no momento do segundo tratamento com PGF2alfa ou 12h antes da última injeção de FSH, D8 AM = GnRH e IA 12 e 24h após o GnRH com sêmen convencional do mesmo touro produzido do mesmo ejaculado. O Protocolo longo (FSH7d) seguiu a mesma sequencia de tratamento e a dose de 400 mg foi estendida de modo a ser aplicada em 7 dias. As vacas foram inseminadas pelo mesmo técnico e a lavagem uterina para coleta de embriões ocorreu 7 dias após o GnRH por 3 técnicos. A classificação dos embriões foi realizada por um único técnico segundo recomendações da IETS, sem conhecimento do grupo experimental. Os dados foram analisados pelo procedimento Glimmix do SAS (versão 9.3), assumindo distribuição do tipo Poisson para maioria das variáveis resposta e utilizando a vaca como unidade experimental. Os resultados para os grupos FSH4d e FSH7d foram, respectivamente: número total de CL (FSH4d = 12,0 ± 0,8 vs FSH7d = 12,9 ± 0,8; P=0,22); número total de estruturas (FSH4d = 4,8 ± 0,5 vs FSH7d = 4,5 ± 0,6; P=0,49); porcentagem de fertilização (FSH4d = 83,8 ± 5,0 vs FSH7d = 92,3 ± 4,0; P=0,18); número total de embriões transferíveis (FSH4d = 1,8 ± 0,4 vs FSH7d = 2,4 ± 0,6; P=0,43); número total de embriões congeláveis (FSH4d = 1,3 ± 0,3 vs FSH7d = 2,1 ± 0,5; P=0,43); porcentagem de degenerados dos fertilizados (FSH4d = 41,4 ± 6,2 vs FSH7d = 43,6 ± 6,4; P=0,79). Estes resultados sugerem que o uso do protocolo de tratamento estendido de FSH não melhorou a produção de embriões em vacas Holandesas de alta produção. Agradecimentos: Vetoquinol-Bioniche, Canada pelo fornecimento do Folltropin-V®.

SBTE 165 OPU-FIV e TE

Estabelecimento e acompanhamento da gestação em vacas da raça holandesa após transferência de embrião produzido *in vivo* ou *in vitro*

Camila Bortoletto[1]; Cecilia Rodrigues Alves Silveira[1]; Carlos Alberto Rodrigues[2]; Péricles Ricardo Lacerda E Silva[2]; Augusto Castro Neto[3]; Lais Mendes Vieira[4]; Amanda Prudêncio Lemes[1]; Pietro Sampaio Baruselli[4]; Lindsay Unno Gimenes[1]
1.FCAV - UNESP; 2.CLÍNICA SAMVET; 3.BIOEMBRYO; 4.FMVZ-USP.

Palavras-chave: Perda gestacional; prenhez; vacas leiteiras

No presente estudo o objetivo foi avaliar o estabelecimento e a manutenção da gestação até o parto de embriões produzidos *in vivo* (SOV) ou *in vitro* (PIV), oriundos de doadoras da raça Holandesa (HPB) lactantes (LAC) ou não (NLAC) e transferidos para receptoras HPB pluríparas (PLU) ou primíparas (PRIM). Os dados foram obtidos de uma fazenda comercial (Agrindus S/A, Descalvado-SP) durante o ano de 2013. Foram realizadas 2225 transferências de embriões, sendo 1337 embriões provenientes do processo de superovulação e transferidos a fresco (SOV-F); 474 embriões provenientes do processo de superovulação e transferidos descongelados (SOV-D) e 444 embriões produzidos *in vitro* e transferidos a fresco (PIV). O diagnóstico de gestação foi realizado por exame ultrassonográfico aos 30 dias (DG30) e a confirmação da prenhez por palpação retal aos 60 dias (DG60). Perdas gestacionais entre os 30 e 60 dias e entre os 60 dias e o parto também foram registradas. Os dados foram analisados utilizando-se o procedimento GLIMMIX do SAS 9.2®, considerando categoria (LAC e NLAC), paridade (PLU e PRIM) e técnica de produção de embrião (SOV-F, SOV-D, PIV) no modelo matemático e apresentados na forma de média dos quadrados mínimos (média ajustada pelo modelo). As receptoras que receberam embriões SOV-F apresentaram DG30 superior aos das receptoras que receberam embriões SOV-D e PIV [SOV-F: 48,0% (632/1337); SOV-D: 14,3% (64/474); PIV: 31,6% (138/444); P <0,0001], bem como DG60 [SOV-F: 36,8% (488/1337); SOV-D: 10,7% (50/474); PIV: 21,8% (99/444); P<0,0001]. Não foram observadas diferenças na perda gestacional entre 30 e 60 dias [SOV-F: 21,2% (141/632); SOV-D: 20,8% (14/64); PIV: 30,2 % (39/138); P=0,11] e na perda gestacional entre os 60 dias até o parto [SOV-F: 23,7% (120/488); SOV-D: 17,0% (9/50); PIV: 24,9% (25/99); P=0,54]. Adicionalmente, as receptoras PLU apresentaram menor DG30 [PLU: 28,9 % (519/1472); PRIM: 33,8% (315/783); P=0,015] e maior perda gestacional entre os 60 dias e o parto [PLU: 25,3% (105/392); PRIM: 18,4% (49/245); P=0,049] quando comparadas às PRIM. Por fim, os embriões oriundos de doadoras LAC apresentaram maior taxa de perda gestacional entre os 30 e 60 dias quando comparados aos embriões oriundos de doadoras NLAC [27,5% (122/490) vs. 20,7% (71/343), respectivamente; P=0,037]. Dessa forma, conclui-se que as perdas gestacionais não foram afetadas pelo tipo de embrião (*in vivo* ou *in vitro*), porém o estabelecimento de gestação aos 30 e 60 dias foi maior nos embriões produzidos *in vivo* e transferidos a fresco. O número de partos afetou a prenhez aos 30 dias e as perdas entre 60 dias e o parto, e o status lactacional da doadora influenciou a perda gestacional entre os 30 e 60 dias.

SBTE 166 OPU-FIV e TE

Expressão gênica de AREG e EREG nas células do cumulus de oócitos bovinos maturados *in vitro* em meio suplementado com SFB, BSA ou PVA

Fernando Franco Polizel; Diego Gouvêa Souza; Fernanda Nunes Marqui; Andressa Vilas Boas Nogueira; Sabrina Cruz Tfaile Frasnelli; Jaqueline Poleto Bragato; Alício Martins Jr; Eunice Oba
UNESP.

Palavras-chave: Transcritos; ampirregulina; epirregulina

A análise da expressão gênica de Ampirregulina (AREG) e Epirregulina (EREG) nas células do cumulus (CC) demonstrou a importância desses genes na regulação da ovulação e expansão das CC. Este estudo foi realizado com a finalidade de quantificar os transcritos de AREG e EREG nas células do cumulus de oócitos bovinos cultivados em meio de maturação *in vitro* (MIV), suplementado com SFB, BSA ou PVA, bem como nas CC de oócitos imaturos. Folículos (2 a 7 mm de diâmetro) foram puncionados a partir de ovários obtidos em abatedouro; os oócitos foram, então, divididos em dois grupos, a saber: oócitos imaturos e oócitos maturados *in vitro*. Todos os reagentes utilizados foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA), exceto quando especificado. Os oócitos foram, posteriormente, lavados e selecionados em PBS com 10% de SFB (Nutricell®, Campinas, Brasil), sendo que para a MIV, grupos de 20-25 oócitos foram cultivados em Meio 199, acrescido de bicarbonato de sódio, piruvato de sódio, penicilina, FSH e LH (Bioniche Inc., Canadá), além de estradiol, cisteamina e diferentes macromoléculas (SFB a 10%, 4 mg/mL de BSA ou 1 mg/mL PVA), a 38,8o C, em atmosfera úmida, a 5% de CO2, em ar, por 24 horas. As CC foram removidas através de sucessivas pipetagens em PBS com 0,1% de hialuronidase. As gotas contendo somente as CC foram centrifugadas (3355 x g/10 min) e congeladas em meio de extração de RNA total. A expressão gênica foi investigada por RT-PCR quantitativo, sendo normalizada pela expressão do gene constitutivo GAPDH, foram realizadas cinco repetições para cada grupo. Os resultados foram analisados através de ANOVA e teste de Tukey, com $P<0,05$ considerado como significativo. A abundância de transcritos para o gene AREG foi maior ($P<0,05$) na CC de oócitos maturados *in vitro*, na presença de SFB, em comparação com o grupo de oócitos imaturos e maturados *in vitro* em meio suplementado com PVA ou BSA. As CC de oócitos imaturos apresentaram menor expressão de EREG quando comparadas com oócitos maturados *in vitro*. Concluindo, a adição de SFB ao meio de MIV influenciou positivamente na expressão do gene AREG nas CC, provavelmente devido à sua composição complexa, agindo sozinho e/ou interagindo com alguns componentes presentes no meio de MIV. Apoio financeiro: FAPESP 2011/20514-3.

SBTE 167 OPU-FIV e TE

Identificação do vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) em líquido de lavado uterino e embriões oriundos de cabras leiteiras naturalmente infectadas

Paula Maria Pires Do Nascimentod[1]; Gustavo Bervian Santos[2]; André Oliveira Penido[1]; Jeferson Ferreira Da Fonseca[3]; Rômulo Cerqueira Leite[1]
1.UFMG; 2.UFF; 3.EMBRAPA.

Palavras-chave: Embriões *in vivo*; trasmissão caev; cabras leiteiras

A caprinocultura no Estado de Minas Gerais vem crescendo nos últimos anos, principalmente no que se refere aos sistemas intensivos com produção leiteira, fazendo-se necessária a disseminação de genética superior. As biotecnologias da reprodução são grandes aliadas para a propagação rápida de genética. Todavia, o vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) está presente na maioria das propriedades produtoras de caprinos, o que gera grande preocupação na transmissão da doença. Objetivou-se identificar a presença de genoma pró-viral e viral em amostras de líquido de lavado uterino e embriões coletados pela técnica transcervical. Foram selecionadas oito cabras com 56,0±13,4kg, escore corporal de 3,5±0,75, todas positivas no diagnóstico de "Western Blotting" para o CAEV. Realizou-se indução de estro e superovulação ovariana, segundo protocolo adaptado de Fonseca *et al*, 2006 (Acta Scientiae Veterinariae, v. 34, sul. 1). Após a coleta embrionária via transcervical, embriões que possuíam zona pelúcida íntegra foram submetidos à aspiração da massa celular interna com o auxílio de micromanipulador, sendo o produto (zona pelúcida e massa celular interna) armazenado em *RNA later* até o momento das análises laboratoriais. Foi realizada centrifugação nos líquidos das lavagens uterinas, com a identificação de um pellet ao final (pellet 1). Subsequentemente realizou-se concentração viral no líquido das lavagens uterinas e um novo pellet (pellet 2) foi identificado. Todo material adquirido nesta fase (pellet 1 e pellet 2) foi submetido à extração de genoma pró-viral e viral com o auxílio do mini kit Cador Pathogen® (Qiagen, Alemanha), juntamente com as amostras embrionárias (zona pelúcida e massa celular interna). Foi realizada síntese de cDNA nas amostras oriundas de genoma viral com a utilização da enzima M MLV, segundo as informações do fabricante. As amostras foram submetidas a PCR Nested (protocolo cedido Fieni, 2010). Identificou-se a presença de genoma pró-viral e viral em amostras do pellet 2, mas não no pellet 1 ou em amostras embrionárias (zona pelúcida e massa celular interna). Estes resultados indicam que pode estar ocorrendo replicação viral no sistema reprodutivo de cabras naturalmente infectadas, fato que até o momento não foi descrito. Entretanto, embriões oriundos das coletas não se demonstram permissivos ao vírus, mesmo quando submergidos no líquido do lavado uterino positivo. Isto pode indicar que a coleta transcervical ajuda na diluição do vírus, uma vez que estudos anteriores com embriões coletados cirurgicamente identificaram a presença do vírus no pellet 1, o que não ocorreu neste estudo.
Suporte financeiro: CNPq (projeto 553989/2010-4).

SBTE 168 OPU-FIV e TE

Influência genética e climática na taxa de gestação em receptoras de embriões bovinos

Tatimara Maria Miyauchi; Rodrigo Cesar Felicio; Tochimara Aparecida Miyauchi; Carlos Antônio De Carvalho Fernandes; Ester Siqueira Caixeta; Ana Cristina Silva De Figueiredo; Jairo Pereira Neves; Miller Pereira Palhão
UNIFENAS.

Palavras-chave: Bovino; biotecnologia; taxa de prenhez

As biotécnicas relacionadas a embriões bovinos têm sido amplamente utilizadas no Brasil, especialmente a produção *in vitro* de embriões (PIVE), cujo emprego tem crescido em raças leiteiras e doadoras de genética europeia (*Bos taurus* taurus; Viana JHV, Embrião, 51:6-10, 2012). No entanto, as taxas de gestação em receptoras de embriões apresentam variações sazonais e de acordo com a genética dos embriões PIV. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da genética do touro, da doadora e do embrião nas taxas de gestação aos 30 e 60 dias em diferentes épocas do ano. Foram avaliados dados de 2.254 inovulações de embriões PIV, produzidos num mesmo laboratório, realizadas em um período de 36 meses, numa mesma propriedade. As receptoras de origem mestiça foram mantidas em pastagem de capim Brachiária, com água e sal mineral ad libitum. Os reprodutores e as doadoras, de diferentes raças, foram agrupados pela genética, originando os grupamentos *Bos taurus* taurus (TAU), *Bos taurus* indicus (IND) e *Bos taurus* taurus x *Bos taurus* indicus (MEST). Considerou-se como verão (VE) os meses de novembro a abril e inverno (IN) os meses de maio a outubro. Os dados obtidos foram plotados em planilhas eletrônicas e as taxas de gestação comparadas pelo teste de $\chi 2$, considerando 5% de probabilidade e utilizando o programa SAS, versão 9.2. Embriões produzidos com sêmen de touros IND apresentaram resultados superiores quando comparados com touros TAU aos 60 dias (42,0 vs 36,9%; P<0,05), porém sem diferença aos 30 dias de gestação. A genética das doadoras influenciou a taxa de gestação dos dois períodos de diagnóstico, com os resultados mais baixos (P<0,05) para doadoras TAU (35,8a, 43,2b e 43,7b aos 30 dias e 31,2a, 41,1b e 40,6b aos 60 dias para TAU, IND e MEST, respectivamente). Em relação à genética do embrião, foram observadas as menores taxas de gestação (P<0,05) para embriões TAU em ambos diagnósticos (32,9a, 43,3b e 43,5b aos 30 dias e 27,4a, 41,2b, e 41,1b aos 60 dias para embriões TAU, IND e MEST, respectivamente). A época do ano, VE ou IN respectivamente, não influenciou a taxa de gestação aos 30 e 60 dias (41,4 vs 42,2 e 38,5 vs 39,6; P>0,05) quando considerados todos os embriões em conjunto. Não houve efeito do grupamento genético do embrião na taxa de gestação nos meses de IN (P>0,05). No VE, embriões com genética TAU apresentaram os piores resultados (P<0,05) nos dois diagnósticos (34,0a, 44,0b e 43,9b aos 30 dias e 29,6a, 41,2b e 40,1b aos 60 dias para TAU, IND e MEST, respectivamente). Não houve diferença na ocorrência de perda de gestação nos diferentes grupamentos ou época do ano (P>0,05). Conclui-se que a genética de animais TAU, independente se originada da doadora, sêmen ou ambos, produziu embriões com menor probabilidade de gestação. No geral, a época do ano não influencia a taxa de gestação aos 30 e 60 dias. Agradecimentos: Fapemig, Capes e CNPq.

SBTE 169 OPU-FIV e TE

Influência do status ovariano na produção *in vitro* de embriões bovinos

Edgar Ricardo Moreno[1]; Alejandra Lisset Arias[2]; Edgar Mauricio Mogollon[1]; Aldemar Chavez Rodriguez[3]; Bruno Pena Carvalho[4]; Diego Fernando Dubeibe[1]
1.UCC- GRUPONTRA; 2.UCC; 3.CORPOICA; 4.EMBRAPA.

Palavras-chave: Fertilização *in vitro*; corpo lúteo; ovários

Apesar dos avanços obtidos, a eficiência na produção de embriões em condições *in vitro* é ainda baixa. Evidencias indicam que a taxa final de blastocistos depende da qualidade dos oócitos e das células espermáticas utilizadas como matérias primas para o processo [Dieleman et al., Theriogenology, 57(1), 5-20, 2002], e no caso dos oócitos, a qualidade poderia depender mais da fonte do que das condições de cultivo no laboratório (Moussa et al., Anim Reprod Sci, 155, 11-27, 2015). Neste estudo, objetivou-se avaliar o efeito do status ovariano em vacas sobre a fertilização e produção final de embriões. Ovários de matadouros locais foram obtidos em pares correspondentes do mesmo animal e classificados em três grupos experimentais: 1) ovários com corpo lúteo (CL+); 2) sem corpo lúteo, mas com corpo lúteo no seu par correspondente (CL-); 3) ovários de vacas em anestro (NCL, não apresentavam corpo lúteo ou folículo visível em fase de divergência ou dominância no par de ovários). Após aspiração folicular, os complexos cumulus-oóctios (CCOs) recuperados foram colocados em grupos de 20 CCOs e submetidos a maturação *in vitro* (MIV) (420/grupo experimental), em estufa a 38,5 °C e 5% de CO2 e umidade saturada, em 100 µL de meio de maturação (TCM-199/10% de SFB) durante 24 horas. Em seguida, foram co-cultivados com espermatozoides durante 18 h em meio de fertilização (SOF/BSA), e finalmente, os possíveis zigotos foram postos em co-cultivo por 7 dias com células do cumulus, nas mesmas condições atmosféricas utilizadas na MIV. A formação de pronúcleos foi avaliada após 18 h de fertilização *in vitro*, mediante coloração de lacmóide. A taxa de clivagem e a formação de blastocistos foi avaliada aos 3 e 7 dias de cultivo *in vitro*, respetivamente. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis com nível de significância de 5%. Não foi observada diferença significativa na formação de pronúcleos entre os grupos experimentais. Embriões originados de oócitos obtidos de ovários de vacas em anestro (NCL) apresentaram uma taxa de clivagem menor [49,5%±3,6, (p=0,029)], quando comparada ao grupo CL- (62,2%±3,9), mas não foi observada diferença na taxa de clivagem entre embriões obtidos de oócitos provenientes de ovários com (CL+) e sem corpo lúteo (CL-) de vacas com atividade cíclica. Quanto à produção de blastocistos, não houve diferença significativa na taxa final entre os grupos NCL, CL+ e CL- (20.3±3.3, 20.9±3.2 e 16.4±2.9, respetivamente). Esses resultados sugerem que a fonte dos oócitos poderia influenciar a taxa de clivagem obtida após o processo de fertilização *in vitro*, no entanto, nas condições de cultivo avaliadas, não foi observado efeito na produção de blastocistos.

SBTE 170 OPU-FIV e TE

Influência do temperamento animal nas taxas de resposta ao protocolo hormonal e de prenhez em vacas receptoras de embriões.

Jefferson Viana Alves Diniz[1]; Rafael Augusto Satrapa[2]; João Alexandre Matos Carneiro[3]; Marcos Nereu Luckner[2]; Rosano Ramos Marcelino[4]; Samuel Catuci Fritsch[3]; Eunice Oba[3]
1.Instituto Federal Do Acre; 2.UFAC; 3.UNESP; 4.SEAP.

Palavras-chave: Temperamento; protocolo hormonal; prenhez

Objetivou-se estudar a influência do temperamento animal nas taxas de resposta ao protocolo de sincronização hormonal para transferência de embriões em tempo fixo (TETF) e de prenhez em vacas receptoras de embriões. Foram utilizadas (n=235) receptoras de embriões, autóctones do Acre, Brasil, uni ou multíparas, com idades entre 03 e 06 anos, não lactantes, criadas em regime extensivo, com água e sal mineral *ad libitum*, que passaram por processo de sincronização hormonal, tendo como base a simplificação do protocolo P36 para TETF, como se segue: em dia aleatório do ciclo estral (D0), cada uma das receptoras recebeu 1g de P4 por um dispositivo intravaginal de liberação de P4 e 2,5 mg de Benzoato de Estradiol (BE) intramuscular (IM). No D8, retirou-se o dispositivo de P4 e administrou-se por via IM 150µg de D-cloprostenol (PGF2α), 400 UI de eCG e 1mg de BE. No D16, após diagnóstico ultrassonográfico (Aloka SSD 500, Aloka, Japan) de CL presente em um dos ovários, cada receptora recebeu um embrião (blastocisto, grau 1 ou 2). Os embriões foram obtidos pela técnica de produção *in vitro* (PIV) provindos de doadoras e de touros da raça Gir leiteira. Os temperamentos foram classificados em 3 níveis: 1 – temperamento dócil, 2 – temperamento levemente agressivo e o 3 – temperamento muito agressivo, de acordo com o comportamento da receptora durante todo o processo de sincronização até o dia da transferência do embrião (D16). No estudo empregou-se o teste de Qui-quadrado. Das 235 receptoras que foram submetidas ao protocolo hormonal (TETF), 77 (33%) não apresentaram CL ao exame ultrassonográfico no D16 e dessas 53 (69%) do nível 1, 16 (21%) de nível 2 e 8 (10%) nível 3, portanto classificadas como não responsivas ao protocolo hormonal. Por sua vez, 158 (67%) vacas responderam ao protocolo, apresentando CL e sendo submetidas ao processo de transferência de embrião. Dentre os 158 embriões transferidos, 54 (34%) vacas receptoras mantiveram a prenhez. A resposta ou não ao protocolo hormonal não foi diferente estatísticamente em relação aos níveis de temperamentos. Já em relação a taxa prenhez os animais do grupo 1 (temperamento dócil) apresentaram maiores taxas (41%), quando comparados aos animais dos grupos 2 e 3 (21% e 28%; levemente e muito agressivos, respectivamente). Portanto o temperamento das receptoras não influenciou significativamente na resposta aos protocolos hormonais (P>0,05), porém influenciou na taxa de prenhez (P<0,05).

SBTE 171 OPU-FIV e TE

Inibição da metilação com 5-AZA-2'-deoxycytidine interfere no desenvolvimento de embriões bovinos derivados de oócitos submetidos ao choque térmico

Thamiris Dornelas Araújo[1]; Carolina Capobiango Romano Quintão[2]; Carolina Marinho De Assunção[1]; Eliza Diniz De Souza[3]; João Henrique Moreira Viana[2]; Luiz Sérgio De Almeida Camargo[2]
1.UFJF; 2.Embrapa Gado De Leite; 3.UFES/RENORBIO.

Palavras-chave: Metilação; estresse; pive

Modificações epigenéticas são essenciais no desenvolvimento embrionário inicial, mas pouco se sabe se o estresse térmico pode influenciá-las. O uso de moduladores epigenéticos pode auxiliar na compreensão dos efeitos da PIVE e do choque térmico no desenvolvimento. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza; Sigma, St.Louis, EUA), um inibidor de metilação de DNA, na produção de embriões bovinos derivados de oócitos submetidos ou não ao choque térmico na MIV. O Exp. 1 (NHS – sem choque térmico) avaliou o efeito de 5-aza no desenvolvimento de embriões derivados de oócitos maturados *in vitro* a 38,5ºC e 5% CO2 por 24h, e o Exp. 2 (HS – com choque térmico) avaliou o efeito de 5-aza em embriões derivados de oócitos estressados termicamente (41,5ºC por 12h em 6,5% CO2 seguido de 38,5ºC por mais 12h em 5% CO2). Seguiu-se a FIV com sêmen não sexado, e os presumíveis zigotos foram desnudados e cultivados com 0 ou 10 nM de 5-aza por 24h ou 48h em CR2aa com 2,5% SFB, 38,5ºC, 5% CO2, 5% O2 e 90% N2. Após cultivo com 5-aza os embriões seguiram cultivo em CR2aa com 2,5% SFB até completarem oito dias após a FIV. Foram constituídos os seguintes tratamentos em cada experimento: Exp.1: NHS (controle sem 5-aza; n=391); NHS24h (5-aza 24h; n=380) e NHS48h (5-aza 48h; n=379); Exp. 2: HS (controle sem 5-aza; n=329); HS24h (5-aza 24h; n=320) e HS48h (5-aza 48h; n=381). A proporção de embriões que atingiram 8 células no dia três (D3) pós-fecundação foi analisada por Qui-quadrado. As taxas de clivagem no D3 e de blastocistos no dia oito (D8) foram analisadas por ANOVA seguida de SNK e valores mostrados como média±EPM. A taxa de embriões que alcançaram 8 células no Exp. 1 foi menor (P<0,05) nos tratamentos NHS24h (28,1%) e NHS48h (33,4%) do que o controle (NHS: 42,3%). No Exp. 2 apenas HS48h (23,0%) apresentou menor (P<0,05) taxa de embriões com 8 células (HS: 34,0%) e ambos sem diferença significativa para HS24h (27,1%). Não houve (P>0,05) diferença na clivagem entre tratamentos no Exp. 1 e no Exp. 2. No Exp. 1, menor (P<0,05) taxa de blastocistos em D8 foi obtida em NHS48h (15,7±2,9%) em relação a NHS (32,2±3,4%) e NHS24h (25,8±3,9%), e no Exp. 2 menores (P<0,05) taxas de blastocistos em D8 foram obtidas em HS24h (9,5±2,2%) e HS48h (11,1±2,4%) do que no controle (HS: 21,6±3,4%). Conclui-se que a inibição da metilação do DNA por 48h em embriões derivados de oócitos maturados sob temperatura convencional interfere na produção de blastocistos (Exp. 1) enquanto esse mesmo efeito ocorre com menor tempo de exposição (24h) em embriões derivados de oócitos maturados sob choque térmico (Exp. 2). Os resultados sugerem que embriões derivados de oócitos submetidos a choque térmico são susceptíveis a modulação epigenética, mas com um efeito de tempo de exposição diferente daqueles derivados de oócitos maturados em temperatura convencional.
Apoio: CNPq, FAPEMIG, FAPES.

SBTE 172 OPU-FIV e TE

Manipulação hormonal em bezerras nelore visando a produção *in vitro* de embriões

Thaís Abritta Zacarias[1]; Ana Luiza Silva Guimarães[2]; João Ricardo Scaliante[3]; Sarah De Andrade Dias Rodrigues[4]; Margot Alves Nunes Dode[5]; Ricardo Alamino Figueiredo[5]
1.Universidade Federal De Uberlândia. Bolsista Capes/FAPEMIG; 2.Universidade De Brasília; 3.Universidade Federal De Uberlândia; 4.Universidade Estadual De Maringá; 5.EMBRAPA CENARGEN.

Palavras-chave: Manipulação hormonal; fêmeas pré-puberes; opu, pive.

A busca por manejos reprodutivos que possibilitem a inclusão de fêmeas bovinas pré-púberes na PIVE pode permitir uma aceleração do ganho genético dos rebanhos pela diminuição do intervalo entre gerações. Neste estudo objetivou-se avaliar a atividade de uma manipulação hormonal sobre as características ovarianas e a OPU (Laparoscópio Storz Xenon300W. Tuttlingen-Alemanha)/PIVE de 9 bezerras Nelore (delineamento cross-over), de 4-7 meses de idade. No grupo controle (GC, n=9) a ultrassonografia transretal (US) foi realizada diariamente (MyLab 30VetGold,Esaote, transdutor 5-7,5MHz. Génova-Itália) por 8 dias (de D0 à OPU) e feita a ablação dos majosiores folículos em D2 (5 dias antes da OPU). No grupo tratado (GT, n=9) também se realizou 8 dias de US, sendo D0 o início do tratamento (dispositivo intravaginal-0,33g Progesterona-P4. Eazi-Breed-CIDR, Pfizer Saúde Animal, Brasil) e uma injeção de 2mg de Benzoato de Estradiol (IM. Ric-BE, Tecnopec-Brasil). A partir de D4, foram administradas em 3 dias, 6 injeções (IM FSH, 12/12h: 40mg+5 doses 20mg.Total:140mg; Folltropin, Bioniche Animal Health, Belleville-Ontario, Canadá). Junto à última dose, administrou-se 2,5mg de LH (IM. Lutropin, Bioniche Animal Health, Belleville-Ontario, Canadá). A OPU foi realizada 20-24h após a última injeção de FSH (D7). Os dispositivos (P4) foram removidos após as OPU. Os COCs aspirados foram selecionados, maturados, fecundados e cultivados *in vitro* até o D7. Para controle da PIVE foram utilizados COCs obtidos de ovários de abatedouro (Grupo Abatedouro-GA). Dados de US ou de OPU foram agrupados e comparados simultaneamente entre GC vs GT em D0 e D7, sendo analisados segundo sua distribuição, pelos testes t e Man-Whitney. Dados da PIVE foram comparados entre GC, GT e GA pelos testes Qui-Quadrado e Kruskal Wallis (PROPHET 5.0; BBN-Systems&Technologies, Cambridge-Massachusetts, EUA). O tratamento (GT) aumentou ($p<0,05$) a população folicular total (20,0 ± 4,95 em D0 vs 26,66 ± 4,24 em D7), os folículos ≥2,5mm (4,11 ± 1,96 em D0 vs 11,55 ± 4,09 em D7), o diâmetro ovariano (13,08 ± 1,0mm, em D0 vs 14,81 ± 1,38mm em D7) e o número de folículos aspirados (95 vs 152, respectivamente GC vs GT). O GT teve mais ovócitos graus I e II (59% vs 25%, respectivamente GT e GC) e, inversamente, o GC teve mais ovócitos graus III e IV (53,3% vs 37,1%, respectivamente GC e GT); $p<0,05$. Porém, no GT não se observou elevação ($p>0,05$) da taxa de clivagem (49,33% vs 51,42%; respectivamente GC vs GT), da taxa e do número de blastocistos em D7 (1,33% vs 8,57% ou 3 vs 9; respectivamente para taxa e número em GC vs GT. Taxa de blastocistos de GA: 24,41%) e nem do número de embriões/fêmea doadora (0,33 vs 1,0; respectivamente GC vs GT). Concluiu-se que a manipulação hormonal elevou o número de folículos observados e aspirados, de ovócitos graus I e II, mas não levou ao aumento na produção de embriões destes animais.

SBTE 173 OPU-FIV e TE

Ovulação espontânea pós-parto em éguas quarto de milha receptoras de embriões

Ricardo Olimpio Schenatto[1]; Luiz Augusto Machado Centeno[2]; Laurence Boligon De Araujo[2]; Karine De Vargas Aires[2]; Guilherme Machado Zanatta[2]; Julia Brum Spreckelsen Casarin[1]; Mariani Farias Fiorenza[1]; Janislene Mach Trentin[1]; Gilson Antonio Pessoa[1]; Mara Iolanda Batistella Rubin[2]
1.Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul; 2.Universidade Federal De Santa Maria.

Palavras-chave: Folículos; ultrassonografia; te

A poliestria estacional é característica da espécie equina, que regularmente apresenta ciclicidade no período de maior luminosidade. Na primavera e outono, período de transição, o crescimento folicular ainda é irregular e determina falhas na ovulação, pelo efeito negativo da melatonina sob o sistema neuroendócrino. Nos programas de transferência de embriões (TE), éguas recém-paridas usualmente são incluídas como receptoras no início da primavera podendo determinar limitado sucesso. Portanto, neste estudo avaliou-se a influência do período da parição sobre primeiro cio pós-parto, tempo da primeira ovulação e o diâmetro folicular de receptoras de embriões. Éguas Quarto de Milha (n=34) com 11 anos em média e 500-600kg foram avaliadas de fevereiro a março/2015 em um haras de Weatherford, Texas/USA, mantidas em piquetes após o segundo dia pós-parto (d.p.p.) e suplementadas com alfafa e ração. As éguas foram distribuídas conforme a data do parto em A (1 a 28 fev), B (1 a 15 março) e C (após 15 março). Após o 8° d.p.p., a cada dois dias (d) as éguas foram avaliadas por palpação e ultrassonografia transretal quanto aos parâmetros: época da parição, desenvolvimento folicular, diâmetro do folículo pré-ovulatório, ovulação em ovário direito ou esquerdo, d.p.p. após primeira ovulação e taxa de crescimento folicular. Folículos ⌀ ≥ 30 mm foram acompanhados até a ovulação. Os dados foram submetidos ao PROC GLIMMIX do SAS® (SAS 9.3, USA, 2003). O total de ovulações nos ovários esquerdo e direito foram 21 e 13, respectivamente. No ovário esquerdo a taxa de crescimento foi 5,62±0,69mm/dia e à ovulação o ⌀ folicular de 43,57±0,99mm aos 12,19±0,43 d.p.p. No ovário direito a taxa de crescimento foi 3,36±0,45mm/dia e a ovulação aos 13,07±0,8 d.p.p. com diâmetro de 43,00±1,13mm. No grupo A, todas as éguas (n=8) ovularam no ovário esquerdo com taxa de crescimento de 6,7±1,07 mm/dia e ovularam em média aos 11,2±0,65 d.p.p. um folículo ⌀ 43,1±1,6mm. No grupo B, 7 ovulações advieram no ovário esquerdo com taxa de crescimento diário de 4,00±1,30mm/dia. A ovulação ocorreu 12±0,61 d.p.p. e o diâmetro folicular médio foi 42,33±1,45mm. No ovário direito ocorreram 6 ovulações, a taxa de crescimento foi 3,00±0,57mm/dia, a ovulação ocorreu após 12±1,03 d.p.p. com diâmetro folicular médio de 40,00±1,87mm. Nas fêmeas do grupo C ocorreram 6 ovulações no ovário esquerdo com taxa de crescimento 5,75±1,03 mm/dia, ovulando aos 13,66±0,80 dias e ⌀ 45,33±2,17 mm. Sete ovulações ocorreram no ovário direito. A taxa de crescimento foi 3,57±0,64mm/dia até a ovulação aos 14±1,15 d.p.p. com diâmetro de 45,14±0,73mm. A época da parição não revelou diferença quanto ao tempo para ovulação p.p. (P=0,717), taxa de crescimento diário (P=0,741) e diâmetro do folículo na ovulação (P=1,00). A época de parição não influenciou na taxa de crescimento folicular, dias pós-parto para a ovulação ou diâmetro folicular de éguas receptoras de embriões paridas em diferentes períodos na estação.

SBTE 174 OPU-FIV e TE

Parâmetros de produção *in vitro* em fêmeas bovinas da raça sindi (*Bos taurus indicus*)

Raquel Rodrigues Costa Mello; Sabrina Luzia Gregio De Sousa; Marco Roberto Bourg Mello
Universidade Federal Rural Do Rio De Janeiro (UFRRJ).

Palavras-chave: *Bos indicus*; opu; fiv

A aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU) associada à PIV de embriões é uma técnica de grande interesse econômico que vem crescendo rapidamente no mercado devido à eficiência do uso de sêmen sexado, e animais zebu (*Bos indicus*) têm sido amplamente utilizados para a exploração leiteira (Viana et al., 2010, Theriogenology, 73, 966). O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da doadora, idade, estação do ano, touro e tipo de sêmen sobre os parâmetros de PIV de embriões na raça Sindi. Os dados foram fornecidos pela empresa Sexing Technologies do Brasil (Sertãozinho, São Paulo, Brasil), referentes a 499 sessões de OPU realizadas entre o período de Janeiro de 2008 a Janeiro de 2015 em 150 doadoras de oócitos da raça Sindi procedentes de diferentes criatórios do estado de São Paulo. Foram utilizados sêmen convencional e sexado de touros da raça Sindi. Foram analisados os efeitos da doadora (150 animais), idade (até 6 anos vs. acima de 6 anos), estação do ano (chuvosa ou seca), touro (22 animais) e tipo de sêmen (convencional ou sexado) sobre as variáveis oócitos recuperados, oócitos viáveis (graus 1, 2 e 3), oócitos degenerados, taxa de clivagem e taxa de blastocisto (embriões em D7). Os dados foram analisados por ANOVA no procedimento GLIMMIX do SAS. Foram recuperados um total de 7.971 COCs. A estação do ano (chuvosa vs. seca) não afetou o número de oócitos recuperados por OPU (23,4 vs. 24,0±1,43; P=0,94). No entanto, na chuvosa o número de oócitos viáveis foi maior (67,8 vs. 64,0±0,01%; P=0,02) e de oócitos degenerados foi menor (32,2 vs. 36,0±0,01%; P=0,02). No entanto, as taxas de clivagem e de blastocistos em D7 não diferiram (P>0,45) nas OPU em diferentes estações do ano, e foram 72,0±0,03 e 26,8±0,01%, respectivamente. A idade da doadora afetou os resultados da PIV. Doadoras de até 6 anos tiveram maior número de oócitos recuperados (26,9 vs. 20,8±1,33; P<0,01), assim como maior número de oócitos viáveis (68,5 vs. 64,4±0,01; P<0,01) e menor número de oócitos degenerados (31,5 vs. 35,6±0,01; P<0,01). Entretanto, não houve diferença na clivagem entre vacas jovens e vacas acima de 6 anos (74,4 vs. 70,0±0,03%; P=0,31), porém houve uma tendência para que vacas mais jovens tivessem menor taxa de blastocistos em D7 (25,0 vs. 28,2±0,01%; P=0,07). O sêmen convencional gerou melhores taxas de clivagem (76,4 vs. 58,9±0,04%; P<0,01) e de produção de embriões em D7 do que o sêmen sexado (27,5 vs. 23,1±0,01%, respectivamente; P=0,02). Foram observados efeito de touro no número de oócitos recuperados (P<0,03) e na taxa de blastocistos (P<0,02). Ainda, houve efeito de doadora no número de oócitos viáveis (P<0,02), no número de oócitos degenerados (P<0,02) e na taxa de embriões (P<0,01). Em conclusão, em doadoras com até 6 anos de idade o número de oócitos recuperados e embriões produzidos é maior. O sêmen sexado é menos eficiente do que o convencional nos programas de PIV nesta raça. As fêmeas Sindi produzem um número maior de oócitos viáveis na época chuvosa, quando a oferta de alimentos é mais disponível.

SBTE 175 OPU-FIV e TE

Perfil plasmático de FSH após aplicação de dose única de pFSH diluído em ácido hialurônico

Felipe Pereira Vianna[1]; Lais Mendes Vieira[2]; Bruna Martins Guerreiro[2]; Bruno Gonzalez De Freitas[2]; Guilherme Nogueira Borges Filho[3]; Gabriel A Bo[4]; Reuben John Mapletoft[5]; Pietro Sampaio Baruselli[2]
1.AGENER; 2.USP - São Paulo; 3.UNESP; 4.Instituto De Reproducción Animal; 5.University Of Saskatchewan.

Palavras-chave: Fsh; novilhas holandesas; perfil plasmático

Nós avaliamos o perfil plasmático de FSH após a aplicação de diferentes doses de FSH porcino (pFSH; Folltropin®, Bioniche) diluído em ácido hialurônico (AH; MAP-5®, Bioniche). Vinte e três novilhas da raça Holandesa foram divididas em quatro grupos: Controle (sem tratamento superstimulatório; n=4), F200 (200 mg de pFSH, n=6), F200AH (n=6) e F300AH (n=6; 200 ou 300mg de pFSH diluído em AH 0,5%). Em dia aleatório do ciclo estral as novilhas receberam implante auricular de Norgestomet (Crestar® MSD), 2 mg de benzoato de estradiol (RIC-BE®, Tecnopec) e 0,150 mg de cloprostenol (ESTRON®, Tecnopec). No Dia 5, as fêmeas receberam 0,150 mg de cloprostenol e no Dia 7 foram submetidas à avaliação ultrassonográfica para verificar o diâmetro do maior folículo. Nos Dias 8 e 9 o grupo F200 recebeu 200 mg de pFSH (14,3mg/mL), administrado em doses decrescentes (57,1, 57,1, 42,9 e 42,9mg) a cada 12h. Os grupos F200HA e F300HA receberam dose única IM de pFSH no Dia 8 pela manhã, 5,0 mL (F200AH) e 7,5 mL (F300HA; 40mg/mL de FSH). O grupo Controle não recebeu nenhum tratamento adicional. No Dia 12 pela manhã, o implante foi retirado. As coletas de sangue foram iniciadas no Dia 8 imediatamente antes da administração da primeira dose de pFSH (0h). As amostras foram coletadas pela veia jugular a cada 6 h até 96 h para avaliar a concentração plasmática de FSH. As variáveis foram analisadas por contraste ortogonal utilizando o procedimento GLIMMIX do SAS. Os contrastes estabelecidos foram: C1 (Efeito superestimulação): Controle vs. (F200+F200AH+F300AH); C2 (Efeito AH): F200 vs. (F200AH+F300AH); C3 (Efeito dose): F200AH vs. F300AH. A área sob a curva foi calculada pelo método trapezoide. O período total com concentração elevada de FSH (superior a dois desvios padrão) foi determinado pelo intervalo entre a aplicação e retorno à concentração basal. Novilhas submetidas ao tratamento superestimulatório (F200: 75,8±5,6; F200AH: 64,8±11,5; F300AH: 97,8±5,3ng*h/mL) apresentaram maior área sob a curva comparadas ao grupo Controle (53,8±5,1 ng*h/mL; C1, P=0,002). O grupo F200 não diferiu (C2; P=0,56) das fêmeas tratadas com AH e os animais do grupo F300AH apresentaram maior área sob a curva em relação ao grupo F200AH (C3; P=0,006). Ainda, animais do grupo F200 apresentaram maior período com concentração plasmática elevada de FSH (55,0±4,5h) comparados aos grupos que receberam única dose de pFSH em AH (C2; F200AH: 32,0±8,2 e F300AH: 37,0±4,5h; P<0,0001), sendo esse período semelhante entre os grupos tratados com AH (C3; P=0,17). Portanto, o tratamento com dose única de pFSH diluído em AH aumentou a concentração plasmática de FSH em relação ao grupo Controle, sendo semelhante ao tratamento com duas aplicações diárias. No entanto, o tratamento com pFSH diluído em AH apresentou menor período com elevada concentração de FSH plasmático comparado ao grupo com aplicações diárias de pFSH. Agradecimentos: I.Z. Nova Odessa, Lab. endocrinologia – UNESP Araçatuba e Agener - LinhaTecnopec.

SBTE 176 OPU-FIV e TE

Potencial do gnrh em sincronizar a emergência folicular e ovulação em protocolo superovulatório "dia 0" em ovinos

Joanna Maria Gonçalves De Souza Fabjan[1]; Mário Felipe Alvarez Balaro[1]; Teresa Gioia Bon Barbosa[1]; Jeferson Ferreira Da Fonseca[2]; Lucas Machado Figueira[1]; Tarcísio Alves Texeira[1]; Luciano De Rezende Carvalheira[1]; Felipe Zandonadi Brandao[1]
1.Universidade Federal Fluminense; 2.EMBRAPA Caprinos E Ovinos.

Palavras-chave: Lecirelina; mote; superovulação

O objetivo do estudo foi avaliar o papel do GnRH para sincronizar a ovulação e emergência folicular previamente a protocolo superovulatório iniciado no primeiro dia do ciclo estral (Dia 0) em ovelhas da raça Santa Inês. Para a indução do estro sincronizado, foram utilizados dispositivos intravaginais impregnados com 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (Progespon®, Schering Plough, São Paulo, Brasil) por seis dias. No quinto dia, foram administradas 300 UI de eCG (Folligon®, MSD saúde animal, São Paulo, Brasil) e 37,5 µg de d-cloprostenol (Prolise®, Tecnopec LTDA, São Paulo-SP, Brasil) pela via intramuscular. Após a retirada da esponja, as ovelhas foram divididas em três tratamentos: GControle – aplicação de salina após 12 h (n = 10); G24h – aplicação de GnRH após 24 h (n = 10); e G36h – aplicação de GnRH após 36 h (n = 9). A ultrassonografia ovariana foi realizada a cada 12 horas, após a retirada da esponja, para acompanhamento da ocorrência da ovulação e emergência da onda folicular até o quinto dia do ciclo estral. As ovelhas do G24h e G36h apresentaram ovulação mais precoce (48,0 ± 3,2 e 56,7 ± 1,9 h) quando comparadas ao Gcontrole (64,1 ± 3,0 h – P<0,05). Pode-se sugerir que o G36h foi mais eficaz na sincronização da ovulação em comparação ao G24h, devido ao menor erro padrão obtido. Houve efeito do dia do ciclo estral (P < 0,05) e interação entre dia do ciclo estral e tratamento sobre a dinâmica folicular (P < 0,05). Foi observada maior população de folículos médios no G24h, durante as primeiras 24 h após a ovulação, quando comparado ao GControle, assim como ausência de folículos dominantes entre 36 e 72 h após a ovulação no G36h. A maior população de folículos médios no G24h em comparação ao Gcontrole, pode ter ocorrido devido a persistência destes folículos oriundos da onda ovulatória anterior e que devido a antecipação do pico de LH promovido pelo GnRH, estes não foram capazes de finalizar o seu crescimento e maturação entrando em atresia. Após 60 h da ovulação, houve a estabilização do número de folículos médios em todos os tratamentos. O maior número de folículos dominantes, 12 h após a ovulação, no G36h comparado ao G24h, teve correlação com o maior número de folículos ovulados neste grupo. Em conclusão, a aplicação de GnRH 36 horas após a retirada da esponja foi eficiente em sincronizar a ovulação e promover a ausência de folículos dominantes nos primeiros dias do ciclo estral. De acordo com os dados obtidos, o melhor horário para iniciar o tratamento superovulatório, conhecido como "Dia 0", seria 80 h após a retirada da esponja (56 h para ocorrência da ovulação mais 24 h para a ausência de folículos dominantes), na indução do estro sincronizado, em ovelhas da raça Santa Inês.

SBTE 177 OPU-FIV e TE

Produção *in vitro* de embriões bovinos e bubalinos com adição do óleo essencial lippia origanoides no meio de maturação

Emílio César Martins Pereira[1]; Eunice Oba[1]; Álan Maia Borges[2]; Moysés Dos Santos Miranda[3]; Virgílio Barbosa Andrade[2]; Joyce Kelly Do Rosario Da Silva[3]; João Gabriel Viana De Grázia[2]; Marcus Vinicius Prado Silva[2]
1.UNESP/BOTUCATU; 2.UFMG; 3.UFPA.

Palavras-chave: Antioxidante; produção *in vitro* de embriões; búfalo

A utilização da produção *in vitro* de embriões (PIVE) tem crescido rapidamente nos últimos anos, no entanto, a eficiência do processo é baixa e os índices insatisfatórios. Acredita-se que diversos fatores podem influenciar neste processo, dentre eles, as espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas em razão das condições artificiais de maturação e cultivo. Assim, antioxidantes tem sido incorporado nos meios de MIV e CIV na tentativa de reduzir a formação de EROS e melhorar as taxas de produção final de embriões. Um potente antioxidante natural já utilizado em cultivos celulares, que tem como princípio ativo o carvacrol e timol, extraído da planta Lippia origanoides, representa um potencial promissor a ser utilizada no cultivo embrionário (Vicuña, et al., Fitoterapia, v. 81, p.343-349, 2010). Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da suplementação do meio MIV de bubalinos e bovinos com óleo essencial de Lippia origanoides (OELO) em diferentes concentrações. Foram utilizados para maturação 2052 oócitos bovinos e 1026 oócitos bubalinos recuperados de ovários oriundo de matadouro, divididos em 5 tratamentos constituídos de: T1 (Meio Base (MB): TCM 199 + 10% SFB + 22µg/mL Piruvato + 5UI/mL LH + 0,05µg/mL FSH + 1µg/mL Estradiol + 83,4 µg/mL de Amicacina), T2 (MB + 50 µM/mL de cisteamina), T3 (MB + 2,5µg/mL de OELO), T4 (MB + 5 µg/mL de OELO) e T5 (MB + 10 µg/mL de OELO). Os reagentes utilizados foram adquiridos na Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA. Os oócitos foram maturados à 5%CO2, 38,5ºC por 24 horas. A FIV ocorreu por um período de 18-20 horas e em seguida os zigotos foram desnudados e cultivados em meio SOF + 2,5% SFB por 7 dias. Foi avaliada a taxa de clivagem após 48 horas de cultivo e a produção de blastocistos nos dias 7 e 8. Para análise estatística foi utilizado a ANOVA com nível de significância de 5%. A taxa de clivagem (média ± erro padrão) não diferiu (P>0,05) entre os tratamentos para bubalinos (39,87±5,54; 35,64±5,60; 44,16±17,04; 45,19±5,56 e 43,57±6,86; respectivamente para os tratamentos T1, T2, T3, T4 e T5). Já a taxa de produção de blastocistos para bubalinos também foi semelhante entre os tratamentos e os valores foram 30,21±6,49; 19,52±5,92; 27,56±5,11; 32,87±6,49 e 23,35±4,77, para os tratamentos T1, T2, T3, T4 e T5 (p>0,05), respectivamente. Para bovinos as taxas de clivagem encontradas não diferiram entre os tratamentos e foram de 64,06±3,98; 62,65±3,59; 64,72±4,04; 53,32±3,84 e 65,51±4,90, para os tratamentos T1, T2, T3, T4 e T5 (p>0,05), respectivamente. A taxa de blastocistos para bovinos também não diferiu entre os tratamentos e foi 27,25±2,98; 26,82±3,94; 24,97±3,52; 23,36±2,57 e 27,14±2,87, para T1, T2, T3, T4 e T5 (p>0,05), respectivamente. O uso do óleo essencial de Lippia origanoides não alterou a capacidade de clivagem e desenvolvimento dos embriões bovinos e bubalinos produzidos *in vitro*.Apoio Financeiro-CAPES 096/10.

SBTE 178 OPU-FIV e TE

Produção *in vitro* de embriões bovinos e bubalinos, durante dois períodos do ano

Virgílio Barbosa Andrade[1]; Emílio César Martins Pereira[2]; Eunice Oba[2]; Álan Maia Borges[1]; Marcus Vinicius Prado Silva[1]; Eliane Beatriz Magalhães[1]; João Gabriel Viana De Grázia[3]; Natália Vieira Sollecito[1]
1.UFMG; 2.UNESP; 3.UFJF.

Palavras-chave: Produção *in vitro* de embriões; bufalo; bovino

A PIVE tem o intuito de maximizar o ganho genético, aumentando o número de crias da fêmea durante a vida reprodutiva, e otimizar o uso da dose do sêmen. Apesar da importância desta biotecnica, os índices encontrados na literatura são variáveis, sobretudo, quando se trata das espécies bovina e bubalina. Tem sido relatada que a taxa de blastocistos em bubalinos varia em torno de 20%, enquanto a de bovinos encontra-se em torno de 35 a 48% (Elamaranet al., Reprod. Dom. Anim, v.47, p.1027-1036, 2012). Uma das justificativas para a baixa produção de embriões em búfalos é a influência da sazonalidade sobre a reprodução, visto que, são considerados animais com ciclicidade em dias curtos. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a produção *in vitro* de embriões bovinos e bubalinos durante dois períodos do ano, considerados favorável e desfavorável para bubalinos. O período experimental foi dividido em época favorável (1º de março a 31 de agosto) e desfavorável (1° de setembro a 28 de fevereiro), de acordo com a sazonalidade caracterizada para bubalinos. Ao todo, foram utilizados 174 e 566 oócitos bubalinos e bovinos, respectivamente, colocados em meio de lavagem composto por TCM 199, 10% de soro fetal bovino, 22µg/ml de piruvato de sódio e 83µg/ml de sulfato de amicacina. Os oócitos foram maturados em estufa (38,5°C, 5% CO2, 95% umidade) por 24 horas em meio base (TCM 199 + 10% SFB + 22µg/mL piruvato + 5UI/mL LH + 0,05µg/mL FSH + 1µg/mL estradiol + 83,4µg/mL de amicacina + 50µg/mL de cisteamina) e fecundados por 18 a 22 horas. Foi utilizado sêmen de um único touro com fertilidade comprovada na PIVE. Os reagentes utilizados foram Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA. Os possíveis zigotos foram desnudados e em seguida cultivados em meio SOF (Synthetic Oviduct Fluid) + 2,5% SFB, por 7 dias. A taxa de clivagem foi avaliada 48 horas após o cultivo e a produção de blastocistos foi avaliada no D7 e D8. Para análise estatística, o teste de Shapiro Wilk foi utilizado para avaliar a normalidade das variáveis contínuas, e para a comparação de médias foi utilizado o teste Teste t de Student. O nível de significância considerado foi de 5%. Em relação a época do ano (favorável e desfavorável), não houve diferença entre as taxas de expansão de cúmulus (89,49 ± 6,61 vs 92,00 ± 2,83), clivagem (55,87 ± 4,22 vs 62,83 ± 4,20) e produção de blastocistos em bovinos (20,12 ± 6,33 vs 27,68 ± 4,18) ($p>0,05$). Em búfalos, também não houve diferença entre as taxas de expansão do cúmulus (78,73 ± 4,44 vs 77,67 ± 7,64), clivagem (36,29 ± 4,11 vs 35,13 ± 10,12) e produção de blastocistos (22,79 ± 7,14 vs 16,90 ± 9,58), na época favorável e desfavorável, respectivamente. Na época favorável, não houve diferença em relação às taxas de expansão do cúmulus e produção de blastocistos, entre bovinos e bubalinos ($p>0,05$). Entretanto, a taxa de clivagem foi diferente entre as espécies bovina e bubalina ($p<0,05$) na época desfavorável.

SBTE 179 OPU-FIV e TE

Produção *in vitro* de embriões de doadoras nelore (*Bos indicus*) mantidas durante 12 meses em um programa comercial

Bernardo Marcozzi Bayeux[1]; Fabio Morato Monteiro[2]; Emiliana Oliveira Santana Batista[1]; Lais Mendes Vieira[1]; Monica Ferreira Accorsi[3]; Suzane Peres Campanholi[2]; Erika Aline Ribeiro Dias[2]; Alexandre Henryli Souza[4]; Pietro Sampaio Baruselli[1]
1.USP; 2.INSTITUTO DE ZOOTECNIA (APTA); 3.SEXING TECHNOLOGIES; 4.CEVA SAÚDE ANIMAL.

Palavras-chave: Embrião; ivf; bovinos

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do número de sessões de aspirações foliculares (OPU), touro, e época do ano do início do programa (verão vs. inverno) sobre a produção *in vitro* de embriões de doadoras da raça Nelore (*Bos indicus*) mantidas durante 12 meses em um programa comercial de produção de embriões. Foram analisados os dados de 36 vacas cíclicas submetidas a 12 aspirações consecutivas, com intervalo de 30 dias, na fazenda experimental do Instituto de Zootecnia de Sertãozinho (APTA). Todas as vacas foram aspiradas sem sincronização prévia da onda de crescimento folicular. Um total de 3 touros da raça Nelore foram utilizados para fertilização *in vitro* dos oócitos recuperados. Os dados foram analisados como medidas repetidas no tempo utilizando o procedimento GLIMMIX, SAS 9.3. O número de oócitos totais [20,3 ± 2,7 (1° sessão) vs 13,5 ± 1,21 (12° sessão); P = 0,0003] e número de oócitos viáveis [17,0 ± 2,4 (1° sessão) vs 10,0 ± 1,0 (12° sessão); P = 0,001] diminuiu a longo do tempo conforme o número de sessões de aspiração. Foi observado interação (P = 0,01) entre número de sessões de OPU e época do ano para taxa de oócitos viáveis, sendo esta taxa superior durante o inverno (P = 0,002) nas sessões 1, 2, 3, 6, 10, 11 e 12 (Inverno: 86,4, 83,3, 77,1, 76,5, 74,8, 76,3, 75,5, 74,0, 69,8, 77,6, 80,1 e 78,4% e Verão: 64,7, 67,3, 72,0, 77,9, 76,7, 67,5, 67,2, 76,4, 71,8, 74,7, 68,8 e 69,4%, sessões de aspiração 1 a 12, respectivamente. Não foi observado efeito de sessão de aspiração para número de embriões produzidos por sessão de OPU (P = 0,97) e taxa de blastocisto (P = 0,30). O número de oócito totais (P = 0,29) e número de oócitos viáveis (P = 0,11) não diferiu conforme a época do ano. No entanto, o número de embriões por sessão de OPU (6,1 ± 0,4 vs 4,5 ± 0,3; P = 0,06) e taxa de blastocisto (34,86 vs 31,86 %, P = 0,009) foi maior no inverno comparado ao verão. O número de embriões por sessão de OPU não diferiu conforme o touro utilizado (P = 0,14), porém verificou-se efeito touro para taxa de blastocisto (Touro A: 31,0%b; Touro B: 30,3%b e Touro C: 40,4% a; P = 0,0004). Em conclusão, o número de oócitos totais e viáveis diminui conforme consecutivos processos de aspirações foliculares. Ainda, a eficiência na produção *in vitro* de embriões em doadoras *Bos indicus* pode ser comprometida durante a época quente do ano. Por fim, a eficiência na produção *in vitro* de embriões pode ser alterada conforme o touro utilizado para fertilização *in vitro* de embriões. Agradecimentos: IZ Sertãozinho –APTA.

SBTE 180 OPU-FIV e TE

Reação acrossômica induzida por teofilina associada ou não à heparina no sêmen bovino

Fabiana Cristina Varago[1]; Laíla Pereira Da Silva[1]; Josiane Rossi Ribeiro[1]; Carlos Antônio De Carvalho Fernandes[1]; Bruno Campos De Carvalho[2]; Marilú Martins Gioso[1]; Marcela Gimenez[3]; Jairo Pereira Neves[1]
1.UNIFENAS; 2.EMBRAPA Gado De Leite; 3.BIOTRAN.

Palavras-chave: Capacitação; fertilização; espermatozóide

A capacitação espermática é constituída de mudanças bioquímicas e fisiológicas no espermatozoide que o tornam hiperativado e apto a sofrer a reação acrossômica para, finalmente, penetrar na zona pelúcida do oócito maturado. O objetivo do estudo foi avaliar a teofilina como agente de capacitação substituto ou associado à heparina sobre a reação acrossômica das células espermáticas. A teofilina (T1633 - Sigma-Aldrich®) foi adicionada meio de fertilização fornecido pela empresa Biodux® (Campinas, SP, Brasil). O experimento foi realizado com 4 touros da raça Gir e 3 tratamentos, totalizando 12 grupos experimentais. Cada touro foi avaliado nos tratamentos descritos a seguir: Tratamento 1 (T1): Heparina - 10µg/mL; Tratamento 2 (T2): Teofilina – 5 mM; Tratamento 3 (T3): Heparina (10µg/mL) + Teofilina (5mM). A heparina é usada como agente indutor da capacitação na maioria dos laboratórios de produção de embriões e por esta razão foi escolhida como grupo testemunha. A integridade do acrossomo foi avaliada empregando-se dupla coloração (Trypan blue/Giemsa – TBG) descrita por Didionet al. (Gamete Res, v.22, p. 51-57, 1989). O sêmen dos touros foi descongelado e submetido a separação pelo gradiente de Percol 45 e 90%. Tubos contendo meios de fertilização de T1, T2 e T3 foram inseminados com 2 x 106 espermatozoides/mL e incubados a 38,8□C com 5% de CO2, na ausência de oócitos. O sêmen dos touros foi incubado nos meios de capacitação por 0, 6, 12 e 18h, posteriormente corados com Trypan blue/ Giemsa e analisados em microscópio de campo claro com aumento de 1000x para avaliação da reação acrossômica. As características avaliadas nas células espermáticas foram: Reação acrossômica verdadeira - Acrossomo e região pós-acrossomal não coradas; Reação acrossômica falsa - Acrossomo não corado e região pós-acrossomal corada; Mortos - região pós-acrossomal e acrossomo corados. Os dados foram submetidos à análise de variância, seguida de teste Tukey Kramer ($p<0,05$). O tratamento não influenciou a análise de reação acrossômica. O mesmo foi observado para touros. No entanto, taxa de reação acrossômica verdadeira foi maior ($p<0,05$) no tempo 0h (61,50 ± 6,78) em relação aos tempos de 6h (19,63 ± 12,71), 12h (7,21 ± 4,40) e 18h (7,04 ± 2,66). Para os espermatozoides mortos foi observada maior taxa ($p<0,05$) nos tempos de 12h (84,46 ± 5,82) e 18h (86,75 ± 4,19). Foi possível observar que a incidência de reação acrossômica verdadeira foi relativamente baixa em comparação ao índice de espermatozoides mortos, o que pode ser decorrente do tempo total de incubação (18 horas). Isso sugere que a incubação, na ausência de COCs e de fatores de crescimento essenciais ao estímulo da reação acrossômica prejudicaram a viabilidade espermática *in vitro*. Contudo, a teofilina foi tão eficiente quanto à heparina na indução da reação do acrossoma.
Agradecimentos: a FAPEMIG (projeto CVZ - APQ-00798-12), a CAPES, ao CNPq pelo suporte financeiro, Unifenas e Biotran.

SBTE 181 OPU-FIV e TE

Recuperação eficiente de oócitos de onça parda (*Puma concolor*) estimuladas com gonadotrofinas através da lopu (laparoscopic ovum pick-up).

Hernan Baldassare[1]; Juliane Bayão Carelli[2]; Letícia Alecho Requena[2]; Marcia Gonçalves Rodrigues[3]; Sergio Ferreira[4]; Jorge Salomão[5]; Pedro Nacib Jorge Neto[2]
1.Mcgill University; 2.Novagen Genética; 3.Icmbio; 4.Instituto Corredor Das Onças; 5.Zoopet.

Palavras-chave: Oócitos; lopu; puma concolor

O desenvolvimento de um procedimento eficiente para coleta de oócitos é fundamental para permitir o uso de tecnologias de produção *in vitro* de embriões (PIV) e transferência nuclear de células somáticas (SCNT) como ferramentas para recuperar o equilíbrio populacional das espécies ameaçadas de extinção. Foi administrado 750 UI de eCG cinco dias antes da LOPU à uma fêmea de onça parda de 2,5 anos e à duas fêmeas irmãs de 1,5 anos de idade. Também foi administrado 500 UI de hCG 24-30h antes da LOPU à fêmea adulta e à uma das fêmeas jovens, a fim de promover a maturação *in vivo* dos oócitos. O hCG não pode ser administrado à segunda fêmea jovem, que serviu como controle do experimento. Foi realizado jejum alimentar (24h) e hídrico (12h) antes do procedimento de LOPU, que foi semelhante ao previamente descrito em pequenos ruminantes. As onças foram anestesiadas e contidas em uma mesa de laparoscopia em um ângulo de 45° e, utilizando um laparoscópio de 5 mm e uma pinça atraumática para posicionar os ovários, todos os folículos ≥ 2 mm de diâmetro foram aspirados utilizando uma agulha 20G montada numa pipeta de plástico ligada a um tubo e linha de vácuo. Um total de 98 oócitos foram recuperados, o que representa > 90% do número de folículos aspirados e uma média de 32,6 oócitos/fêmea. Curiosamente, 42/43 oócitos recuperados das duas fêmeas que receberam hCG mostraram cumulus expandido, o que foi considerado um bom sinal de maturação *in vivo*, enquanto a fêmea que não recebeu o hCG apresentou todos os oócitos com cumulus compacto e foi necessária a maturação *in vitro*. A maturação *in vitro* foi realizada em de gotas de 50 ul de meio M199 suplementado com bLH (0,02 U/ml), bFSH (0,02 U/ml), 17β-estradiol (1mg/ml), piruvato de sódio (0,2 mM), gentamicina (50 ug/ml) e 10% SFB, sob óleo mineral a 38,5°C em atmosfera umidificada e 5% de CO2 em ar durante 24 h. Infelizmente, não conseguimos obter sêmen de puma para realização da FIV como originalmente planejado, portanto, recorremos a vitrificação dos oócitos. Os oócitos maturados *in vivo* foram vitrificados logo após a coleta, enquanto os oócitos imaturos foram vitrificados após 24h de MIV. Antes da vitrificação, os oócitos foram completamente desnudados por pipetagem em meio contendo 0,1% de hialuronidase. A vitrificação dos oócitos foi realizada seguindo o procedimento descrito por Vajta et al.. Os oócitos foram passados sequencialmente em soluções de meio HM (TCM199 suplementado com 20% SFB), meio HV1 (HM com 7,5% de DMSO e 7,5% de etilenoglicol, v/v), meio HV2 (HM com 1 M de sacarose, 16% de DMSO e 16% de etilenoglicol, v/v) e finalmente colocado em hastes tipo cryotops (0,25 palhetas hemi-seccionadas longitudinalmente) antes da imersão em nitrogênio líquido.

SBTE 182 OPU-FIV e TE

Redução no volume dos gradientes de percoll incrementa a qualidade e recuperação de espermatozoides bovinos sexados para a PIV

Daniele Missio; Natália Picoli Folchini; Hirya Fernandes Pinto; Fábio Gallas Leivas; Daniela Dos Santos Brum
Biotech - Laboratório De Biotecnologia Da Reprodução - Universidade Federal Do Pampa.

Palavras-chave: Gradiente descontínuo de percoll; seleção espermática para fiv; volumes

A técnica de gradientes descontínuos de Percoll é a mais utilizada para seleção espermática de animais. Entretanto, a fim de obter um melhor aproveitamento de palhetas de sêmen convencional e/ou sexado, além de diminuir os custos da PIV e o tempo de execução da FIV, modificações na técnica vêm sendo estudadas, como diferentes forças e tempo de centrifugação, número de gradientes e volumes de Percoll. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes volumes de Percoll sobre a recuperação, integridade de membrana e movimento de espermatozoides bovinos sexados. As cinco repetições foram conduzidas a partir de um pool de sêmen sexado de dois touros *Bos taurus taurus*. A seleção espermática foi realizada por gradientes descontínuos (30, 60 e 90%) de Percoll (Folchini et al., Rev. Bras. Reprod. Anim., v.36, p.239-244, 2012), com volumes ajustados conforme os tratamentos: Controle: 300µL; Tratamento 1 (T1): 100µL e Tratamento 2 (T2): 200µL para cada gradiente. Na primeira e segunda centrifugação foram utilizadas uma força de 2200 x g por 5' e 1', respectivamente. As amostras foram avaliadas por sistema computadorizado (SCA®, Sperm Class Analyzer, New Route, Barcelona, Espanha) imediatamente após os tratamentos quanto à velocidade curvilínea (VCL, µm/s), velocidade linear progressiva (VSL, µm/s), velocidade média da trajetória (VAP, µm/s), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH, µm), frequência de batimento flagelar cruzado (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %). Também foi avaliada a integridade de membrana (com iodeto de propídio e diacetato de 6-carboxifluoresceína) e a taxa de recuperação espermática, obtida através de fórmula considerando volumes e concentrações espermáticas inicial e final (Machado et al., Theriogenology, v.71, p.1289-97, 2009). Os dados foram analisados por ANOVA ($p<0,05$). A redução do volume de gradientes descontínuos de Percoll para 100 ul aumentou a velocidade curvilínea em relação ao controle e ao T2 (Controle: 34,4 µm/s; T1: 70,2 µm/s; T2: 43,9 µm/s) e foi semelhante ao T2 e superior ao controle quanto ao amplitude de deslocamento lateral da cabeça (Controle: 1,3µm; T1: 3,5µm; T2: 1,8µm). Quanto à integridade de membrana, observou-se que o Controle (65,2%) e T2 (72,2%) e foram superiores a T1 (55,8%). Ao avaliar a taxa de recuperação, constatou-se que a redução do volume para 100 ul aumentou a taxa de recuperação (Controle: 28,3%; T1: 46,3%; T2: 28,8%) do sêmen sexado. Estes resultados demonstram que é possível obter uma maior taxa de recuperação e selecionar espermatozoides com maior motilidade, com a utilização de volumes de gradientes de 100 µL.

SBTE 183 OPU-FIV e TE

Sobrevivência embrionária e taxa de nascimento após a transferência de embriões ovinos produzidos *in vitro* criopreservados por congelação lenta ou vitrificação com métodos de mínimo volume

Pedro Claudino Dos Santos-Neto[1]; Federico Cuadro[1]; Natalibeth Barrera[1]; Andrea Pinczak[1]; Mariano Viz[1]; Martina Crispo[2]; Alejo Menchaca[1]
1.Fundación Irauy; 2.Instituto Pasteur.

Palavras-chave: Produção *in vitro* ovinos; criopreservação; taxa de nascimento

Recentemente tem sido reportado em embriões ovinos PIV em diferentes estágios do desenvolvimento novas metodologias de vitrificação utilizando métodos de mínimo volume (Cryotop e Espátula MVD) (dos Santos Neto et al., Cryobiology, 70, 17-22, 2015). A partir destes antecedentes, o objetivo deste trabalho foi avaliar a taxa de sobrevivência embrionária aos 30 dias, taxa de nascimento e sobrevivência a 1ª semana após a transferência de embriões ovinos produzidos *in vitro* criopreservados mediante congelação lenta ou vitrificação. Um total de 240 embriões PIV criopreservados em estagio de mórula e blastocisto foram transferidos para ovelhas receptoras, divididos em 3 grupos experimentais: Congelação (N=68); Cryotop (N=93); Espatula MVD (N=79). Os ovocitos foram previamente maturados, fertilizados e cultivados *in vitro* até o dia 6 do desenvolvimento embrionário conforme o protocolo usado rotineiramente no laboratório. Os embriões foram criopreservados mediante congelação lenta ou vitrificados com o método Cryotop desenvolvido para humanos e camundongos por Kuwayama et al., Theriogenology, 67, 73-80, (2007), e com o método Espatula MVD reportado por nosso laboratório. A sincronização de receptoras foi realizada utilizando um protocolo de curta duração e 6 dias após a detecção do estro (Dia 0) foi realizada a transferência dos embriões criopreservados. Os parâmetros avaliados foram sobrevivência embrionária (numero de embriões aos 30 dias/total de embriões transferidos) realizada mediante ultrassonografia trans-retal, taxa de nascimento (cordeiros nascidos/total de cordeiros aos 150 dias), e taxa de sobrevivência de cordeiros (cordeiros vivos a 1ª semana/total cordeiros nascidos). A analise estatística foi realizado por regressão logística com nível de significância P<0,05. Os resultados demonstraram que embriões produzidos *in vitro* e vitrificados com o método Cryotop apresentaram maior sobrevivência embrionária aos 30 dias (Cryotop 38,7% 36/93; P<0,05) comparado com aqueles congelados (7,3% 5/68) assim como aos vitrificados com método Espátula MVD (11,4%, 9/79). Não foram encontradas diferenças sobre a taxa de sobrevivência quando os embriões foram congelados com etileno glicol ou vitrificados com método Espátula (P=NS). Não foram encontradas diferenças em nenhum dos grupos avaliados sobre a taxa de nascimento (85,0% 34/40 para todos os grupos combinados; P=NS) e sobrevivência há primeira semana (72,5% 29/40 para todos os grupos combinados; P=NS). Os resultados sugerem que a obtenção de taxas aceitáveis de sobrevivência aos 30 dias assim como ao nascimento e a posterior sobrevivência de cordeiros a 1ª semana permitem considerar a vitrificação com o método Cryotop como possível ferramenta nos programas de transferência de embriões em ovinos.

SBTE 184 OPU-FIV e TE

Superovulação e colheita de embriões não cirúrgica em ovelhas santa inês

Fabiana Nunes Zambrini[1]; José Domingos Guimaraes[1]; Jader Forquim Prates[2]; Luciana Vieira Esteves[3]; Joanna Maria Gonçalves De Souza Fabjan[3]; Felipe Zandonadi Brandao[3]; Ana Carolina Rosa Castro[4]; Jeferson Ferreira Da Fonseca[5]
1.Universidade Federal De Viçosa; 2.IFES Sudeste Mineiro; 3.Universidade Federal Fluminense; 4.UNIPAC; 5.EMBRAPA CAPRINOS E OVINOS.

Palavras-chave: Superovulação; colheita transcervical; ovino

Objetivou-se testar a eficiência de dois protocolos superovulatórios para colheita de embriões não cirúrgica em ovelhas Santa Inês. Dezesseis ovelhas pluríparas foram divididas em dois grupos experimentais. Em G1 (n=07), os animais receberam esponjas intravaginais (60mg MAP; Progespon®, Syntex, Buenos Aires, Argentina) por seis dias, administração de 37,5µg d-cloprostenol (Prolise®, ARSA S.R.L., Buenos Aires, Argentina) latero vulvar no dia da inserção e 24hs antes da retirada das esponjas, 200UI de eCG (Novormon 5000®, Syntex, Buenos Aires, Argentina) i.m. no momento da retirada e 200mg de FSHp (Folltropin®, Bioniche, Canadá) fracionado em oito doses decrescentes (40, 40, 30, 30, 20, 20, 10 e 10 mg) a cada 12h iniciando dois dias antes da remoção das esponjas. No G2 (n=09), os animais receberam esponjas intra vaginais por 15 dias, 200UI de eCG i.m. no momento da retirada e administração de 200mg de FSHp i.m., fracionado em seis doses decrescentes (50, 50, 25, 25, 10 e 10 mg) a cada 12h iniciando dois dias antes da remoção das esponjas. Todas as ovelhas tiveram estro monitorado duas vezes ao dia e acasaladas com machos férteis enquanto em estro, sendo ainda submetidas á administração de 0,025mg de GnRH (Gestran Plus®, ARSA S.R.L., Buenos Aires, Argentina) i.m. e 250UI de hCG (Vetecor®, Hertape Calier, Barcelona, Espanha) i.m., 24 e 84 h após o início do estro, respectivamente. As ovelhas receberam 37,5□g d-cloprostenol e 1mg benzoato de estradiol (Estrogin®, São Paulo, Brasil) i.m. 16h antes da colheita e 50UI ocitocina (Ocitocina forte ucb®, São Paulo, Brasil) i.v 20 min antes da colheita que ocorreu sete dias após início do estro com os animais em estação. Antes da colheita de embriões, as ovelhas receberam sedação e anestesia conforme descrito para cabras (Fonseca et. al.; Small Rumin. Res., 111:96-99, 2013). Variáveis qualitativas foram analisadas pelo Teste Qui-Quadrado e as quantitativas submetidas à análise de variância e testadas pelo teste t (5%, SAEG®). Os dados avaliados foram semelhantes (P>0,05) para ovelhas de ambos os grupos experimentais. A porcentagem de animais em estro foi de 100%. O intervalo da retirada do dispositivo ao início do estro foi de 22,3±4,5 e 16,0±6,0 h para ovelhas de G1 e G2, respectivamente. A percentagem de fêmeas coletadas foi de 85,7% (6/7) e 77,8% (7/9) para ovelhas de G1 e G2, respectivamente. A taxa de recuperação do meio de lavagem (líquido injetado/recuperado) foi de 96,2%. A média de estruturas totais (6,4±7,9 e 7,4±5,6) e viáveis (3,3±4,7 e 2,7±2,8) recuperadas foi semelhante (P>0,05) entre os tratamentos G1 e G2, respectivamente. Os resultados deste estudo sugerem que ovelhas Santa Inês superovuladas podem ser submetidas à colheita transcervical com eficiência satisfatória na lavagem uterina e recuperação de estruturas.
Suporte financeiro: (Embrapa / Projeto Embrapa Projeto 03.12.01.031.00), CNPq (Projeto 310166/2012-8) e Fapemig (Projeto CVZ-PPM 00042-14).

SBTE 185 OPU-FIV e TE

Swab nasal como pré seleção de doadoras de oócito positivas para o herpes vírus bovino

André Oliveira Penido[1]; Paula Maria Pires Do Nascimentod[2]; Marcos Brandão Dias Ferreira[1]; Beatriz Cordenonsi Lopes[1]; Rômulo Cerqueira Leite[2]
1.EPAMIG; 2.EV - UFMG.

Palavras-chave: Bohv-1; oócitos; swab nasal

O herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1) é o agente causador da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR), doença de grande prevalência no Brasil e considerada restritiva para o comércio internacional de gametas e embriões. No entanto, a soroneutralização, método preconizado pela OIE para o diagnóstico da doença, não permite diferenciar animais positivos vacinados de não vacinados. Com o objetivo de auxiliar na seleção de doadoras de oócitos negativas para o vírus, o presente estudo teve a finalidade de correlacionar a identificação do DNA viral na mucosa nasal e CCOs em vacas sorologicamente positivas e não vacinadas contra o BoHV-1. Foram utilizadas nove fêmeas bovinas separadas em dois grupos experimentais, sendo que, em seis animais, 0,1 mg/Kg/pv de dexametasona (CORTVET, UCB saúde animal, Jaboticabal, Brasil) foi administrada, por via intravenosa, durante cinco dias consecutivos (grupo tratado) e, em três animais, solução salina (0,05 mL/kg/pv, por via intravenosa) foi administrada nos mesmos momentos (grupo não tratado). A punção folicular e o "swab" nasal foram realizados nos dias 8 e 12 após o início do protocolo. O material obtido foi submetido à análise, através da técnica de PCR (Gasparini et al., Biológico, São Paulo, v.73, Suplemento 2, p.25-81, 2011). O DNA viral foi detectado em todas as amostras de CCOs e de "swab" nasal. Com base nos achados, a avaliação da presença do DNA viral no "swab" nasal foi efetivo na detecção do BoHV-1, podendo ser uma ferramenta útil para a triagem de doadoras de oócitos infectadas com o vírus. Contudo, estudos com maior número de amostras devem ser realizados para a validação da metodologia adotada nesta investigação.

SBTE 186 OPU-FIV e TE

Taxas de concepção de embriões bovinos produzidos *in vitro*, biopsiados e transferidos à fresco ou criopreservados.

Bruna Lopes Cardoso[1]; Bruno Valente Sanches[1]; Andrea Cristina Basso[1]; Daniel Robert Arnold[1]; Rodrigo Vitorio Alonso[2]; Caroline Emidio De Souza[1]; Rafaela Rodrigues De Carvalho[1]; Nathalia Guimaraes Da Cunha[1]; Raphael Guimaraes Cordeiro[1]; Felipe Gustavo Martins Camacho[1]
1.In Vitro Brasil Sa; 2.Deoxi Biotecnologia Ltda.

Palavras-chave: Embriões fiv; biopsia; vitrificação

No Brasil, dentre as biotecnologias da reprodução animal, a Fertilização *in vitro* (FIV) é uma ferramenta que vem sendo cada vez mais incorporada na rotina dos rebanhos bovinos de corte e de leite. Uma das vantagens da técnica é a utilização do sêmen sexado, que permite ao produtor a escolha do sexo do embrião e consequentemente, aumento da sua produtividade. Porém, existem limitações quanto ao seu uso, devido à ausência de sêmen sexado de alguns reprodutores de eleição do produtor. Uma solução para identificação do sexo do embrião antes da implantação no útero da receptora é a biopsia embrionária. O objetivo desse trabalho foi avaliar e comparar as taxas de concepção de embriões bovinos produzidos *in vitro* íntegros ou biopsiados, transferidos a fresco ou criopreservados. Os embriões foram produzidos a partir da aspiração de oócitos de doadoras da raça Angus oriundas da propriedade FSL Angus, Itu – SP, produzidos em escala comercial. No sexto dia de cultivo, os embriões foram submetidos à biópsia de células por meio da técnica de microaspiração, utilizando dois micromanipuladores mecânicos acoplados a duas micropipetas de borossilicato (holding e biópsia). De cada embrião foi aspirado aproximadamente 10% da massa embrionária viável, preferencialmente obtidas do trofoblasto para identificação do sexo através da técnica de PCR. Após a micromanipulação, os embriões foram cultivados individualmente e identificados. Após 8-12 horas, os embriões viáveis foram preparados para a transferência a fresco ou para serem submetidos à vitrificação. A transferência foi realizada em receptoras previamente sincronizadas. As taxas de concepção foram analisadas por regressão logística e os resultados foram considerados significantes quando $P<0.05$. Aos 60 dias, as taxas de concepção obtidas, foram significativamente menores ($P<0.02$) para os embriões biopsiados e vitrificados (33,75%; 27/80) quando comparados aos biopsiados transferidos a fresco (53,33%; 32/60), aos embriões íntegros transferidos a fresco (50,58%; 131/259) e aos íntegros vitrificados (54,78%; 63/115). Os resultados deste levantamento preliminar demonstram que a associação entre as duas tecnologias, biópsia e vitrificação, levaram a uma perda expressiva da viabilidade embrionária para o desenvolvimento intra-uterino em comparação às técnicas isoladas. Porém, considerando a possibilidade de se obter um banco de embriões devidamente identificados conforme as necessidades do produtor e a flexibilidade que esta associação agrega à FIV, faz-se necessário mais estudos no sentido de preservar a viabilidade embrionária após a biópsia e incrementar as taxas de concepção após a vitrificação.

SBTE 187 OPU-FIV e TE

Teofilina associada ou não à heparina como agente indutor da capacitação na produção *in vitro* de embriões bovinos

Bruno Campos De Carvalho[1]; Laíla Pereira Da Silva[2]; Fabiana Cristina Varago[2]; Josiane Rossi Ribeiro[2]; Carlos Antônio De Carvalho Fernandes[2]; Marilú Martins Gioso[2]; Marcela Gimenez[3]; Jairo Pereira Neves[2]
1.EMBRAPA GADO DE LEITE; 2.UNIFENAS; 3.BIOTRAN.

Palavras-chave: Fertilização; clivagem; touros

A teofilina possui mecanismo de ação semelhante ao da cafeína, porém mais potente em aumentar os níveis intracitoplasmáticos de Adenosina 3',5'-Monofosfato cíclico (AMPc), nucleotídeo envolvido no processo de capacitação espermática. O objetivo do estudo foi avaliar a teofilina como agente indutor de capacitação substituto ou associado à heparina no desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Os meios de cultivo utilizados para a produção de embriões foram fornecidos pela empresa Biodux® (Campinas, SP, Brasil). Ao meio de fertilização foi adicionada teofilina (T1633 - Sigma-Aldrich®). O experimento foi realizado com 4 touros da raça Gir e 3 tratamentos, totalizando 12 grupos experimentais. Cada touro foi avaliado nos tratamentos descritos a seguir: Tratamento 1 (T1): Heparina - 10µg/mL; Tratamento 2 (T2): Teofilina – 5 mM; Tratamento 3 (T3): Heparina (10µg/mL) + Teofilina (5mM). Os complexos cumulus-oócitos (COCs) recuperados de ovários de vacas de matadouros foram incubados em meio de maturação a 38,8ºC em atmosfera de 5% de CO2 por 24 horas. Na etapa da FIV, foram adicionados aos meios, os agentes de capacitação constituindo os tratamentos T1, T2 e T3. O dia da fecundação foi considerado como o dia 0 (D0). As taxas de clivagem, produção embrionária e eclosão foram avaliadas 2, 7 e 10 dias após a fecundação, respectivamente. Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando modelos lineares generalizados. As médias foram comparadas pelo teste Tukey Kramer ($p<0,05$). A taxa de produção embrionária foi maior ($p<0,05$) para o T1 (37,97 ± 13) em relação ao T2 e T3 (28,55 ± 10; 27,60 ± 11,0, respectivamente). O mesmo aconteceu para a taxa de eclosão ($p<0,05$) no T1 (33,50 ± 14) em relação ao T2 e T3 (22,81 ± 11; 23,08 ± 10, respectivamente). Não houve influência de touro ($p>0,05$) nas taxas de clivagem, embriões produzidos e eclosão. Aparentemente, a teofilina isolada ou associada à heparina, não induziu boa capacitação espermática, o que poderia ter reduzido a taxa de fertilização. No entanto, esse fato não foi evidenciado pela taxa de clivagem, que foi semelhante entre os tratamentos. Isso evidencia que, embora a taxa de clivagem não tenha diferido entre os tratamentos, nem todos as estruturas clivadas foram competentes em sustentar o desenvolvimento embrionário. Tal fato pode ser decorrente do aumento na incidência de partenogênese ou poliespermia com consequente bloqueio do desenvolvimento embrionário (Ramos et al., Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.52, 2000, online). Investigações futuras são necessárias, a fim de esclarecer os possíveis fatores que levaram a teofilina associada ou não à heparina reduzir as taxas de produção embrionária na fertilização *in vitro*.
Agradecimentos: a FAPEMIG (projeto CVZ - APQ-00798-12), a CAPES, ao CNPq pelo suporte financeiro, UNIFENAS e Biotran.

SBTE 188 OPU-FIV e TE

Uso da metil beta ciclodextrina como agente da capacitação espermática na produção *in vitro* em bubalinos (resultados preliminares)

Alessandra Ximenes Santos[1]; Vanessa Cunha Brito[1]; Arnaldo Algaranhar Gonçalves[1]; Priscilla Do Carmo De Azevedo Ramos[1]; Sebastião Tavares Rolim Filho[2]; Haroldo Francisco Lobato Ribeiro[2]; Moysés Dos Santos Miranda[1]; Simone Do Socorro Damasceno Santos[1]; Alexandre Rossetto Garcia[3]; Otávio Mitio Ohashi[1]
1.Universidade Federal Do Pará; 2.Universidade Federal Rural Da Amazônia; 3.Embrapa Pecuária Sudeste.

Palavras-chave: Ciclodextrina; capacitação espermática; embrião bubalino

As ciclodextrinas são oligossacarídios cíclicos que têm a capacidade de incorporação de lipídios como o colesterol e podem ser utilizadas para alterar o teor de colesterol das membranas celulares (Visconti et al., 1999). Estudos mostram sua utilização na remoção de colesterol de membranas plasmáticas seminais e na indução da capacitação de espermatozoides de bovinos (Purdy et al., 2004, BiolReprod, 71, 522-527; Kato et al., 2010, Zygote, 19, 21–30). Sendo assim, este trabalho tem como objetivo avaliar o uso da ciclodextrina como agente de capacitação espermática, analisando suas influências na PIVE em bubalinos. Ovários bubalinos foram coletados de abatedouro e os complexos cumulus-oócitos (CCOs) foram maturados *in vitro* em TCM-199 suplementado com 10% de SFB, FSH e LH, por 22 horas, a 38,5°C, em 5% de CO2. Os CCOs foram fecundados em meio TALP-FERT suplementado com penicilamina, hipotaurina e epinefrina, modificados de acordo com os grupos experimentais: Controle negativo-CN (sem BSA, Heparina ou Ciclodextrina), Controle Positivo- CP (com BSA e Heparina como agente capacitante) e os grupos com diferentes concentrações de Metil Beta Ciclodextrina (MBCD) (Sigma, St Louis, USA) (MBCD-0,5mM, MBCD-0,75mM e MBCD-1,5mM) e, cultivados sob as mesmas condições citadas para a MIV. Após 24 horas de fecundação, os zigotos foram distribuídos em gotas de meio SOF suplementado de BSA (6mg/mL), 10% de SFB, aminoácidos, piruvato, gentamicina e antioxidante. As taxas de clivagem e blastocisto foram avaliadas no 2º, 6º e 7° dia de cultivo, respectivamente, sendo os resultados analisados por ANOVA e pós-teste de Tukey, adotando-se o nível de significância de 5%. Com relação à taxa de clivagem não houve diferença significante entre CN, CP e MBCD-0,5mM (0 vs 39,23±4,06 e 32,15±17,25), porém o CN diferiu de MBCD-0,75mM e MBCD-1,5mM (0 vs 46,94±17,00 e 46,45±17,70, respectivamente), mas não teve diferença significativa entre os grupos com MBCD. Em relação à produção de blastocistos no 6º dia de cultivo, os grupos CP (22,25±5,75), MBCD- 0,75 (18,18±8,27) e MBCD-1,5mM (17,77±6,74) não diferiram significativamente ($p>0,05$), no entanto diferiram dos grupos CN e MBCD-0,5mM (0 vs 10,74±6, respectivamente) ($p<0,05$). E no 7º dia de cultivo os grupos CP (33,97±3,38) e MBCD-1,5mM (25,90 ± 10,68) não diferiram entre si, mas diferiram do CN (0), MBCD-0,5 mM (11,36± 10,54) e MBCD-0,75 mM (18,18±8,27). Sendo assim, são necessárias mais repetições a fim de confirmar que em búfalos o uso de MBCD na concentração de 1,5mM apresenta resultados semelhantes ao controle positivo, demonstrando dessa maneira que MBCD pode ser utilizada como um substituto da heparina.

SBTE 189 OPU-FIV e TE

Viabilidade da inovulação transcervical de embriões a fresco em caprinos

Luciana Vieira Esteves[1]; Felipe Zandonadi Brandao[1]; Fabiana Nunes Zambrini[2]; Joanna Maria Gonçalves De Souza Fabjan[1]; Marcio Roberto Silva[3]; André Luís Rios Rodrigues[1]; Jeferson Ferreira Da Fonseca[4]
1.Universidade Federal Fluminense; 2.2universidade Federal De Viçosa; 3.Embrapa Gado De Leite; 4. Embrapa Caprinos E Ovinos - Núcleo Regional Sudeste.

Palavras-chave: Cabra; inovulação embrionária; via não cirúrgica

A inovulação embrionária consiste na deposição do embrião no útero da receptora. Os resultados de fertilidade de receptoras de embriões caprinos variam bastante conforme a origem desses embriões: frescos ou criopreservados e produzidos *in vivo* ou *in vitro*. Normalmente, observam-se taxas de gestação que variam de 40 a 80%. O objetivo deste estudo foi testar a viabilidade da inovulação não-cirúrgica de embriões frescos caprinos. Cabras pluríparas (n=28) receberam esponjas intravaginais contendo 60 mg acetato medroxi progesterona (MAP; Progespon□, Syntex, Buenos Aires, Argentina) por seis dias, 30 □g d-cloprostenol (Prolise□, ARSA S.R.L., Buenos Aires, Argentina) latero-vulvar e 200 UI de eCG (Novormon□ 5000; Syntex, Buenos Aires, Argentina) i.m., ambos 24 h antes da remoção da esponja. Após a retirada da esponja foram realizadas duas rufiações diárias para a identificação do início e final do estro. Todos os animais foram avaliados por ultrassonografia transretal um dia antes da inovulação para identificação dos corpos lúteos. Ao sétimo dia do ciclo estral, as fêmeas receberam embriões pela via transcervical, por meio de um espéculo de Collin, pinças de Allis e cateter uretral (Arq. Bras. Med. Vet. Zoo., 66(2):613-616, 2014). Devido a técnica ser minimamente invasiva, similar a procedimentos de rotina como Inseminação Artificial, não foi utilizada anestesia. Foram avaliados os seguintes parâmetros: tipo (mórula/ blastocisto) e classificação (grau I, II e III) dos embriões, o número de embriões inovulados por receptoras, número de corpos lúteos apresentados por cada receptora e o corno inovulado (direito/ esquerdo). Para o processamento das análises, foram feitos modelos explicativos de regressão logística uni variados e multivariados utilizado o software Epi Info versão 3.5.3. Todos os animais sincronizados manifestaram estro. A taxa de gestação foi superior ($P<0,05$) para blastocistos (45,5%; 5/11) quando comparados com mórulas (16,0%; 4/25) e superior ($P<0,05$) para embriões Grau 1 (55,6%; 5/9) quando comparada com embriões Grau 2 (23,1; 3/13) ou Grau 3 (7,1%; 1/14). Não houve efeito ($P>0,05$) do número de embriões transferidos e o corno uterino para onde foram transferidos os embriões na taxa de gestação. As receptoras apresentaram de um a três corpos lúteos por ovário e o número de corpos lúteos não influenciou a taxa de gestação ($P>0,05$). Ao parto, foram registradas 14 crias perfazedo uma taxa de 38,9% de nascimento (14/36). Os resultados deste estudo sugerem que a transferência de embriões pode ser realizada com sucesso pelo método não cirúrgico em caprinos, representando assim uma alternativa para o método convencional cirúrgico.
Suporte financeiro: FAPEMIG (Edital Nº 01/2009 – Projeto CVZ – APQ – 01367 – 9 e CVZ – PPM – 00042 - 14)

SBTE 212 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

A ativação partenogenética, mas não a eletrofusão, altera a cinética de desenvolvimento e a eclosão de embriões murinos

Pablo Diego Moço; Bruna Martins Garcia; Elisa M Pioltine; Gabriela Berni Brianezi; Leticia R Chica; Livia V Saura; Marcelo Fabio Gouveia Nogueira
Universidade Estadual Paulista.

Palavras-chave: Blastocisto; partenogênese; eletrofusão

O funcionamento do trofectoderma (TE) é influenciado por modificações epigenéticas e necessita de complementação biparental. A partenogênese altera os ambientes epigenéticos fisiológicos e afeta a funcionalidade das células embrionárias. O objetivo deste estudo foi avaliar o desenvolvimento de embriões murinos após a manipulação oocitária e embrionária. Foram comparadas a cinética e a taxa de eclosão de: *i*) blastocistos oriundos de ativação partenogenética seguida (Grupo EP) ou não (Grupo PG; em teoria, haploides) de eletrofusão; *ii*) blastocistos provenientes da eletrofusão de dois blastômeros (Grupo EL; em teoria, tetraploides) e; *iii*) blastocistos originados da fertilização *in vitro* (Grupo Controle). Não houve diferença significativa (testes Qui-quadrado ou Exato de Fisher, $P > 0,05$) nas taxas de eclosão entre os grupos Controle e EL (56,9 e 47,5%), porém estas diferiram daquelas dos demais grupos. Entre os grupos PG e EP as taxas de eclosão foram similares (respectivamente 14,6 e 7,5%). Ainda que não possamos explicar o fato, os embriões EP (teoricamente diploides) apresentaram competência para a eclosão tão baixa quanto os embriões do grupo PG. Por si só, a técnica de eletrofusão (EL) não foi deletéria para a eclodibilidade. Assim sendo, a partenogênese em si e/ou o processo de ativação devem ter afetado negativamente os grupos PG e EP. Houve uma nítida diferença na cinética de desenvolvimento entre os grupos. Enquanto os embriões do grupo EL se desenvolveram semelhantemente ao grupo controle, nos embriões que sofreram ativação partenogenética o desenvolvimento foi mais lento, possivelmente devido à presença exclusiva do *imprinting* materno. Foi descrito que foi possível resgatar o *imprinting* de genes paternos em embriões partenogenéticos de camundongos, mediante a derivação de CTE (Chen *et al.*, Stem Cells, 27:2136-45, 2009) ou por TNCS serial (Hikichi *et al.*, Development, 137:2841-47, 2010). Os autores relataram que as células partenogenéticas puderam constituir a placenta e o próprio feto, havendo reversão parcial do *imprinting* original. Ainda que avaliados apenas morfologicamente, a diferença observada nos embriões do grupo EP, em comparação com os embriões PG, sugere que a diploidia não foi benéfica para os embriões partenogenéticos como previamente aventado (Liu *et al.*, Biol Reprod, 66:204-10, 2002). Podemos inferir que, devido à diploidia no grupo EP ser exclusivamente materna, houve um comprometimento no desenvolvimento funcional do TE, no qual é importante o *imprinting* paterno. A cinética de expansão e eclosão do blastocisto foi usada para a avaliação da funcionalidade do TE. Estas funções são decorrentes da capacidade do TE em bombear íons de sódio para a blastocele, promovendo o influxo de água. No grupo EP, o uso da eletrofusão não nos pareceu ser o fator prejudicial uma vez que embriões EL tiveram a cinética e eclosão semelhantes às do grupo controle. Apoio FAPESP: 12/50533-2, 13/05083-1, 13/07730-4 e 11/23890-6.

SBTE 213 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

A contagem de folículos antrais ovarianos ≥ 3 mm de diâmetro está associada com a fertilidade em vacas nelore lactantes?

Marcelo Fabio Gouveia Nogueira[1]; Vinicius Gonçalves Pinheiro[2]; Ronaldo Luiz Ereno[2]; Eduardo Montanari Razza[2]; Ciro Moraes Barros[2]
1.Departamento De Ciências Biológicas, FCL, UNESP; 2.Departamento De Farmacologia - Universidade Estadual Paulista - UNESP.

Palavras-chave: Folículos antrais; nelore; fertilidade

O crescimento dos folículos ovarianos em bovinos ocorre em um padrão denominado ondas de crescimento folicular, onde em um ciclo estral há normalmente a emergência de duas ou três ondas de crescimento folicular. Estas ondas são caracterizadas pelo crescimento sincrônico de um grupo de folículos antrais, onde normalmente apenas um destes se tornará dominante. A quantidade de folículos recrutados, por onda, é variável entre os animais e entre raças, porém apresenta alta repetibilidade entre os indivíduos (Evans et al., 2010). Essa variação, na população folicular ovariana, pode interferir na fertilidade por influenciar a competência oocitária (Ireland et al., 2007). Objetivou-se, com o presente estudo, identificar animais da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), que possuam elevadas e reduzidas contagens de folículos antrais (AFC) recrutados por onda folicular e compará-los quanto as taxas de prenhez. Foram utilizadas 268 vacas Nelore multíparas, entre 40 e 70 dias pós-parto e com escore de condição corporal entre 3,5 a 4,5 (escala de 5 pontos). As vacas foram distribuídas em grupos de acordo com a contagem de folículos antrais (≥ 3 mm de diâmetro). Desta forma, 33% dos animais com a maior AFC foram incluídos no grupo alta população (GA; n=89, > 38 folículos), enquanto que os animais com contagem intermediária (33%) foram alocados no grupo intermediário (GI; n=88, entre 28 e 38 folículos) e os animais com a menor população folicular (34%) foram incluídos no grupo baixa população (GB; n=91, < 28 folículos). Os animais foram submetidos a três exames ultrassonográficos ovarianos (dias D-10, D0 e D28). No D0, dia aleatório do ciclo estral, todas as vacas receberam um dispositivo intravaginal contendo progesterona (1,0 g, DIB®) e benzoato de estradiol (BE; 2,0 mg, IM, Estrogin®). Oito dias mais tarde (D8) foram administrados 75 µg de d-cloprostenol (Croniben®) e o dispositivo intravaginal foi removido. Vinte e quatro horas após a remoção do DIB, as vacas foram tratadas com BE (1,0 mg, IM) e 30 a 36 h após os animais foram submetidas à IATF. Os dados foram analisados pelo PROC GENMOD e FREQ do SAS System 9.1 para Windows (2002-2003). A média (±DP) de folículos antrais em ambos os ovários foi de 32,7±17,8. Não houve diferença (P=0,144) na taxa de prenhez entre os animais GA, GB e GI (32,6; 46,6 e 42,9%, respectivamente). Porém houve diferença na probabilidade de ficar prenhe (P=0,0268) conforme diminuiu a AFC nas vacas em anestro aumentou a probabilidade de prenhez (N=138). Em nosso estudo verificamos que não houve diferença na taxa de prenhez por IATF entre vacas Nelore lactantes com alta ou baixa população de folículos antrais ovarianos, entretanto, neste estudo os animais em anestro com menor AFC apresentaram maior probabilidade de se tornarem gestantes. Apoio FAPESP: Processos 2013/02201-3 (VGP), 2011/50259-5 (RLE), 2012/23409-9 (EMR) e 2012/50533-2 (MFGN).

SBTE 214 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

A contagem de folículos antrais ovarianos ≥ 3 mm de diâmetro está associada à fertilidade em vacas aberdeen angus lactantes?

Vinicius Gonçalves Pinheiro[1]; Ronaldo Luiz Ereno[1]; Eduardo Montanari Razza[1]; Ciro Moraes Barros[1]; Marcelo Fabio Gouveia Nogueira[2]
1.Departamento De Farmacologia - Universidade Estadual Paulista - UNESP; 2.Departamento De Ciências Biológicas, FCL, UNESP.

Palavras-chave: Folículos antrais; angus; fertilidade

Na espécie bovina, o crescimento folicular ocorre em um padrão de ondas, que podem variar de 2 a 3 por ciclo estral. Estas ondas são caracterizadas pelo crescimento sincrônico de um grupo de folículos antrais, onde normalmente apenas um destes se tornará dominante. A quantidade de folículos recrutados, por onda, é variável entre os animais e entre raças, porém apresenta alta repetibilidade entre os indivíduos. Ereno e colaboladores (2013) relataram que, em raças zebuínas, a quantidade de folículos recrutados por onda é maior quando comparada com raças taurinas. Essa variação, na população folicular ovariana, pode interferir na fertilidade por influenciar a competência oocitária (Ireland et al., 2007). Objetivou-se, com o presente estudo, identificar fêmeas da raça Aberdeen Angus (Bos t. taurus), que possuam elevadas e reduzidas contagens de folículos antrais (AFC) recrutadas por onda folicular e compará-las quanto as taxas de prenhez. Foram utilizadas 272 vacas Aberdeen Angus multíparas, entre 40 e 70 dias pós-parto e com escore de condição corporal entre 2,5 a 4,0 (escala de 5 pontos). As vacas foram distribuídas em grupos de acordo com a contagem de folículos antrais (≥ 3 mm de diâmetro). Desta forma, 35% dos animais com a maior AFC foram incluídos no grupo alta população (GA; n=94, > 22 folículos), enquanto que os animais com contagem intermediária (31%) foram alocados no grupo intermediário (GI; n=85, entre 15 e 22 folículos) e os animais com a menor população (34%) foram incluídas no grupo baixa população (GB; n=93, ≤ 15 folículos). Os animais foram submetidos a três exames ultrassonográficos ovarianos (dias D-10, D0 e D28). No D0, dia aleatório do ciclo estral, todas as vacas receberam um dispositivo intravaginal contendo progesterona (1,0 g, DIB®) e benzoato de estradiol (BE; 2,0 mg, IM, Estrogin®). Oito dias mais tarde (D8) foram administrados 75µg de d-cloprostenol (Croniben®) e o dispositivo intravaginal foi removido. Vinte e quatro horas após a remoção do DIB, as vacas foram tratadas com BE (1,0 mg, IM) e 30 a 36 h após os animais foram inseminados artificialmente em tempo fixo (IATF). Os dados foram analisados pelo PROC GENMOD e FREQ do SAS System 9.1 para Windows (2002-2003). A média (±DP) de folículos antrais em ambos os ovários foi de 19,97±9,03. Não houve diferença (P=0,12) na taxa de prenhez entre os animais GA, GB e GI (54,3, 39,8, e 43,5%, respectivamente). Porém houve diferença na probabilidade de ficar prenhe (P=0,0491) conforme aumentou a AFC elevou a possibilidade de ficar prenhe.Em nosso estudo verificamos que não houve diferença na taxa de prenhez por IATF entre vacas Aberdeen Angus lactantes com alta ou baixa população de folículos antrais ovarianos, entretanto, neste estudo os animais com a maior AFC apresentaram maior probabilidade para se tornarem gestantes. Apoio FAPESP: processos #2013/02201-3 (VGP), #2011/50259-5 (RLE), #2012/23409-9 (EMR) e #2012/50533-2 (MFGN).

SBTE 215 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Acurácia de duas formas de diagnóstico de gestação precoce em bovinos por ultrassonografia

Aécio Silveira Raymundy; Tochimara Aparecida Miyauchi; Romeu Luiz De Podestá Junior; Lucas Freire Pereira; Junior Henrique De Oliveira; Ana Cristina Silva De Figueiredo; Jairo Pereira Neves; Carlos Antônio De Carvalho Fernandes; Felipe Costa Gonçalves
UNIFENAS.

Palavras-chave: Bovino; ultrassonografia; diagnóstico de gestação

O emprego da ultrassonografia no diagnóstico de gestação tem sido uma ferramenta indispensável para o bom desempenho reprodutivo. O diagnóstico de gestação via ultrassonografia permite detectar precocemente qual fêmea não está gestante e tomar uma decisão que permita torná-la gestante mais rápido possível, reduzindo assim o tempo que estes animais permanecem não gestantes. Existem duas formas de diagnóstico de gestação por ultrassonografia: A primeira seria pela tradicional visualização do feto e batimento cardíaco e a segunda pela constatação da vesícula amniótica, caracterizada por presença de conteúdo totalmente anecóico e parede uterina distendida, sinais considerados patognomônicos de gestação em bovinos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a acurácia e o tempo de execução destas duas formas de diagnóstico precoce de gestação por ultrassonografia em bovinos. Foram avaliadas 674 fêmeas bovinas mestiças utilizadas como receptoras de embrião em uma mesma propriedade rural, localizada no sul de Minas Gerais. Estas foram distribuídas de forma aleatória em dois tratamentos: T1 (N=351), diagnóstico pela detecção da vesícula amniótica e T2 (n=323), pela visualização do feto e batimento cardíaco. Todos os animais se encontravam entre 28 e 32 dias de gestação. Foi utilizado um mesmo equipamento para as duas formas de diagnóstico (Mindray™M5) com um transdutor transretal de 5MHz. O tempo de execução de cada exame foi calculado utilizando-se um cronômetro digital. As fêmeas gestantes em ambos os exames foram novamente avaliadas por ultrassonografia considerando as características da vesícula e presença do feto, 30 dias mais tarde. Os dados foram avaliados por Anova. As diferenças no percentual de fêmeas gestantes entre 30 e 60 foram comparadas pelo teste exato de Fisher. Considerou-se significância, diferenças inferiores a 5% de probabilidade. A taxa de gestação total inicial foi de 49,40% (333/674), das quais 172 consideradas gestantes utilizando o T1 e 161, utilizando o T2. A diferença entre o total de vacas gestantes entre 30 e 60 dias foi de 5,70% e 5,88% para T1 e T2, respectivamente (P>0,05), mostrando que os dois métodos tem a mesma eficiência de acurácia para diagnóstico de gestação aos 30 dias. O tempo médio de execução do diagnóstico foi menor (P<0,05) em T1 que T2 (0,5+0,3 vs 1,8+1,6 minutos). Conclui-se que as duas técnicas de diagnóstico precoce de gestação, tem a mesma acurácia aos 30 dias. Como o tempo de manipulação da fêmea é menor em T1, este é o método mais indicado.

Agradecimento: Fapemig, Capes e CNPq.

SBTE 216 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Alterações reprodutivas em machos androgenizados durante a gestação

Manuela Wolker Manta; Ricardo Della Méa; Carolina Dos Santos Amaral; Mariana Priotto De Macedo; Lady Katerine Serrano; Fabio Vasconcellos Comim; Paulo Bayard Dias Gonçalves; Alfredo Quites Antoniazzi; Karine Campagnolo; Joabel Tonellotto Dos Santos
Universidade Federal De Santa Maria.

Palavras-chave: Androgenizados; alteracões; reproducão

Objetivos: O presente trabalho objetivou verificar as alterações reprodutivas ocorridas em carneiros que foram androgenizados durante a gestação em um modelo desenhado para a síndrome dos ovários policísticos (SOP). Materiais e Métodos: Animais - Fêmeas adultas de ovinos da raça Corriedale, oriundos de criador credenciado no estado do RS foram utilizadas após a aprovação ética no CEUA-UFSM (protocolo CEUA-UFSM 009-2013). O protocolo de androgenização consistiu na administração de testosterona propionato 100 mg (Androgenol®, Juatuba, Brasil) IM 2 vezes por semana nas mães entre os dias 30 até 90 de gestação. As ovelhas do grupo controle foram mantidas sem tratamento. Após o nascimento dos machos (controles n=5 e androgenizados n=8) foi realizado o acompanhamento de peso com balança digital e perímetro escrotal empregando fita métrica. A análise qualitativa do sêmen empregou microscópio binocular e foi feita por ocasião da castração aos 16 meses (controles = 3; androgenizados =5). Houve um caso de criptorquidismo entre os machos androgenizados. Para a comparação entre dois grupos de variáveis com distribuição normal foi empregado o teste T de Student. Proporções foram analisadas pelo uso do teste de Fisher. O p considerado como significativo foi <0.05. Resultados: Em nenhum momento foram observadas diferenças significativas de peso entre animais androgenizados e seus controles. Aos 16 meses o peso no grupo controle (média + DP) foi de 33,0 ± 2,5 kg enquanto no grupo androgenizado estava em 32,15 ± 3,91. Da mesma forma, não houve mudanças significativas no perímetro escrotal ao longo do tempo, sendo 21,33 ± 0,44 cm nos controles e 21,13 ± 0,65 cm em machos androgenizados (NS). Ocorreu um caso de criptorquidia cujos testículos eram bastante reduzidos em tamanho. Todavia, a análise de sêmen mostrou algumas alterações no grupo androgenizado, onde cerca de 60% possuíam vigor igual a 1 e 75% motilidade igual ou inferior a 40%. Quando analisados em conjunto (vigor >2 e motilidade > 40%) foi observada uma diminuição significativa da proporção destas características de sêmen nos animais androgenizados durante a gestação em comparação aos controles (p =0.0476, Teste de Fisher). Conclusões: No modelo utilizado, a androgenização pré-natal na raça Corriedale não ocasionou diferenças no perímetro escrotal, embora tenha sido deletéria para a qualidade do sêmen, o que já foi descrito previamente com a raça Suffolk (Recabarren SE et al, Endocrinology 149(12):6444; 2008).

SBTE 217 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Avaliação do tempo de gestação em éguas da raça crioula – dados preliminares

Bruna Suñé Moraes[1]; Bruna Da Rosa Curcio[1]; Veronica La Cruz Bueno[1]; Leonardo Motta Fornari[1]; Ilusca Sampaio Finger[1]; Luciana Oliveira De Araujo[1]; Renato Rocha De Quadros[2]; Carlos Wayne Nogueira[1]
1.Universidade Federal De Pelotas; 2.Médico Veterinário.

Palavras-chave: Equinos; características reprodutivas; crioulos

A participação de cavalos da Raça Crioula em competições tem crescido muito nos últimos anos. A crescente valorização do mercado de equinos da raça Crioula estimula a realização de pesquisas acerca das características reprodutivas da raça. Apesar do crescimento da utilização das biotécnicas de reprodução, ainda são poucos os estudos referentes ao acompanhamento gestacional. O objetivo deste estudo foi determinar as variações fisiológicas relacionadas ao tempo de gestação em éguas da raça Crioula. Foi realizada coleta de dados retrospectivos e prospectivos de um criatório na região sul do Rio Grande do Sul, localizado na cidade de Bagé. Foram avaliadas 50 éguas nas temporadas reprodutivas dos anos de 2008 a 2014. As variáveis consideradas foram tempo de gestação, idade da égua, números de partos e gênero dos potros. O tempo de gestação foi determinado pelo tempo entre a ovulação e parto. As éguas foram divididas em dois grupos de acordo com a idade: Jovens (até 7 anos) e Velhas (> 8 anos). Para comparação do tempo de gestação em relação à idade das éguas e gênero dos potros foi realizado teste Two Sample T test. Foi realizado teste de correlação de Pearson entre o número de partos e tempo de gestação. Os resultados estão apresentados em média + Erro Padrão. Foi observado tempo de gestação de 334 dias + 1,5, com intervalo de 313 a 371 dias de gestação. Com relação à idade, foi observado menor tempo de gestação nas éguas jovens (331 dias + 1,7) em relação às éguas mais velhas (338 dias + 2,4). Não foi observada diferença no tempo de gestação de acordo com gênero dos potros. Foi identificada uma tendência à correlação positiva entre o tempo de gestação e o número de partos das éguas (r=0,24, p=0,08). O tempo de gestação em éguas é de 320 a 360 dias, sendo que estes valores variam de acordo com a raça e população estudada, embora gestações de 310-380 dias possam resultar no nascimento de potros viáveis. Esta variação ocorre devido à influência de fatores maternos, fetais e ambientais. Dentre os fatores maternos inclui-se a idade da égua, o estado nutricional e o número de partos, nos fatores fetais destaca-se o gênero do potro e nos fatores ambientais o mês do parto, o clima e o ano do parto (Bueno, et al., III Congreso Argentino de Reproduccioón Equina. Córdoba: UniRio, 2013. v. III. p. 137-139, 2013). Os resultados do presente estudo corroboram a média de tempo de gestação descrito para raça (Winter et al., J. Equine Vet. Sci. v.27, n.12, p.531–534, 2007). Este estudo é primeira descrição da relação entre fatores maternos e fetais com o tempo de gestação em éguas Crioulas. Conclui-se que éguas mais jovens apresentam menor tempo de gestação em relação às éguas mais velhas, além de uma tendência à correlação positiva entre o tempo de gestação e o número de partos das éguas da raça Crioula.

Agradecimentos: Associação Brasileira de Criadores de Cavalos Crioulos (ABCCC), CAPES, FAPERGS, CNPq.

SBTE 218 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Avaliação metabólica de vacas holandesas repetidoras de serviço durante o verão e o inverno

Paula Pereira Da Matta[1]; Daniela Becker Birgel[1]; Eduardo Harry Birgel Junior[1]; Vivian Fratti Penna Ríspoli[1]; José Nélio De Sousa Sales[2]; Pietro Sampaio Baruselli[3]; Flavio Vieira Meirelles[1]; Roberta Machado Ferreira[1]
1.Departamento De Medicina Veterinária Da FZEA-USP; 2.Departamento De Medicina Veterinária Da UFLA; 3.Departamento De Reprodução Animal Da FMVZ-USP.

Palavras-chave: Metabolismo; repetição de serviços; vaca de leite

O objetivo foi determinar a ocorrência de alterações metabólicas em vacas Holandesas repetidoras de serviço (RS, n=67), comparadas a vacas em pico de lactação (PL, n=70) e novilhas (NOV, n=70) no verão (V) e inverno (I). Os metabólitos avaliados (Analisador Bioquímico Automático, Randox Daytona) do soro sanguíneo foram colesterol (CHOL), uréia, BHB, AGNEs, proteína total (PT), albumina (ALB), globulinas (GLOB), AST, GGT, CK, triglicérides (TRIGS), DHDL, LDL, VLDL, glicose (GLI) e creatinina (CREA). Os dados foram analisados por GLIMMIX, SAS. Não houve interação estação-categoria (est.-cat.) para ALB (P=0,58), AST (P=0,10), GGT (P=0,31), CK (P=0,49) e ALB/GLOB (P=0,12), CHOL (P=0,58), LDL (P=0,60), AGNEs (P=0,16), GLI (P=0,88), uréia (P=0,30) e CREA (P=0,34). Não houve efeito de cat. para CREA (NOV: 0,92±0,02; PL: 0,94±0,03; RS: 0,98±0,03mg/dL; P=0,34) e de est. para ALB (3,17±0,03 vs 3,16±0,03mg/dL; P=0,84), CHOL (119,5±6,0 vs 123,6±5,2mg/dL; P=0,31), LDL (78,9±4,9 vs 74,5±4,0mg/dL; P=0,49), GLI (63,5±0,8 vs 62,2±1,1mg/dL; P=0,31) e CREA (0,93±0,02 vs 0,96±0,02mg/dL; P=0,20), I e V. No V houve maior AST (59,3±3,0 vs 67,5±1,8U/L; P=0,0005) e menor de GGT (21,2±3,1 vs 17,8±2,0U/L; P=0,03), CK (140,7±44,8 vs 72,1±4,3U/L; P=0,007), ALB/GLOB (0,77±0,02 vs 0,69±0,01; P=0,002), AGNEs (0,34±0,03 vs 0,29±0,02mMol/L; P=0,03) e uréia (33,5±1,3 vs 26,6±0,9mg/dL; P<0,0001), independente da cat.. NOV tiveram maior CK (162,8±61,9b vs 69,7±5,3a vs 80,1±11,1aU/L; P=0,0003) e menor ALB (2,97±0,03b vs 3,24±0,04a vs 3,30±0,03ag/dL; P<0,0001), AST (53,2±1,9b vs 73,4±3,7a vs 64,3±2,6aU/L; P=0,0005), GGT (8,4±0,9b vs 22,1±1,6a vs 28,2±4,9aU/L; P<0,0001), CHOL (60,6±1,5b vs 156,1±5,5a vs, 149,5±5,1amg/dL; P<0,0001), LDL (30,2±1,1b vs 102,0±4,4a vs 98,5±4,5amg/dL; P<0,0001) e uréia (22,8±1,0b vs 36,0±1,6a vs 30,8±1,1amg/dL; P<0,0001) do que PL e RS, independente de est.. Vacas RS tiveram valor intermediário de AGNEs (NOV:0,15±0,01c; PL:0,45±0,03a; RS:0,35±0,02bmMol/L; P<0,0001) e GLI (NOV:69,9±1,2a; PL:56,4±0,9c; RS:62,0±0,9bmg/dL; P<0,0001). Houve interação cat.-est. para PT (P=0,03), GLOB (P=0,04), TRIGS (P=0,02), DHDL (P=0,009), VLDL (P=0,02) e BHB (P=0,0003). No I, PT e GLOB não diferiram entre cat.. No V, NOV foi inferior a PL e RS para PT (7,5±0,1b vs 7,9±0,1a vs 8,1±0,1ag/dL; P<0,005) e inferior a RS para GLOB (4,5±0,1b vs 4,7±0,1ab vs 4,8±0,1a; P=0,0002). Para TRIGS e VLDL, NOV foi inferior às vacas no I (TRIGS: 24,5±1,2a vs 16,3±0,6b vs 16,1±0,9bmg/dL; VLDL: 4,9±0,2a vs 3,3±0,1b vs 3,2±0,2bmg/dL) e superior no V (TRIGS: 27,4±1,4a vs 14,3±0,5c vs 18,0±1,0bmg/dL; VLDL: 5,5±0,3a vs 2,9±0,1c vs 3,6±0,2bmg/dL). Os metabólitos, apesar de diferirem entre est. e categ., estão na normalidade para vacas de leite, não sendo indicativos de alterações patológicas. Tais diferenças devem estar ligadas à produção de leite, IMS, atividade física e nutrição, inerentes a cada categ. e est., não podendo ser consideradas causas da RS. Agrad: FAPESP 2012/07510-1, CNPq 486089/2013-4.

SBTE 219 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Bloqueio farmacológico da trimetilação da H3K27 altera a expressão do complexo repressor polycomb 2 em blastocistos bovinos PIV

Luciana Simoes Rafagnin Marinho[1]; Camila Oliveira Rosa[1]; Paula Alvares Lunardelli[1]; Bruno Valente Sanches[2]; Rodrigo Camponogara Bohrer[3]; Werner Giehl Glanzner[4]; Karina Gutierrez[4]; Paulo Roberto Antunes Da Rosa[4]; Marcelo Marcondes Seneda[1]; Vilceu Bordignon[3]
1.UEL; 2.In Vitro Brasil LTDA; 3.Mcgill University; 4.UFSM.

Palavras-chave: Desenvolvimento embrionário; h3k27me3; complexo repressor polycomb 2

A trimetilação da lisina 27 da histona H3 (H3K27me3) é estabelecida pelo Complexo Repressor Polycomb 2 (PRC2) e está associada ao silenciamento gênico. Em células pluripotentes, os genes relacionados ao desenvolvimento e à diferenciação celular são mantidos inativos pela H3K27me3. Entretanto, este processo não é inteiramente compreendido. O inibidor da AdoHcy hidrolase 3-Deazaneplanocin A (DZNep) é capaz de bloquear a ação das enzimas do PRC2 e assim inibir a H3K27me3. Este estudo avaliou o efeito do tratamento de embriões bovinos durante o desenvolvimento *in vitro* com DZNep na expressão dos genes codificadores das enzimas do PRC2 (EZH2, EED e SUZ12), fatores de transcrição reguladores da pluripotência (OCT4 e NANOG) e diferenciação do trofectoderma (CDX2). Oócitos provenientes de ovários de abatedouro foram submetidos à maturação *in vitro* (MIV) por 24 h a 38,5 °C, com 5% CO2 em ar e umidade saturada. A fecundação *in vitro* (FIV) foi realizada com sêmen descongelado, previamente testado, de um touro da raça Nelore. Os oócitos permaneceram em cocultivo com os espermatozoides por 22 h, nas mesmas condições da MIV. No D3 (considerando-se o dia da FIV como D0), os embriões clivados foram aleatoriamente separados em quatro grupos e expostos a 5 µM DZNep: a) do D3 ao D5 (DZNep D3-D5); b) do D3 ao D8 (DZNep D3-D8); c) do D5 ao D8 (DZNep D5-D8); ou d) sem DZNep (grupo controle). Os embriões que se desenvolveram até o estágio de blastocisto foram coletados em D8 para a extração de RNA seguida de qRT-PCR para avaliar a abundância de transcritos. O experimento foi repetido três vezes e todas as amostras foram analisadas em duplicata, com 30 embriões por grupo. O RNA total foi extraído através do kit de isolamento PicoPure RNA (Life Technologies) e o cDNA foi sintetizado com o kit de síntese SuperScript VILO cDNA (Life Technologies). A abundância relativa de mRNA foi normalizada com base nos níveis de dois genes de referência (beta actina e 18S ribossomal). Os dados foram avaliados por análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Dunnett, com 5% significância. O tratamento com DZNep não alterou os níveis de mRNA dos genes SUZ12, NANOG, OCT4 e CDX2 em embriões que se desenvolveram até o estágio de blastocisto. Entretanto, a exposição ao DZNep do dia 3 a 8 aumentou os níveis de mRNA dos genes codificadores das enzimas Polycomb EZH2 e EED. Resultados de nossos estudos prévios confirmaram que a exposição de embriões bovinos ao DZNep durante os mencionados períodos de cultivo reduziu a formação de blastocistos. Estes resultados indicam que a inibição da H3K27me3 altera a regulação das enzimas Polycomb EZH2 e EED em embriões em estágio inicial de desenvolvimento, sugerindo que estas enzimas estejam envolvidas na proliferação celular e formação de blastocistos em embriões bovinos.

SBTE 220 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Bloqueio meiótico de oócitos bovinos com cordicepim: cinética de maturação e produção embrionária

Camila Ceccato Ferreira; Andressa P. Souza; Diana De Matia Liposki; Joana Claudia Mezzalira; Lain Uriel Ohlweiler; Alceu Mezzalira
UDESC.

Palavras-chave: Bloqueador meiótico; maturação oocitaria; pré-maturação

O bloqueio meiótico pode ser uma alternativa para melhorar a maturação oocitária *in vitro*. Com o objetivo de investigar os efeitos de uma pré-maturação com o bloqueador cordicepim, oócitos bovinos foram utilizados em 3 experimentos, que avaliaram a cinética de maturação nuclear logo após o bloqueio (experimento 1), após um período de maturação de 20 ou 24 h (experimento 2), e o desenvolvimento embrionário *in vitro* (experimento 3). Os dados obtidos foram submetidos ao teste de Qui-quadrado com nível de significância de 5%. No experimento 1, 456 oócitos foram incubados por 6 h, em um dos seguintes tratamentos: meio de maturação padrão (contendo soro e gonadotrofinas) desprovido (IVM/CONT) ou adicionado (IVM/CORD) de cordicepim (79,6 nM/mL), ou ainda em meio TCM-199 (sem aditivos), desprovido (TCM/CONT) ou adicionado de cordicepim (TCM/CORD). Os oócitos foram então fixados para análise do status nuclear. O cordicepim na ausência de aditivos (TCM/CORD), bloqueou significativamente (67,0%) os oócitos em VG/VGBD, em comparação aos demais grupos IVM/CONT, IVM/CORD e TCM/CONT (respectivamente 52,5%, 47,7% e 45,7%). No experimento 2, 504 oócitos foram submetidos aos tratamentos IVM/CONT e TCM/CORD por 6 h, seguido da maturação por 20 ou 24 h, avaliando-se o status nuclear ao final da maturação. Observou-se uma redução das taxas de MII (bloqueio irreversível) nos oócitos tratados com cordicepim, na ausência de aditivos (TCM/CORD) com 20 h de maturação TCM/CORD+20 (47,3%), ou 24 h de maturação TCM/CORD+24 (64,8%), em relação aos tratamentos com aditivos IVM/CONT+20 (98,8%) e IVM/CONT+24 (100%) de MII, respectivamente. No experimento 3, para se avaliar as taxas de desenvolvimento embrionário (clivagem e blastocistos), 1527 oócitos foram submetidos aos tratamentos IVM/CONT+20h, IVM/CONT+24h, TCM/CONT+20h e TCM/CORD+24h, sendo após submetidos a ativação partenogenética. O cordicepim reduziu significativamente as taxas de clivagem, tanto após 20 h (42,0 versus 56,4%), quanto após 24 horas de maturação (44,3 versus 54,4%). Já as taxas de blastocisto foram reduzidas pelo Cordicepim, após 20 h de maturação (12,1 versus 24,8%), porém não foram afetadas com maturação de 24 h (22,9 versus 25,0%). Conclui-se que o cordicepim bloqueia oócitos de forma irreversível, quando empregado em meio desprovido de soro e gonadotrofinas, porém não exerce efeito bloqueador na presença destes aditivos. Ainda, o aumento do tempo de maturação de 20 para 24 h previne o efeito negativo do bloqueio pré-maturação com cordicepim, sobre a taxa de blastocistos.

SBTE 221 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Caracterização do perfil lipídico de embriões suínos da raça piau.

José Oliveira Carvalho[1]; José Felipe Warmling Sprícigo[2]; Luciano Paulino Da Silva[3]; Ligiane Oliveira Leme[2]; Bianca Damiani Marques Silva[3]; Ana Luiza Silva Guimarães[2]; Alexandre Floriani Ramos[3]; Margot Alves Nunes Dode[3]
1.Universidade De São Paulo; 2.Universidade De Brasília; 3.Embrapa Recursos Genéticos E Botecnologia.

Palavras-chave: Embrião; espectrometria de massa; porcas

A raça Piau é uma das raças localmente adaptadas de suínos que está em constante diminuição de sua população, devido a cruzamentos absorventes com raças mais precoces e rentáveis economicamente. Desta forma, é de grande importância a manutenção deste recurso genético, o que pode ser feito pela criopreservação de gametas e embriões. Entretanto, técnicas adequadas para o sucesso da criopreservação de germoplasma em suínos ainda não estão estabelecidas. Para que se possa propor protocolos que aumentem a eficiência dessas técnicas é necessário conhecer as características do material a ser criopreservado. Portanto, o objetivo deste estudo foi realizar a caracterização do perfil lipídico de embriões suínos da raça Piau. Para isto 4 marrãs da raça Piau tiveram o estro observado diariamente, duas vezes ao dia, e foram acasaladas por monta natural 12 e 24 horas após a detecção de estro. Seis dias após a monta, foi realizada a coleta dos embriões por laparotomia. Os embriões (blastocisto expandido, grau 1 de qualidade; n=8) foram armazenados em metanol, à -80°C. Para a determinação do perfil dos fosfolipídeos, os espectros foram obtidos por meio de espectrometria de massa MALDI-TOF. Os espectros de massa foram adquiridos na frequência entre 700-90 m/z, no modo positivo/refletido em um espectrômetro de massa AutoFlex Speed MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics, Alemanha). Para a ionização cada embrião, foi depositado individualmente em um poço da placa de MALDI,e coberto com uma matriz de ácido 2,5-di-hidroxibenzóico (DHB). Foram identificados 16 lipídeos. Entre os fosfolipídeos encontrados, as fosfatidilcolinas [PC (32:0) + H]+, [PC (34:1) + H] + e [PC (36:4) + H]+, representadas pelos os íons 734,5; 760,5 e 782,5 m/z se destacaram pela alta intensidade. Também foram identificados alguns triglicerídeos, o PPL (50:2) + Na+, PPO (50:1) + Na+, PLO (52:3) + Na+ e o POO (52:2) + Na +, representados pelos íons 753,5; 755,7; 879,7 e 881,6 m/z. O perfil lipídico encontrado assemelha-se aos espectros de embriões de bovinos e ovócitos humanos (Ferreira et al. Journal of Lipid Research, v.51, p. p.1218-1227, 2010). Já os triglicerídeos observados, não foram relatados em embriões bovinos, mas são semelhantes aos de ovócitos bovinos. Estes resultados caracterizam o perfil lipídico de embriões suínos da raça Piau. Este conhecimento pode ser utilizado na otimização da criopreservação de embriões Piau, processo esse fundamental para a conservação deste material genético.

SBTE 222 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Características morfológicas das lesões de placentite em éguas

Fernanda Maria Pazinato[1]; Bruna Da Rosa Curcio[1]; Lorena Soares Feijó[2]; Luciana Oliveira De Araujo[1]; Laura Correa De Oliveira[1]; Vitória Muller[3]; Carlos Wayne Nogueira[1]
1.Universidade Federal De Pelotas - UFPEL; 2.University Of Illinois; 3.University Of Kentucky.

Palavras-chave: Características morfológicas; placenta; equinos

O desenvolvimento e sanidade da unidade útero-feto-placentária é decisiva para adequado crescimento e viabilidade fetal. Na espécie equina, a principal alteração placentária é a placentite (BUCCA, Vet Clin Equine Pract, 752, 2006). O objetivo do presente estudo foi avaliar as características morfológicas das lesões de placentite em éguas Puro Sangue Inglês (PSI) no pós-parto imediato. Foram acompanhados os partos de 188 éguas PSI no período de 2011 à 2013, das quais foram identificados 40 casos de placentas com lesões histopatológicas compatíveis com placentite no pós-parto. Imediatamente após sua expulsão, as placentas foram submetidas a avaliação macroscópica, e coletados fragmentos de nove pontos placentários (estrela cervical, corpo uterino, corno gravídico e não gravídico, bifurcação, âmnion e três pontos de cordão umbilical). Os fragmentos foram fixados em formalina 10%, para posterior confecção de lâminas histológicas. As lâminas foram avaliadas em microscopia de luz. Em 82,5% (33/40) dos casos a macroscopia foi condizente com quadro de placentite, apresentando áreas de ausência de vilosidades, edema e presença de conteúdo supurativo na superfície coriônica. Foram observadas 52,5% (21/40) placentas com infiltrado de neutrófilos em microcotilédones e lâmina própria, com áreas de necrose e conteúdo eosinofílico amorfo na superfície coriônica, caracterizando placentite aguda, quadro geralmente associado a infecções bacterianas. As outras 47,5% (19/40) placentas apresentaram infiltrado histiolinfocitário, com necrose discreta a moderada dos vilos e por vezes presença de edema de lâmina própria, característicos de placentite crônica. Do total de placentas estudadas, lesões com distribuição morfológica característica de placentite ascendente foram identificadas em 72,5% (29/40), as quais eram presentes em estrela cervical e corpo uterino. Foram observadas 12,5% (5/40) de placentas com lesões de distribuição focal nas regiões de corno gravídico, corno não gravídico e bifurcação, esses quadros geralmente associados a infecções fúngicas, apesar de não ter sido evidenciado o agente etiológico nas avaliações histológicas. Em 15% (6/40) a distribuição das lesões foi difusa, característica morfológica que esta geralmente associada a infecções de origem hematógena. O diagnóstico de placentite hematógena pode ser difícil de realizar no transcorrer da gestação, sendo geralmente identificado no pós-parto, visto que muitas éguas não apresentam sinais clínicos característicos (WILLIAMS, Proc. 22º Workshop on the Equine Placenta, 90, 2004). Pode-se concluir que dentre os casos de placentite, foi observada maior incidência de placentite ascendente. As características morfológicas focais e difusas perfizeram um total de 28% na população avaliada, dessa forma, mais estudos são necessários para a identificação dos sinais clínicos e agentes etiológicos desses quadros de placentite.

Agradecimentos: FAPERGS, CAPES, CNPQ e Haras Santa Maria de Araras.

SBTE 223 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Descarte involuntário de vacas leiteiras por alterações reprodutivas

Julia Brum Spreckelsen Casarin[1]; Thainá Minela[1]; Diego Fontoura Simões[1]; Mariani Farias Fiorenza[2]; Ricardo Olimpio Schenatto[2]; Janislene Mach Trentin[2]; Ana Paula Martini[1]; Gilson Antonio Pessoa[2]; Manoel Francisco Sá Filho[3]; Mara Iolanda Batistella Rubin[1]
1.Universidade Federal De Santa Maria; 2.Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul; 3.USP.

Palavras-chave: Descarte involuntário; bovinocultura de leite; problemas reprodutivos

O descarte involuntário de vacas leiteiras é uma prática complexa que depende das metas de produção da propriedade rural (Silva et al. Rev Bras Saúde Prod Anim 5(1), 9-17, 2004). Este estudo avaliou as principais causas de descarte em fazendas leiteiras na região centro-noroeste do RS/Brasil. Os dados foram obtidos em 5 fazendas (A, B, C, D e E) em um período de 5 anos (2010-2014) cujas fêmeas em lactação (n=2861) possuíam o total médio de 114,4 ± 17,6 vacas em lactação/rebanho. As principais causas de descarte involuntário relacionadas ao sistema reprodutor, mamário ou locomotor foram avaliadas. Para análise estatística utilizou-se o MEANS, PROC GLIMMIX, PROC CORR e PROC REG do SAS (SAS 9.3, USA, 2003). A produção de leite média dos rebanhos durante o período de estudo foi de 23,8 ± 0,6 kg/vaca/dia (A= 23,5 ± 0,8; B = 23,5 ± 0,7; C= 24,4 ± 0,9; D= 27,6 ± 0,9; E =20,2 ± 0,7 kg/vaca/dia) (P < 0,0001). A taxa prenhez/IA de 41,5 ± 1,8% (A= 38,3 ± 5,0; B= 42,7 ± 4; C= 42 ± 4,5; D= 35,2 ± 1,6; E= 49,5 ± 3,1% P/IA) (P = 0,1247). Correlação negativa foi encontrada entre a produção de leite e a taxa de prenhez/IA (P < 0,0001; r = -0,79). Durante o período foram descartadas 22,2% das vacas em atividade produtiva (634/2861), ou seja, descarte geral, sendo 77,3% (490/634) por descarte involuntário e 22,7% (144/634) por descarte voluntário. Os problemas reprodutivos 39,4% (250/634) foram as principais causas de descarte nos rebanhos e também a principal dentre as causas de descarte involuntário, 51,1% (250/490) (P = 0,001). As afecções do sistema mamário 38,9 % (191/490) e locomotor 10 % (49/490) continuam a ocorrer ainda hoje. Dentre as causas reprodutivas as vacas repetidoras de cio contribuíram em 40,8% (80/196), fêmeas que abortaram e soropositivas para *Neospora caninum* 27,5% (54/196), metrite/endometrite pós-parto 20,4% (40/196) e as fêmeas apresentaram outras causas reprodutivas (cistos ovarianos, distocias e cirurgias obstétricas) foram representadas em 11,2% (22/196). Não se observou diferença entre fazendas quanto ao percentual de descarte involuntário por causas reprodutivas (A= 44,2; B = 45,7; C= 48,4; D= 33,1; E=35,6 %) (P = 0,2131). No entanto, o percentual total de descarte das fazendas A e B foi menor (15,7% e 14,6%); já as fazendas C, D e E tiveram 24,4%, 25,7% e 24,6%, respectivamente (P = 0,0129). Pode-se concluir que os problemas reprodutivos são a maior causa de descarte involuntário nas fazendas leiteiras estudadas. A melhoria no manejo e o sistema de monitoramento para descarte involuntário deve ser implantada nas fazendas para evitar perdas econômicas.

SBTE 224 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Desempenho reprodutivo em novilhas *Bos indicus* e *Bos taurus* x *Bos indicus*. Efeito da eCG e nível de P4 em protocolos de IATF

Adnan Darin Pereira Rodrigues[1]; Rogerio Fonseca Guimaraes Peres[1]; Michael Lee Day[2]; Jose Luiz Moraes Vasconcelos[1]
1.Departamento De Produção Animal, FMVZ-UNESP; 2.University Of Wyoming, Department Of Animal Science.

Palavras-chave: *Bos indicus*; *Bos taurus* x *Bos indicus*; IATF

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos dos níveis de P4 e do tratamento com eCG em protocolos de IATF em novilhas *Bos indicus* (Nelore) e *Bos taurus* x *Bos indicus* (Cruzadas). As novilhas utilizadas no estudo (n = 1989) incluíram Nelores (n = 992) e Cruzadas (n = 997) com idade entre 14 e 24 meses (ECC 3,08 ± 0,01, PC 329,09 ± 0,66 Kg). Ultrassonografia ovariana foi realizada duas vezes (7 d de intervalo) em todas as novilhas no início do estudo para identificar novilhas com um CL presente. Novilhas com CL foram submetidas a IATF. Novilhas com ausência de CL em ambas avaliações foram submetidas a um protocolo de indução de puberdade (Rodrigues, Theriogenology, 82, 760, 2014). Apenas novilhas detectadas com CL na avaliação ultrassonográfica 12 d após a indução permaneceram no estudo. O protocolo de IATF utilizado em todas as novilhas foi: D0 – Inserção de um dispositivo intravaginal de P4 (CIDR 1,9g; 1º e 2º uso = Alta P4; 3º e 4º uso = Baixa P4; Zoetis, São Paulo, Brasil) e 2 mg i.m. de benzoato de estradiol (Gonadiol; Zoetis); D7 – 12,5 mg im de dinoprost trometamina (Lutalyse; Zoetis); D9 – remoção do CIDR e 0,5 mg im de ECP (ECP; Zoetis) e distribuição aleatória das novilhas para receberam 0 (Controle; 994) ou 200 UI (eCG; 995) de eCG (Novormom; Zoetis); D11 - 48 h após a remoção do CIDR foi realizado a IATF. Nos Dias 9 e 11 um subgrupo de novilhas foram avaliadas por US para determinar o diâmetro (Ø) do maior folículo. As variáveis contínuas foram analisadas utilizando o procedimento MIXED e as variáveis binarias através do procedimento GLIMMIX, ambos do SAS. Foram incluídos nos modelos os efeitos de raça, lote, eCG e CIDR. Diferenças foram significativas quando P < 0,05. O Ø folicular no D9 foi maior para novilhas Cruzadas (10,8 ± 0,01 mm) do que novilhas Nelore (9,9 ± 0,02) e para novilhas com Baixa P4 (10,7 ± 0,01) em comparação a Alta P4 (9,9 ± 0,01). O Ø folicular no D11 foi maior para novilhas com Baixa P4 (11,8 ± 0,01) quando comparado as novilhas com Alta P4 (11,4 ± 0,01) e novilhas Cruzadas tenderam a ter maior Ø folicular no D11 do que novilhas Nelore (11,8 ± 0,01 e 11,4 ± 0,01, respectivamente). A taxa de ovulação foi maior para novilhas Nelore do que novilhas Cruzadas (91,1% vs 88,0%, respectivamente). Novilhas Cruzadas (63,0%) tiveram maior taxa de concepção do que Nelore (57,8%). Novilhas Cruzadas (58,4%) tenderam a ter maior taxa de prenhez do que Nelore (54,1%). Além disso, houve interação entre nível de P4 e eCG na taxa de prenhez. As novilhas Alta P4 recebendo 0 UI de eCG (51,9%) tiveram menor prenhez do que Alta P4 recebendo 200 UI de eCG (62,4%). Entretanto, novilhas com Baixa P4, não houve efeito da eCG (56,6% para 0 UI e 54,1% para 200UI de eCG). Existem diferenças de resposta entre novilhas Nelore e Cruzadas submetidas ao mesmo protocolo de IATF e independente da raça, o tratamento com eCG aumentou a taxa de prenhez em novilhas com alta P4.

SBTE 225 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Desenvolvimento de embriões bovinos *in vitro* usando células-tronco mesenquimais de rato e fibroblastos embrionárias de camundongos

Jasmin Jasmin[1]; Sávio Carneiro Martins[2]; Fernanda Da Silva Gonçalves[3]; Ivan Júnior Ascari[4]; Luiz Sérgio De Almeida Camargo[1]; Rosalia Mendez-Otero[5]
1.Embrapa Gado De Leite; 2.Universidade José Do Rosário Vellano; 3.Universidade Federal De Juiz De Fora; 4.Universidade Federal De Lavras; 5.Universidade Federal Do Rio De Janeiro.

Palavras-chave: Produção de embriões bovinos *in vitro*; células-tronco mesenquimais; fibroblastos embrionário de camundongo

Fibroblastos embrionários de camundongo (MEFs) têm sido amplamente utilizados como camada alimentadora para células-tronco embrionárias, devido à sua liberação de fatores de crescimento. As células-tronco mesenquimais (MSCs) também liberam fatores bioativos que possam suportar o crescimento celular. Assim investigamos o efeito da co-cultura de MSC de medula óssea de rato ou MEF como fonte alimentadora na produção *in vitro* de embriões bovinos. Os oócitos coletados de ovários provenientes de matadouro foram maturados (meio TCM 199 em estufa à 38ºC em 5% de CO2 e umidade de 95%) em condição controle (CTRL) ou em co-cultura com MSC ou MEF previamente inativadas com 10ug/ml de mitomicina C (Sigma-Aldrich). A fecundação *in vitro* foi realizada sob a mesma condição CTRL para todos os grupos, e os embriões foram cultivados a partir do quarto dia em condição CTRL, ou em co-cultura com MSC ou MEF inativadas, formando os seguintes grupos experimentais na MIV/CIV: (CTRL/CTRL) – maturação e cultivo embrionário em condições CTRL; (CTRL/MSC) – maturação em CTRL e cultivo embrionário com MSC; (CTRL/MEF) – maturação em CTRL e cultivo embrionário com MEF; (MSC/CTRL) – maturação com MSC e cultivo embrionário em condição CTRL; (MSC/MSC) – maturação e cultivo embrionário com MSC; (MEF/CTRL) – maturação em MEF e cultivo embrionário em condição CTRL e (MEF/MEF) – maturação e cultivo embrionário com MEF. Os dados foram analisados pelo teste de qui-quadrado para oócitos e Kruskal-Wallis não paramétrico com pós-teste de Dunn para os embriões. Nenhuma diferença significativa foi encontrada na taxa de estruturas em metáfase II e apoptose entre os oócitos dos grupos CTRL, MSC e MEF, assim como não houve diferença significativa na taxa de clivagem no quarto dia após o início do cultivo *in vitro*. Não houve diferença significativa nas taxas de embriões em estágio de blastocisto, blastocisto expandido, blastocisto eclodido e blastocistos totais entre grupos experimentais (P>0,05) no sétimo dia de cultivo embrionário. No oitavo dia o grupo CTRL/CTRL apresentou uma maior taxa (P<0,05) de blastocisto eclodidos (14,3±1.9%) quando comparamos com o MSC/MSC (3,6±1,4%); no entanto, a proporção de blastocisto, blastocisto expandido e blastocistos totais não foram diferentes (P>0,05) entre os grupos experimentais. O número de células da massa célular interna, células do trofoblasto, células em apoptose e células totais foram iguais (P>0,05) entre os blastocistos dos diferentes grupos experimentais. Concluímos que a co-cultura na MIV ou CIV com MSC ou MEF não interfere no desenvolvimento de embriões bovinos.

SBTE 226 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Desenvolvimento *in vitro* de embriões e expressão gênica em células do cumulus e da granulosa de vacas *Bos indicus* com números diferentes de folículos antrais

Camila Oliveira Rosa[1]; Luciana Simoes Rafagnin Marinho[1]; Paula Alvares Lunardelli[1]; Fernanda Zandonadi Machado[1]; Suellen Miguez Gonzalez[1]; Paulo Roberto Antunes Da Rosa[2]; Matheus Pedrotti De Cesaro[2]; João Vitor Ravagmani Bueno[1]; Vilceu Bordignon[3]; Marcelo Marcondes Seneda[1]
1.Universidade Estadual De Londrina; 2.Universidade Federal De Santa Maria; 3.Mcgill University.

Palavras-chave: Desenvolvimento embrionário; expressão gênica; população folicular antral

O objetivo deste trabalho foi investigar se o desenvolvimento de embriões *in vitro* e a expressão gênica em células do cumulus e da granulosa são afetados pela população de folículos antrais (PFA) em fêmeas Nelore (*Bos indicus*). O número médio da PFA foi determinado em ovários (n=336) de 168 fêmeas Nelore, os ovários de cada fêmea foram identificados e mantidos separadamente. A média do número de folículos antrais foi de 61,14 ± 30,43 por vaca. Os ovários foram então separados em três grupos da seguinte maneira: G-Alta ≥92 folículos antrais; G-Intermediária 46-76 folículos antrais; e G-Baixa ≤31 folículos antrais. O desenvolvimento de embriões *in vitro* foi avaliado utilizando oócitos coletados de 752 ovários de 356 vacas em 9 réplicas. Os oócitos foram maturados *in vitro* sob condições padrão em grupos de 15 oócitos em 100 ml de meio de maturação. As taxas de clivagem, estágio de desenvolvimento de blastocistos e eclosão de embriões foram comparadas entre os grupos. A análise estatística foi realizada pelo teste de regressão logística e as diferenças foram consideradas significativas se $p<0,05$. As taxas de clivagem e blastocisto não apresentaram diferenças entre os grupos (76,6% [473/617] e 40,6% [251/617] em G-Alta; 77,5% [457/590] e 36,3% [214/590] em G-Intermediária; 79,5% [418/526] e 38,6% [203/526] em G-Baixa). A taxa de eclosão foi superior em G-Alta (16,5% [102/617]) em comparação a G-Intermediária (11,5% [68/590]; p= 0.0129) e G-Baixa (11,6% [61/526]; p= 0.0179). O RNA total foi purificado a partir das células da granulosa e do cumulus utilizando Trizol. A quantificação e estimativa de pureza do RNA foi realizada usando um espectrofotômetro nano-drop e em seguida 200 ng de RNA por amostra foram transcrito de forma reversa utilizando iScript cDNA synthesis kit (BioRad, ON, Canadá). PCR quantitativa foi realizada em um sistema CFX384TM em Tempo Real (BioRad) utilizando iQ SYBR Green Supermix (BioRad). A abundância transcricional foi normalizada para a média dos genes de controles interno RP18S e ciclofilina. Os dados foram analisados por ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey HSD. Não houve diferença significativa nos níveis de transcrição de genes que codificam enzimas esteroidogênicas (CYP19, STAR), a proliferação e fatores de diferenciação celular (TGFB1, LIFRa e BMPR2), hormônios (AMH) e receptores hormonais (FSHr, PGr). Estes resultados sugeriram que a PFA não afeta o desenvolvimento *in vitro* de embriões de vacas Nelore, bem como o perfil da expressão de genes envolvidos na proliferação celular e no crescimento folicular. No entanto, a maior taxa de eclosão sugere que embriões de vacas PFA elevadas possuem qualidade superior.

SBTE 227 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Diferentes associações de análogo de GnRH e prostaglandina no tratamento de cistos ovarianos em vacas leiteiras

Ana Cristina Silva De Figueiredo[1]; Carlos Antônio De Carvalho Fernandes[1]; Miller Pereira Palhão[1]; João Henrique Moreira Viana[2]; Marilú Martins Gioso[1]; Josiane Rossi Ribeiro[1]; Jairo Pereira Neves[1]
1.UNIFENAS; 2.EMBRAPA/CNPGL.

Palavras-chave: Bovinos; eficiência reprodutiva; patologias

Cistos ovarianos são comuns em gado de leite. O sucesso do tratamento do cisto é a regressão da estrutura e formação de corpo lúteo (CL) e rápido retorno aos ciclos estrais regulares. A literatura cita ocorrência de estruturas císticas com parede luteinizada, em vacas leiteiras, e possibilidade de efeito benéfico para seu tratamento com análogos da prostaglandina associados aos do GnRH. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência de um análogo do GnRH, a gonadorelina (GO), associado ou não a um análogo da prostaglandina, o cloprostenol sódico (CS), em diferentes protocolos para tratamento de cistos. Foram utilizadas 136 vacas holandesas, com cistos ovarianos, em quatro propriedades leiteiras localizadas no sul do estado de Minas Gerais. Os animais foram manejados em regime de semi confinamento. O diagnóstico foi feito por ultrassonografia (Mindray® M5), considerando cisto como uma estrutura ovariana anecogênica de mais de 20 mm de diâmetro. Os animais foram aleatoriamente divididos em cinco tratamentos: G1 (n=16): 2 ml de solução salina (Grupo Controle), G2 (n=31): 0,5mg de GO (Fertagyl® MSD-Brazil); G3 (n=28): 0,5 mg de GO e 10 dias após, 0,53mg de CS (Ciosin® MSD-Brazil), G4 (n=29) 0,5mg de GO e 0,53mg de CS no mesmo momento, e G5 (n=32): 0,5mg de GO e duas doses (0,53mg) de CS, a primeira junto com o GO e a segunda 10 dias após. A aplicação do cloprostenol juntamente com o análogo do GnRH (G4 e G5) visou a melhoria da eficácia do tratamento, principalmente para cistos luteinizados. A aplicação do cloprostenol 10 dias mais tarde (G3 e G5) visou provocar a lise do possível CL formado com o tratamento prévio e aceleração do retorno à reprodução. O tratamento foi eficiente quando na segunda avaliação não foi detectada a estrutura cística e encontrada massa de tecido luteal. Os dados foram avaliados quanto a normalidade. A eficiência dos tratamentos foi comparada por X^2. As médias das diferentes variáveis foram submetidas à anova e comparadas entre os tratamentos pelo teste de tukey a 5% de significância. Não houve efeito de propriedade (P>0,05). A eficiência dos tratamentos foi: 18,75%a, 54,84%b, 53,51%b, 79,31%c, 81,25%c, o intervalo do tratamento ao primeiro serviço foi: 61,22 + 17,87a, 44,54 + 16,44b, 30,87 + 12,63c, 26.19 + 14,25c, 18,33 + 10,18d dias e o intervalo tratamento à concepção: 71,87 + 21,85a, 60,76 + 19,38b, 48,34 + 16,96c, 46,12 + 15,61c, 35,07 + 14,32d dias, para os grupos 1 a 5, respectivamente. A associação da GO ao CS no início do tratamento se mostrou eficiente (P<0,05) para melhorar a taxa de cura dos cistos (G4 e G5). A aplicação do análogo da prostaglandina 10 dias após o início do tratamento (G3 e G5) levou ao retorno mais rápido da atividade reprodutiva e à concepção (P<0,05). Conclui-se que a associação do cloprostenol à gonadorelina é benéfica no tratamento dos cistos ovarianos nas duas situações, ou seja quando aplicada juntamente com o análogo do GnRH e também 10 dias mais tarde.

Agradecimentos: FAPEMIG, CNPq

SBTE 228 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Distribuição dos neurônios de GnRH na área pré-óptica e hipotálamo de fêmeas bovinas

Laurence Boligon De Araujo[1]; Carlos Eduardo Porciuncula Leonardi[2]; Rodrigo Bravo Carrasco[2]; Gregg Patrick Adams[2]; Jaswant Singh[2]
1.Universidade Federal De Santa Maria; 2.University Of Saskatchewan.

Palavras-chave: Hormônio liberador de gonadotrofina; hipotálamo; neuroendocrinologia

O GnRH é o hormônio essencial para o controle da reprodução dos mamíferos, sintetizado por neurônios hipotalâmicos e transportado através dos axônios para a zona externa da eminência media (Seeburg et al., 1987, Rec Prog Horm Res. 43, 69–98). O objetivo deste estudo foi avaliar a distribuição e o número de neurônios de GnRH na área pré-óptica e no hipotálamo de fêmeas bovinas. Em um abatedouro foram coletadas cabeças de duas vacas *Bos taurus* taurus, as quais, foram perfundidas bilateralmente através da artéria carótida com quatro litros de solução salina (5 U/mL) e posteriormente dois litros de paraformoldeído à 4% dentro de 30 minutos após o abate. O hipotálamo e a área pré-óptica (25x30x30 mm) do cérebro foram dissecados no Reproduction Research Laboratory da University of Saskatchewan e imersos em 4% de paraformoldeído por 72 horas a 4°C. As amostras foram sequencialmente desidratadas em 10%, 20% e 30% em uma solução de sacarose diluida em PBS. Após a total imersão do tecido na solução hipertônica de sacarose (7 dias) os blocos de tecidos foram congelados em – 80°C. Utilizando um criostato foram feitas secções coronais de 50 µm de espessura da área pré-óptica até o corpo mamilar, as quais, foram armazenadas em solução crioprotetora (30% de etilenoglicol e 30% de sacarose em PBS com 0,1% de sódio azide) a -20°C até serem utilizadas. 20 amostras por cérebro com intervalos de 1000 µm entre elas foram utilizadas para a identificação das células de GnRH através da incubação em anticorpo monoclonal camundongo anti-GnRH (EMD Milipore Corporation, Telemuca, USA) na concentração de 1:2500 por 72 horas a 4°C, seguido de um anticorpo policlonal cabra anti-camundongo IgG HRP conjugado (EMD Milipore) na concentração de 1: 250 incubado por 24 horas. A imunoreação foi revelada pelo uso de 3,3' Diaminobenzidina tetrahidrocloreto (DAB, SurModics, Eden Priarie, USA). A especificidade da reação foi verificada pela omissão do primeiro anticorpo. A presença de corpos neuronais (região do pericarion) com reação para GnRH e axônios foi identificada em diferentes regiões da área pré-óptica e do hipotálamo com o auxílio de um microscopio óptico (Zeiss) em um aumento de 10 e 20 vezes. Um total de 205 pericarions foram indentificados nas amostras dos dois cérebros. A distribuição dos neurônios de GnRH foi de 43,3% na área pré-óptica, 13,4 % no hipotálamo anterior, 41,2% no hipotálamo médio e 2,0% no hipotálamo posterior. Houve uma alta concentração de células positivas de GnRH na banda diagonal de Broca e nos núcleos arqueados. Os axônios de GnRH estão distribuidos em grupos ou isolados ao longo de toda área pré-óptica e hipotálamo, sendo que, na eminência média aparecem com maior intensidade. Concluindo, os neurônios de GnRH estão concentrados na banda diagonal de Broca dentro da área pré-óptica e nos núcleos arqueados do hipotálamo médio. Sendo assim, este estudo colaborará com futuras pesquisas no entendimento do controle neuroendócrino da secreção de GnRH.

SBTE 229 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Efeito da administração de diferentes doses de estradiol seguido de progesterona sobre a expressão gênica dos receptores endometriais de estrógeno e progesterona em éguas receptoras acíclicas

Samuel Catuci Fritsch; Elisa Sant´Anna Monteiro Da Silva; José Carlos Figueiredo Pantoja; José Paes Oliveira Filho; Cezinande Meira
UNESP - BOTUCATU.

Palavras-chave: éguas acíclicas; expressão gênica; receptores endometriais

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da administração de diferentes doses de benzoato de estradiol (BE) seguido de progesterona de longa ação (P4 LA) sobre a expressão gênica dos receptores endometriais de estrógeno e progesterona em éguas acíclicas receptoras de embriões. Foram avaliadas 14 éguas durante o anestro, distribuídas em dois grupos: 10 mg BE+P4, (n=7), as quais receberam três aplicações decrescentes (5, 3 e 2 mg em dias consecutivos) de BE intramuscular (Estrogin® – Farmavet), seguidas da administração de 1500 mg de P4 LA intramuscular (Sincrogest® - Ourofino) 24 horas após a última dose de BE; e 5 mg BE+P4 (n=7), que receberam duas doses decrescentes (3 e 2 mg em dias consecutivos) de BE seguidas da administração de 1500 mg de P4 LA, 24 horas após a última dose de BE. Como grupo controle, sete destas foram reavaliadas e utilizadas na fase cíclica. Para mensuração da expressão gênica dos receptores de estrógeno e progesterona foram realizadas biópsias uterinas imediatamente antes do início do tratamento com BE (M1), 24 horas após a última aplicação do BE (M2) e cinco dias após a aplicação de P4 LA (M3). No grupo controle, as biópsias foram realizadas no estro, quando edema uterino (escore 2 a 3) e presença de folículo ≥35 mm de diâmetro foram detectados (M2); e no diestro, cinco dias após a ovulação (M3). A análise da expressão gênica dos receptores de estrógeno alfa (ERα), beta (ERβ) e progesterona (PR) foram realizadas por meio da técnica RT-qPCR em tempo real, utilizando como gene de referência a beta-2-microglobulina (B2M). O teste de postos de sinais de Wilcoxon para amostras pareadas foi utilizado para comparar a expressão gênica relativa entre os momentos e grupos estudados. A expressão gênica do ERα tendeu a ser maior em 1,88 vezes (p=0,06) após administração do BE e maior em 1,34 vezes (p=0,06) após a aplicação de P4 LA no grupo 10 mg BE+P4, o que não foi observado no grupo 5 mg BE+P4 (p>0,05). Quando a dinâmica da expressão gênica foi comparada entre grupos, foi observado aumento do PR em 1,21 vezes quando M3 foi comparado a M2 no grupo 10 mg BE+P4, o que tendeu a ser diferente (p=0,06) da redução em 1,73 vezes encontrada no grupo controle quando a expressão do PR entre diestro e estro foram comparados. Não foram observadas diferenças quando a dinâmica da expressão do ERα e ERβ no M3 em relação ao M2 foram comparadas entre grupos (p>0,05), as quais encontravam-se reduzidas após administração da P4 LA ou ovulação. Não foram encontradas diferenças quando a expressão do ERα, ERβ e PR do grupo 5 mg BE + P4 foram comparadas aos grupos controle (p>0,05) ou 10 mg BE + P4 (p>0,05). Conclui-se que a administração de 10 mg de BE seguida de 1500 mg de P4 LA não reduziu a expressão gênica endometrial do PR após aplicação da P4 LA, como observado no diestro em éguas cíclicas, e que a dose de 5 mg de BE seguida do P4 LA provocou alterações de expressão gênica de ERa, ERb e PR mais similares aos encontrados em éguas cíclicas.

SBTE 230 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Efeito da melatonina na fragmentação de DNA e maturação *in vitro* de oócitos bovinos submetidos ao choque térmico

Ivan Júnior Ascari[1]; Nadja Gomes Alves[1]; Luiz Sérgio De Almeida Camargo[2]; Jasmin Jasmin[3]; Carolina Capobiango Romano Quintão[2]; Juliane Ariane Da Silva Oliveira[4]; Thamiris Dornelas Araújo[5]
1.Universidade Federal De Lavras; 2.EMBRAPA; 3.Universidade Federal Do Rio De Janeiro; 4.CES; 5.Universidade Federal De Juiz De Fora.

Palavras-chave: Maturação *in vitro*; fragmentação de dna; choque térmico

O objetivo do estudo foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de melatonina adicionadas ao meio MIV na fragmentação de DNA e na maturação de oócitos bovinos submetidos ao choque térmico. Oócitos imaturos foram aspirados de ovários obtidos de matadouro, selecionados e distribuídos aleatoriamente em um experimento fatorial 3x2. Foram testadas três concentrações (0 M, 10-6 M e 10-4 M) de melatonina (M5250 - Sigma St. Louis, MO, USA) adicionadas ao meio MIV e duas condições de incubação (convencional: 24 horas a 38,5 ºC e 5% CO2; ou choque térmico: 12 horas a 41 C seguido por 12 horas a 38,5 º C e 5% CO2), resultando nos tratamentos: M1 (0 M; 38,5 ºC; n = 156), M2 (10-6 M; 38,5 ºC; n = 154), M3 (10-4 M; 38,5 ºC; n = 161), M4 (0 M; 41 ºC; n = 154), M5 (10-6 M; 41 ºC; n = 143) e M6 (10-4 M; 41 ºC; n = 159). A MIV foi realizada em placa Nunc contendo 400 µL de meio TCM-199 (Tissue Culture Medium 199 – Invitrogen, California, USA) suplementado com 20 µg/mL de FSH (Pluset®, Laboratórios Calier, Espanha) e 10% de soro de vaca em estro. Após o período de maturação, os complexos cumulus oócitos foram desnudados em solução de PBS acrescida de hialuronidase 0,1% (Sigma, St Louis, EUA) em vórtex por 5 minutos e lavados duas vezes em meio PBS contendo 0,1% de PVP. Os oócitos foram fixados em 4% de paraformaldeído em PBS por uma hora e avaliados pelo ensaio de TUNEL (DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System - Promega, Madison, WI, EUA) quanto à porcentagem de oócitos TUNEL positivos (fragmentação de DNA) e porcentagem de maturação nuclear (porcentagem de oócitos em metáfase II). Foram realizadas quatro replicatas. Os dados foram analisados pelo proc Genmod do software SAS (version 9.1; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) considerando efeitos de repetição, concentração de melatonina, condição de incubação e interação entre os fatores. Os valores são apresentados como média ± e.p.m. A adição de melatonina não alterou (P > 0,05) a porcentagem de oócitos TUNEL positivos (M1 = 2,1% ± 0,7; M2 = 1,9% ± 1,9; M3 = 1,9% ± 1,3; M4 = 5,1% ± 2,7; M5 = 2,3% ± 1,5; e M6 = 1,9% ± 0,7) e não houve nem interação entre concentração e condição de incubação. A adição de melatonina não alterou a porcentagem de maturação nuclear à temperatura de 38 °C (P > 0,05), porém, no choque térmico, a porcentagem de maturação foi maior no tratamento M6 quando comparado ao M4 (P < 0,05) (M1 = 85,8% ± 2,9 a; M2 = 84,0% ± 2,8 a; M3 = 79,5% ± 2,9 ab; M4 = 61,6% ± 6,9 c; M5 = 62,8% ± 8,5 cd; M6 = 72,6% ± 5,3 bd). Em conclusão, a fragmentação de DNA não foi influenciada pela suplementação de melatonina ao meio de MIV. Porém, houve aumento na porcentagem de maturação nuclear de oócitos submetidos ao choque térmico em meio de maturação com concentração de 10-4 M em comparação a concentração 0 M.

Agradecimentos: Fapemig, CNPq e Embrapa.

SBTE 231 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Efeito do cortisol e seu respectivo receptor na produção *in vitro* de embriões bovinos

Nathália Nogueira Da Costa[1]; Karynne De Nazaré Lins Brito[1]; Thiago Velasco Guimarães Silva[1]; Priscila Di Paula Bessa Santana[1]; Priscilla Do Carmo De Azevedo Ramos[1]; Alessandra Ximenes Santos[1]; Simone Do Socorro Damasceno Santos[1]; Willian Allan King[2]; Moysés Dos Santos Miranda[1]; Otávio Mitio Ohashi[1]
1.UFPA; 2.University Of Guelph.

Palavras-chave: Rnai; embrião bovino; glicocorticoide

O cortisol, principal glicocorticoide (GC) encontrado em bovinos, atua em diversos processos fisiológicos, desempenhando papel chave no início da gestação, pois regula mecanismos envolvidos no processo de implantação do embrião no endométrio (Michael; Papageorghiou, Human reproduction update, v. 14, p. 497-517, 2008). O principal mecanismo de ação de GC ocorre através da interação com seus receptores de glicocorticoide (GR), cuja presença já foi identificada em embriões bovinos. Nesse sentido o objetivo deste estudo foi avaliar o mecanismo de ação de GC em embriões bovinos PIV. No experimento 1 verificamos se o GR é importante para o início do desenvolvimento embrionário. Para isso silenciamos a tradução do RNAm para GR, utilizando a técnica do RNAi. Zigotos bovinos PIV foram injetados com siRNA para GR 16 horas após a FIV, e CIV posteriormente por 8 dias, para análise do desenvolvimento embrionário e quantificação de RNAm e proteína para GR em blastocisto. As taxas de clivagem, blastocisto, quantificação relativa de RNAm e fluorescência para GR foram submetidas à ANOVA ($p<5\%$). A quantificação relativa de RNAm para GR diminuiu nos embriões de 2-4 células e blastocistos, assim como a imunofluorescência em blastocisto ($p<0,05$), revelando que houve o bloqueio da tradução. Com relação as taxas de clivagem e blastocisto houve redução no Grupo Injetado (59,7%±5,0; 9,7%±1,5; respectivamente) em comparação ao Controle (81,2%±9,7; 27,0%±8,5; respectivamente) ($p<0,05$), além disso os embriões injetados com siRNA para GR eram de qualidade inferior. A partir da observação de que o GR é importante para o início do desenvolvimento embrionário, no experimento 2 foi avaliado o efeito da adição de diferentes concentrações de cortisol no cultivo de embriões bovinos *in vitro*, avaliando o desenvolvimento embrionário e a expressão de genes (NRF1, COX, TFAM, HSP70, FASN, GLUT1) regulados por GC. Para isso CCO foram MIV e FIV, sendo posteriormente CIV em meio SOF contendo 0 (Controle); 0,01 µg/mL; 0,1 µg/mL ou 1 µg/mL de Cortisol. Não houve diferença estatística nos embriões tratados com GC (66,6 ± 6 e 30,5 ± 8,9 para 0,01µg/mL; 70,0 ±5 e 35,6±10,1 para 0,1 µg/mL; 70,1± 11 e 27,7 ±4,5 para 1 µg/mL, $p>0,05$) em comparação ao Controle (67,11±11 e 34,8 ± 9,8) com relação as taxas de clivagem e blastocisto, respectivamente. Devido a maior semelhança morfológica do grupo de 0,1 µg/mL com o Controle, essa concentração foi escolhida para análise da quantificação relativa de RNAm. Sendo assim, embriões produzidos *in vitro* foram incubados a partir do 1º dia cultivo em meio Com ou Sem 0,1 µg/mL de Cortisol, e no 8º dia foram analisados quanto à expressão gênica, entretanto não foi observada diferença entre os grupos para nenhum dos transcritos analisados. Sendo assim, concluímos que GR é importante para o início do desenvolvimento embrionário em bovinos, entretanto sua ação não está diretamente relacionada a interação com GC.

SBTE 232 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Efeito do soro fetal bovino na expressão de FASN em embrioes bovinos cultivados *in vitro*

Elane Miyuka Sato[1]; Karynne De Nazaré Lins Brito[1]; Nathália Nogueira Da Costa[1]; Thiago Velasco Guimarães Silva[1]; Priscila Di Paula Bessa Santana[1]; Alessandra Ximenes Santos[1]; Priscilla Do Carmo De Azevedo Ramos[1]; Otávio Mitio Ohashi[1]; Simone Do Socorro Damasceno Santos[1]; Marcela Da Silva Cordeiro[2]
1.Universidade Federal Do Pará; 2.Instituto Federal Do Pará.

Palavras-chave: Fasn; embrião; soro fetal

A suplementação do meio de cultivo com soro fetal bovino (SFB) é amplamente utilizada para o incremento da taxa embrionária, entretanto apresenta um ponto negativo por estar relacionada ao maior acúmulo lipídico intracelular nos embriões (DODE, RBRA, v. 37, 145-150, 2013). A ação da enzima FASN pode estar relacionada a esse processo, uma vez que é responsável pela síntese de ácido graxo palmitato a partir dos precursores malonil-CoA, acetil-CoA e NADPH (JENSEN-URSTAD, BBA- Mol. Cell Biol. Lipids, v. 1821, 747-753, 2011). Dessa forma, o objetivo desse trabalho é avaliar a expressão de FASN em embriões bovinos produzidos sob suplementação de diferentes concentrações de SFB. Ovários bovinos foram coletados em abatedouro local e os complexos cumulus-oócitos (CCOs) foram maturados *in vitro* em TCM-199 suplementado com 10% de SFB, FSH, LH e antibiótico, por 22 horas, a 38,5°C, em 5% de CO2. Para a FIV os CCOs e os SPTZ foram co-incubados em meio TALP-FERT suplementado com penicilamina, hipotaurina, epinefrina, heparina e BSA sob as mesmas condições citadas para a MIV. Decorrido 24h de co-incubação os prováveis zigotos foram então distribuídos nas gotas de cultivo em meio SOF suplementado com BSA e antibiótico segundo os grupos experimentais (0; 2,5; 5 e 10% de SFB). Para a contagem do número de células totais os embriões foram corados com fluorocromo Hoechst 33342. Para a análise da expressão gênica, o RNAm foi extraído pelo método do Trizol® (CA, USA), submetido a transcrição reversa com o auxílio do kit High- Capacity cDNA Reverse Transciption (CA, USA) e então analisado utilizando um ensaio de quantificação relativa por PCR (kit Power SYBR Green® PCR Master Mix) (CA, USA). A significância estatística foi estimada pelo teste ANOVA, com o pós-teste de Tukey, adotando-se o nível de significância de 5%. Com relação a taxa de blastocisto observou-se diferença estatística ($p < 0,05$) apenas entre o grupo sem adição de SFB (15% ± 7,6) em relação aos grupos estudados com a adição de SFB - 2,5; 5 e 10 % (39% ± 5,9; 37% ± 3,9 e 44% ± 10,2, respectivamente). Com relação à contagem do número de células embrionárias, o grupo suplementado com 2,5 % de SFB se apresentou melhor que o grupo sem suplementação com SFB (136 ± 8,5 e 108 ± 12,4, respectivamente) ($p < 0,05$), entretanto esse grupo não se apresentou significativamente melhor que os demais grupos. Além disso, na análise da expressão gênica, o gene da FASN não sofreu regulação nos embriões cultivados *in vitro* independente da adição de SFB ($p < 0,05$). Dessa forma, conclui-se que o cultivo de embriões bovinos com diferentes concentrações de soro fetal não influencia na expressão gênica da FASN, contudo a suplementação contribui para a formação embrionária de forma quantitativa e qualitativa, corroborando estudos anteriores.

SBTE 233 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Efeito genético paterno sobre a caracterização do ovário e das estruturas ovarianas de novilhas canchim (*Bos indicus* vs *Bos taurus*): resultados preliminares

Amanda Prudêncio Lemes[1]; Lindsay Unno Gimenes[1]; Cintia Righetti Marcondes[2]; Sergio N. Esteves[2]; Daniella Flavia Vilas Boas[3]; Maria Carolina Villani Miguel[4]; Narian Romanello[5]; Caio A Volante[6]; Alexandre Rossetto Garcia[2]
1.UNESP; 2.EMBRAPA; 3.FAPED; 4.UNICEP; 5.UFPA; 6.UNICASTELO.

Palavras-chave: Novilhas; fisiologia; ovário

O objetivo deste estudo foi identificar a influência genotípica do touro em características ovarianas de novilhas bovinas da raça Canchim. Antes do início do período experimental, foram examinadas 140 novilhas por ultrassonografia transretal (US) (Mindray, 2200VET DP; Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Shenzhen, China), por duas vezes consecutivas, com intervalo de 14 dias, a fim de verificar a presença de CL. Em 45 novilhas não foi observada a presença de CL em ambas as avaliações, sendo selecionadas aleatoriamente 32 novilhas (16,0 meses; 211,0 ± 3,3 kg). Estas foram avaliadas por US a cada 14 dias, de janeiro a abril de 2015. Os ovários foram classificados de acordo com seu diâmetro (CO) em: I (até 1,5 cm); II (1,6 a 2,5 cm); III (2,6 a 3,5 cm) ou IV (3,6 a 4,5 cm). Foram também mensurados por US o diâmetro do maior folículo (MF) e do segundo maior folículo (SMF). Para a análise estatística, utilizou-se o procedimento GLIMMIX do SAS® considerando as variáveis "pai" e "repetição", sendo os resultados apresentados na forma de média dos quadrados mínimos ± EP. Foram considerados significativos valores de P<0,05. Novilhas filhas dos touros A C e F apresentaram maior CO (2,0±0,07; 2,1±0,08 e 2,1±0,05, respectivamente) que as filhas dos touros B, D e E (1,8±0,06; 1,8±0,05 e 1,9±0,06, respectivamente). Além disso, as novilhas filhas dos touros A, C e F tiveram MF superior (10,3±0,39; 10,1±0,44 e 10,4±0,29mm, respectivamente) às filhas dos touros B e D (8,9±0,34; 9,1±0,27 mm, respectivamente), sendo que o MF das filhas do touro E (10,4±0,34 mm) não diferiu aos das novilhas filhas dos touros A, C e F. Coincidentemente, o SMF das novilhas filhas dos touros A, C, E e F (5,9±0,31; 6,2±0,36; 6,2±0,28 e 6,1±0,24 mm, respectivamente) também foi superior ao SMF das filhas dos touros B e D (5,3±0,28 e 5,4±0,22 mm, respectivamente). Este estudo corroborou dados da literatura que mencionam efeitos do genótipo (pai) em características do trato reprodutivo de fêmeas e também no desenvolvimento das estruturas ovarianas.

Agradecimentos: Embrapa (Rede Biotec #01.13.06.001.05.04, Rede Pecus #01.10.06.001.05.07, Adapt+ #02.12.02.008.00.03), CAPES e CNPq.

SBTE 234 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Eficácia de meia dose de lutalyse® para a redução da concentração de progesterona em bovinos.

Fernando Do Amaral Braga[1]; Elio Moro[1]; Mauro Meneguetti[1]; Andressa Lavezzo Ranieri[1]; Everton Rodolfo Carvalho[1]; Carlos Antônio De Carvalho Fernandes[2]
1.ZOETIS; 2.Biotran Biotecnologia E Treinamento Em Reprodução Animal.

Palavras-chave: Progesterona; luteólise; lutalyse

A aplicação de Dinoprost em vacas em lactação foi eficiente em induzir a luteólise após 72h (P4≤1,0mg/ml) em 91,3% dos animais (Steverson et al., 2010). Com base nesses dados, o estudo teve como objetivo avaliar a eficácia da meia dose do Lutalyse® (Dinoprost Trometamina – Zoetis, São Paulo, Brasil) na redução da concentração de P4 36 horas após sua aplicação. O estudo foi conduzido em 3 diferentes fazendas: na primeira utilizou-se 54 novilhas Holandesas (Senador Firmino/MG); na segunda 108 animais cruzados mestiços (Fama/MG, 54 novilhas e 54 vacas) e na terceira 108 animais Nelore (Governador Valadares/MG, 54 novilhas e 54 vacas). O delineamento experimental foi o mesmo para as três fazendas, após o 6º dia do ciclo estral os animais foram divididos aleatoriamente para receberem: 1- grupo controle; 2- grupo dose inteira de Lutalyse® (25mg) e 3- grupo meia dose de Lutalyse® (12,5mg); e dentro de cada um destes grupos formaram-se 2 subgrupos (dia 7 ao 11 e dia 12 ao 17 do ciclo estral). O dia zero do ciclo estral foi considerado o dia de observação da manifestação de cio. Foram realizadas duas coletas de sangue, a primeira imediatamente antes da aplicação e a segunda 36 horas após a aplicação do Lutalyse®. Com base em outros estudos (Steverson et al., 2010), consideramos para eficácia na redução de P4 (luteólise) a concentração antes da aplicação maior que 1,0 ng/mL e após 36 horas menor que 1,0ng/ml. Animais que apresentaram baixa concentração de P4 (n=9; <0,1ng/ml) antes da aplicação foram considerados não ovulados e retirados das análises. A análise de P4 foi realizada via radioimunoensaio e os dados analisados pelo ANOVA (procedimento GLM, SAS Inst. Inc, USA). Não houve interação entre tratamentos e subgrupos (P>0,1). Não houve interação entre ordem, raça e tratamentos na redução de P4 (P>0,1). A concentração média de P4 antes e 36 horas após dos tratamentos foi de 4,83±0,20ng/ml e 2,15±0,17ng/ml (n=261), respectivamente. A concentração de P4 antes de aplicação não foi diferente (P>0,1; 4,17±0,20 [89]; 4,79±0,24 [87]; 4,99±0,24 [85]) para dose inteira, meia dose e controle, respectivamente. Entretanto, a concentração de P4 36 horas foi igual entre dose inteira (0,46±0,07 [89]) e meia dose (0,78±0,12 [85]) e ambas menores do que o grupo controle (5,23±0,28 [87]). No geral, o tratamento dose inteira teve a mesma eficácia (90,0% [81/89]) que meia dose (83,7% [81/89]) e ambos maiores que o controle (8,0% [7/87]). Os resultados de eficácia foram semelhantes para as três fazendas, onde a dose inteira e meia dose (Fazenda 1= 94,4% [17/18] e 88,2% [15/7]; Fazenda 2= 91,7% [33/36] e 85,7% [30/35] e Fazenda 3= 88,6% [31/35] e 78,8% [26/33], respectivamente) foram semelhantes e ambos com eficácia maior do que o Controle (Fazenda 1= 11,8% [2/17]; Fazenda 2= 11,1% [4/36] e Fazenda 3= 2,9% [1/34]). Meia dose de Lutalyse® (12,5mg) foi eficiente em reduzir a concentração de P4 36 horas após sua administração e teve mesma eficácia que dose inteira.

SBTE 235 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Impacto do tratamento neonatal com agonista do GnRH em desfechos reprodutivos e metabólicos de ovelhas androgenizadas durante a gestação

Carolina Dos Santos Amaral; Igor Gabrel Zappe; Bruno Mezzomo Pasqual; Manuela Wolker Manta; Ricardo Della Méa; Lady Katerine Serrano; Joabel Tonellotto Dos Santos; Alfredo Quites Antoniazzi; Paulo Bayard Dias Gonçalves; Fabio Vasconcellos Comim
Universidade Federal De Santa Maria.

Palavras-chave: Agonista do gnrh; ovelhas; androgenizadas

Objetivos - A minipuberdade (MP) é um período adaptativo pós-parto de poucas semanas de duração, caracterizado pela redução abrupta da ativação do eixo gonadotrópico, que passa a manter-se reprimido até o período de puberdade, podendo ser considerada uma janela para intervenções (Jansen HT et al., Endocrinology 152:4288, 2011). O presente estudo visou avaliar, em um modelo animal da síndrome dos ovários policísticos (SOP), se o tratamento precoce com um agonista do GnRH de longa duração (acetato de leuprorrelina IM) durante o período da MP poderia modificar o desenvolvimento de características típicas como a anovulação e resistência à insulina na idade adulta (19 meses). Materiais e Métodos: Animais - Inicialmente, 49 fêmeas adultas de ovinos da raça Corriedale, oriundos de criador credenciado no estado do RS foram utilizadas após a aprovação ética no CEUA-UFSM. O protocolo de androgenização consistiu na administração de testosterona propionato 100 mg (Androgenol®, Juatuba, Brasil) IM 2 vezes por semana nas mães entre os dias 30 até 90 de gestação. As ovelhas do grupo controle foram mantidas sem tratamento. Nas primeiras 48 horas após o nascimento, foi feita a aplicação de acetato de leuprorrelina (5 mg) IM uma amostra de ovelhas androgenizadas. As fêmeas nascidas de mães androgenizadas e não androgenizadas foram o foco do presente estudo. Estudou-se 18 ovelhas, sendo 7 (4 controles e 3 androgenizadas) eutanasiadas aos 13 meses e 11 (5 controles, 3 androgenizadas e 3 androgenizadas e tratadas com acetato de leuprorrelina[AL]) no final do experimento aos 19 meses. Resultados: Alterações reprodutivas- Como esperado, a distância ano-genital foi significativamente aumentada em fêmeas androgenizadas (média + DP) de 8,0 + 0,78 em comparação às controles com 0,58 + 0,18 cm ($p<0.0001$ T Student) ao nascimento. As dosagens de progesterona seriada mostraram um grupo controle predominantemente ovulatório, caracterizado pela presença de picos alternantes de progesterona, enquanto a maior parte dos animais androgenizados (A) desenvolveu uma ruptura na ciclicidade (66%). Nenhuma modificação estatisticamente significativa foi vista no padrão ovulatório das fêmeas tratadas com AL. Foi observado através do teste de sobrecarga a glicose EV (10mg/kg) a existência de resistência à insulina em ambos os grupos androgenizados ($p <0.01$ T Student). Conclusões: De acordo com os resultados preliminares obtidos, o tratamento neonatal com leuprorrelina não foi capaz de evitar o desenvolvimento de alterações metabólicas (resistência à insulina) e reprodutivas em um modelo animal de SOP.

SBTE 236 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Influência da morte celular no dimorfismo sexual durante o desenvolvimento pré-implantação

Clara Slade Oliveira[1]; Naiara Zoccal Saraiva[2]; Marina Ragagnin Lima[3]; Raquel Varella Serapião[4]; Leticia Zoccolaro Oliveira[5]; Carla Braga Martins[6]; Roberta . Vantini[3]; Joaquim Mansano Garcia[3]; Luiz Sérgio De Almeida Camargo[1]
1.EMBRAPA GADO DE LEITE; 2.EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL; 3.UNESP; 4.PESAGRO-RIO; 5.UNIRP; 6.UFES.

Palavras-chave: Embrião fêmea; apoptose; dimorfismo sexual

Embriões bovinos fêmeas progridem a taxas mais baixas e originam blastocistos menores do que machos. No entanto, quando e como o dimorfismo sexual começa a ocorrer não está claro. O conhecimento de singularidades entre embriões fêmeas e machos podem ser úteis para a reprodução humana assistida, quando é detectado risco de desordens ligadas ao X, e para programas de melhoramento genético sexo-específicos. O objetivo deste estudo foi caracterizar a influência da morte celular no desenvolvimento de embriões fêmeas e machos. Usando sêmen sexado de três touros diferentes para a fertilização, comparamos embriões 96, 120 e 144 hpi, avaliando parâmetros de qualidade. Para isso, os embriões com mais de 4 células em 96 e 144 hpi; ou com mais de 8 células em 144hpi foram fixados em 4% PFA e corados para caspase 3 (marcador de apoptose) por imunofluorescência. Os núcleos foram corados utilizando HOECHST. A fragmentação celular foi estimada pelo número de fragmentos de citoplasma enucleados dentro da zona pelúcida. Os resultados foram agrupados como Fêmea e Macho, uma vez que foi detectada coerência entre os dados dos touros 1, 2 e 3. A análise foi realizada como se segue: I. número total de células; II. Apoptose (taxa de células apoptóticas em embriões); III. fragmentação (taxa de células fragmentadas em embriões). Foi analisado o efeito do tempo sobre cada sexo (Kruskall-Wallis/ Dunn, F96xF120xF144; M96xM120xM144), e o efeito do sexo sobre cada momento (Mann Whitney, F96xM96; F120xM120; F144xM144) usando o programa GraphPad InStat (p=0.05). O total de 379 embriões, 65-93 por grupo, obtidos em três repetições, foi avaliado. Como esperado, a média de células aumentou de 96 a 144 hpi (F: 11,88±0,53a, 15,42±1,04a, 28,1±2,44b; M: 11,33±0,64A, 16,62±1,12b, 40,19±2,86C). Comparando Fêmea vs Macho, o número de células foi reduzido em 144hpi (F: 28,1±2,44, M: 40,19±2,86*). Em relação a apoptose, nos grupos Fêmea a taxa mais elevada foi detectada em 96hpi (23,08±2,54a, 14,62±2,0b, 14,46±1,94b). Para os embriões Macho, em 144 hpi foi detectada a menor taxa (21,40±2,68A, 15,23±1,63A, 9,71±1,43B). Embriões fêmeas apresentaram taxas mais elevadas de apoptose em 144 hpi (F: 14,46±1,94, M: 9,71±1,43*), em reflexo à diminuição do número de células e à tendência (p=0,07) de aumento no número de células apoptóticas (F: 2,91±1,50, M: 2,38±1,52). A fragmentação celular permaneceu inalterada para os embriões Fêmea (17,19±1,67, 15,55±1,55, 14,97±1,34), e para os embriões Macho diminuiu em 144 hpi (15,76±1,36A, 13,11±1,01a, 10,98±1,19B). Embriões Fêmea apresentaram taxas elevadas de fragmentação em relação ao grupo Macho em 144 hpi (F: 14,97±1,34, M: 10,98±1,19 *), e este aumento também foi devido a um aumento do número de células fragmentadas (3,47±0,22, 2,73±0,17*). Estes novos resultados nos levam a propor que o dimorfismo sexual é estabelecido 144hpi em bovinos, durante a transição mórula-blastocisto, e morte celular está envolvida neste processo.

Apoio: FAPERJ e FAPEMIG.

SBTE 237 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Influência do diâmetro folicular e do momento da clivagem na produção embrionária e no perfil de metilação da histona H3K4 em blastocistos bovinos

Paula Alvares Lunardelli; Fabiana De Dio Sarapião; João Vitor Ravagmani Bueno; Camila Bortoliero Costa; Larissa Zamparone Bergamo; Andressa Guidugli Lindquist; Isabela Búfalo; Marcelo Marcondes Seneda
Universidade Estadual De Londrina.

Palavras-chave: Modificação de histona; clivagem precoce; clivagem tardia

O diâmetro dos folículos dos quais os oócitos são obtidos e o tempo de início da primeira clivagem dos embriões possivelmente influenciam a competência oocitária e a reprogramação epigenética no desenvolvimento embrionário inicial. O objetivo do presente estudo foi investigar o potencial de desenvolvimento e a ocorrência de monometilação em H3K4 de blastocistos bovinos de clivagem precoce, intermediária e tardia após a fecundação de oócitos provenientes de folículos de até 2 mm e folículos entre 4 e 8 mm de diâmetro. Os folículos foram puncionados de 1982 ovários de abatedouro. Dos oócitos selecionados, 639 do grupo 4-8 mm e 699 do grupo ≤ 2 mm foram submetidos a maturação e fecundação *in vitro*. Os prováveis zigotos foram cultivados e o momento de início da clivagem foi avaliado, originando os grupos de clivagem precoce (≤ 28 h pós-FIV), intermediária (> 28 h e ≤ 34 h pós-FIV) e tardia (> 34 h e ≤ 54 h pós-FIV). As taxas de blastocisto foram avaliadas aos dias 7 e 8 de cultivo. As taxas de clivagem e blastocistos foram comparadas pelo teste de regressão logística e consideradas significativas ao nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). Dentre os blastocistos, foram selecionados 5 embriões de cada grupo e submetidos à investigação de H3K4me por imunofluorescência. A porcentagem de embriões de clivagem tardia foi maior ($p < 0,05$) que a dos de clivagem precoce, tanto para folículos de 4-8 mm (tardia: 30% vs. precoce: 19%) quanto para os folículos ≤ 2 mm (tardia: 33,8% vs. precoce: 16,6%), indicando que a maioria dos embriões inicia seu primeiro ciclo de divisão celular mais tardiamente. A taxa de blastocisto do grupo de folículos de 4-8 mm (36,3%) foi maior que a taxa do grupo de folículos ≤ 2 mm (22,9%; $p < 0,05$). Além disso, as taxas de blastocisto dos grupos de clivagem precoce e intermediária (45,3% e 33,8%, respectivamente) foram maiores que a do grupo de clivagem tardia (13,5%; $p < 0,05$). Os blastocistos de todos os grupos apresentaram marcação para H3K4me à imunofluorescência. Tal marcação apresentou-se mais intensa na região do trofectoderma e fraca ou ausente na região da massa celular interna. Os dados do presente estudo demonstraram que maiores taxas de blastocisto são obtidas de embriões que clivam até 34 horas após a fertilização de oócitos oriundos de folículos de 4 a 8 milímetros de diâmetro, indicando maior habilidade desses embriões em se desenvolverem até o estágio de pré-implantação. Ainda, a presença da monometilação em H3K4 em todos os blastocistos avaliados sugere que essa modificação de histonas exerce papel essencial na manutenção da viabilidade embrionária nesse importante estágio do desenvolvimento.

SBTE 238 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Influência do fluido folicular na competência oocitária: identificação de fatores envolvidos na qualidade oocitária e desenvolvimento embrionário

Glaucia Pereira Alves; Kelly Annes; Roberta Ferreira Leite; Marcella Pecora Milazzotto
UFABC.

Palavras-chave: Fluido folicular; produção *in vitro*; competência oocitária

Entre as etapas da produção *in vitro* de embriões, a maturação *in vitro* (MIV) pode ser considerada um dos pontos importantes para o desenvolvimento embrionário, pois é nesta etapa que ocorrem eventos essenciais para a qualidade do futuro embrião. A remoção do oócito do meio folicular resulta na retomada espontânea da meiose nos oócitos, interferindo no período de capacitação retomado *in vitro*. Dessa forma, as condições foliculares podem ser responsáveis por diferenças que serão refletidas posteriormente no fenótipo embrionário. O objetivo deste trabalho foi investigar moléculas fundamentais presentes nos fluidos foliculares (FF,) possivelmente envolvidas na capacitação do oócito e na competência embrionária. Para isso, foram aspirados individualmente complexo cumulus-oocito (COCs) e respectivos FF de folículos de 7-8mm de ovários obtidos de abatedouro comercial (5 folículos /ovário). Os COCs do mesmo ovário foram maturados *in vitro* em gotas de 50µl de meio em sistema well of the well , por 22-23h a 5% de CO2, a 38,5°C e alta umidade. Os oócitos foram fecundados nas mesmas condições atmosféricas da MIV por 18h e cultivados até o D7 em meio SOF contendo 5% de FCS, 10 µL/mL de animoácidos não essenciais e 20 µL/mL de aminoácidos essenciais. Índices de clivagem e blastocistos foram avaliados as 40hpi e 168hpi, respectivamente. As moléculas de glicose, colesterol e piruvato foram quantificadas nos FFs por fluorimetria com kits comerciais e posteriormente analisados em função dos índices de clivagem e blastocisto. Os dados foram analisados pelo software GraphPad Prism 5.0 com o teste Wilcoxon-Mann_Whitney (n=6 replicatas). Resultados obtidos indicaram que embriões clivados possuem maior quantidade de glicose no FF do que não clivados (Cl = 1.327µM ± 0.234; NCl = 0.554 µM ± 0.108; p=). Do mesmo modo, oócitos capazes de progredir a blastocisto foram provenientes de FF com maior concentração de colesterol e piruvato (colesterol - Bl = 33.14µM ±1.98; NBl= 28.86µM ± 1.32), (piruvato - Bl= 35.83µM ± 2.67; NBl= 28.42µM ± 2.30). Os resultados indicam que a glicose pode ser um substrato importante para a clivagem. Já a presença de colesterol e piruvato no FF parecem ser essenciais para que os embriões cheguem a blastocisto, sugerindo melhor qualidade oocitária, fator essencial para um melhor desenvolvimento embrionário.

SBTE 239 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

O efeito do fator de crescimento semelhante à insulina-i (IGF-I) na expressão de genes mitocondriais em oócitos bovinos submetidos ao choque térmico

Debora Rodrigues Gonçalves[1]; Janahi Sousa Ticianelli[2]; Jéssica Ispada[1]; Pedro Henrique Bugallo Risolia[2]; Thaís Alves Rodrigues[1]; Fabiola Freitas De Paula Lopes[1]
1.UNIFESP; 2.UNESP.

Palavras-chave: Igf-i; mitocôndria; choque térmico

A exposição de oócitos bovinos a temperatura elevada causa diversas alterações celulares tais como aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e redução na atividade mitocondrial. A atividade mitocondrial está associada a expressão de genes codificados pelo DNA nuclear (nDNA) e mitocondrial (mtDNA). O efeito negativo do choque térmico na atividade mitocondrial oocitária pode ser atenuado pela adição do fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I) durante a maturação *in vitro* (MIV). Assim, este estudo visou determinar o efeito do IGF-I na expressão de genes codificados pelo nDNA (TFAM: fator de transcrição mitocondrial A e ATP5S: subunidade da ATP sintase) e mtDNA (ATP6: subunidade 6 da ATP sintase e COX1: subunidade 1 da citocromo C oxidase) em oócitos bovinos submetidos ao choque térmico durante a MIV. Para tanto, complexos cumulus-oócito (CCOs) bovinos recuperados de ovários de abatedouro foram distribuídos entre os grupos controle (22h a 38,5°C) e choque térmico (14h a 41°C e 8h a 38,5°C) com suplementação de 0 ou 25 ng/ml de IGF-I durante a MIV. Após a MIV, os CCOs foram denudados mecanicamente por pipetagens repetidas para remoção completa das células do cumulus. Os oócitos denudos foram armazenados a -80 °C até a realização da RT-PCR. Grupos de 30 oócitos por réplica foram coletados de cada grupo experimental (n=5 réplicas) e submetidos à extração de RNA total (RNeasy Mini kit, Qiagen). Para a reação de transcrição reversa (RT), foi utilizado o kit SuperScript III (Invitrogen®). A amplificação dos genes alvos foi realizada utilizando o sistema Power Sybr®Green PCR Master Mix. A expressão dos genes ATP6, COX1, TFAM e ATP5S foi mensurada por RT-PCR em tempo real. A expressão da ciclofilina A foi usada como gene de referência de acordo com o programa RefFinder. Os valores relativos da expressão gênica foram obtidos pelo método de ΔΔCt corrigidos pela eficiência de amplificação para cada gene (equação de Pfaffl). Os dados foram submetidos à análise de variância pelo método dos quadrados mínimos utilizando o programa estatístico SAS. Não houve efeito da temperatura e do IGF-I na expressão dos genes ATP6, TFAM e ATP5S. A exposição de oócitos bovinos ao choque térmico durante a MIV aumentou (Temperatura P< 0,0005; Temperatura x IGF: P< 0.01) a expressão de COX1 mRNA em relação ao controle. No entanto, a suplementação do meio com 25 ng/ml de IGF-I recuperou os níveis de expressão gênica de COX1 para patamares similares ao grupo controle. Conclui-se que o IGF-I possui ação reguladora na expressão do gene COX1, podendo agir indiretamente na recuperação da atividade

SBTE 240 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

O papel termoprotetor do fluido folicular durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos submetidos ao choque térmico

Thaís Alves Rodrigues[1]; Cássia Maria Barroso Orlandi[1]; Debora Rodrigues Gonçalves[1]; Daniela Franco Da Silva[2]; Fabiola Freitas De Paula Lopes[1]
1.UNIFESP; 2.UNESP.

Palavras-chave: Choque térmico; maturação; fluido folicular

O fluido folicular (FF) compõe o microambiente oocitário contendo fatores do plasma e moléculas especializadas secretadas pelas células foliculares e oócito. Os produtos contidos no fluido folicular podem desempenhar um papel importante no crescimento do folículo e maturação do oócito. Entre os fatores que comprometem o microambiente folicular e a maturação oocitária está o estresse térmico. Já foi demonstrado que a exposição de oócitos bovinos a temperatura elevada compromete a maturação e a competência de desenvolvimento do oócito. Portanto, o objetivo deste estudo foi determinar o papel do FF na maturação nuclear e na expansão das células do cúmulus (CCs) em complexos cumulus oócitos (CCOs) submetidos ao choque térmico. Para tanto, o FF foi aspirado de ovários de abatedouro durante os meses de inverno, processado e armazenado a -80ºC. Os CCOs coletados de ovários de abatedouro foram maturados em Meio de Maturação (MM) (TCM199-Bicarbonato com 50 µg/mL de gentamicina, 0,2 mM de piruvato de sódio, 10 µg/mL de FSH, 10 µg/mL de LH e 1 µg/ml de estradiol 17-b). Os CCOs foram distribuídos nos tratamentos controle positivo (MM + 10% soro fetal bovino a 38,5ºC por 22 h), controle 0% FF (MM + 0% FF a 38,5ºC por 22 h) e choque térmico (MM a 41ºC por 14 h seguido de 38,5°C por 8 h) na presença de 0, 10, 15 e 20% de FF durante a maturação *in vitro* (MIV). Após 22 h de MIV, a expansão das CCs foi mensurada por análise de imagem da área de cada CCO pré- e pós-maturação com auxílio do software ImageJ (N= 5 réplicas com 139-154 CCOs/tratamento). Em seguida, os CCOs foram denudados em hialuronidase (100 mg/mL) por 5 minutos em vórtex. Os oócitos denudos foram fixados em 3,7% de formaldeído por meia hora e corados com Hoescht 33342 1 mM por 15 minutos para determinação da progressão meiótica (N= 6 réplicas com 126–136 CCOs/tratamento). Os dados foram analisados por ANOVA (SAS). O choque térmico reduziu a expansão das CCs ($p < 0,001$) de 3,38 ± 0,14 (controle positivo) e 3,00 ± 0,14 vezes (controle 0% FF) para 1,91 ± 0,14 vezes (choque térmico 0% FF). A proporção de oócitos que atingiu o estágio de metáfase II (MII) também foi reduzida ($p < 0,001$) pelo choque térmico de 84,0 ± 4,0% no controle positivo e 74,9 ± 4,0% no controle 0% de FF para 46,5 ± 4,0% no grupo choque térmico 0% de FF. No entanto, a adição de 10,15 e 20% de FF regatou o efeito deletério do choque térmico na expansão das CCs (2,62 ± 0,14; 2,63 ± 0,14 e 2,63 ± 0,14 vezes para 10,15 e 20% de FF, respectivamente) enquanto que as doses de 10 e 15% de FF recuperaram a taxa de maturação em oócitos estressados (64,5 ± 4,0% e 64,0 ± 4% para 10 e 15% de FF, respectivamente), sendo igual ao controle 0% de FF a 38.5°C. Em conclusão, a adição de 10 e 15% de FF ao meio de maturação resgatou a expansão oocitária e a maturação nuclear de oócitos bovinos submetidos ao choque térmico, sugerindo que fatores presentes no FF podem auxiliar na prevenção dos efeitos deletérios do choque térmico.

SBTE 241 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Perfil de expressão de RNAm do receptor de (pro)renina e prorenina durante a luteinização e luteólise bovina

Andressa Minussi Pereira Dau; Paulo Roberto Antunes Da Rosa; Joabel Tonellotto Dos Santos; Juliana Germano Ferst; Mariana Priotto De Macedo; Alessandra Bridi; Monique Tomazele Rovani; Ricardo Della Méa; Fabio Vasconcellos Comim; Paulo Bayard Dias Gonçalves
Universidade Federal De Santa Maria.

Palavras-chave: Corpo lúteo; progesterona; pgf2α

O efeito da prorenina (independente da renina) sobre a síntese de P4, em resposta ao pico de LH, foi proposto na década de 80 (Sealey et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 8705-9, 1986). Recentemente, o receptor de (pro)renina [(P)RR], ao qual se ligam prorenina e renina, foi identificado no corpo lúteo (CL) bovino. Além disso, nosso grupo de pesquisa demonstrou que o bloqueio intrafolicular do (P)RR reduz os níveis plasmáticos de P4 durante o processo inicial de luteinização. O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil de expressão do RNAm de prorenina e (P)RR no CL durante a luteinização e luteólise na espécie bovina. Trinta vacas cíclicas de raças europeias foram sincronizadas com uma injeção de 500µg de cloprostenol sódico (PGF2α-IM), sendo o estro observado e a ovulação monitorada por ultrassonografia. Os animais foram aleatoriamente distribuídos e ovariectomizados nos dias 5 (n=4) e 10 (n=5) após a ovulação para a caracterização de prorenina/(P)RR durante a formação do CL. Para estabelecer o perfil de expressão de RNAm para prorenina/(P)RR na luteólise, vacas apresentando CL no dia 10 (0h) do ciclo estral receberam uma injeção de 500µg de cloprostenol sódico e foram ovariectomizadas nas 2 (n=3), 12 (n=3), 24 (n=4) e 48h (n=4) após a injeção de PGF2α. O modelo *in vitro* foi adaptado de Shirasuna et al. (Domest. Anim. Endocrin., 43, 227-238, 2012) e confirmado pela dosagem sérica de P4. Os tecidos do CL foram submetidos à protocolo do Trizol® (Invitrogen, Carlsbad, CA) para extração de RNA, os quais foram quantificados por espectrofotômetro (NanoDrop, Thermo Scientific, USA). O RNA total foi tratado com DNase (Promega, Madison, WI) e a reação de transcrição reversa foi realizada com iScript (Bio-Rad, Hercules, CA) de acordo com instruções do fabricante. A expressão gênica foi avaliada por qPCR em tempo real e a variabilidade na quantificação de RNAm foi avaliada em relação ao GAPDH. Os dados de expressão de RNAm de prorenina e (P)RR foram avaliados pelo teste de multi-comparação de médias least squares means (LSMEANS). Todas as variáveis contínuas foram testadas para normalidade com o auxílio do teste de Shapiro-Wilk e normalizadas quando necessário. No dia 10 após a ovulação (hora 0 após PGF2α), a expressão de RNAm de prorenina (5,17±2,73) e (P)RR (1,99± 0,57) foi significativamente superior comparada ao dia 5 de luteinização (0,57±0,21 e 0,53± 0,12 respectivamente; $p<0,05$). Após aplicação de PGF2α, os resultados de expressão de RNAm tanto para prorenina quanto para (P)RR sugeriram uma redução em todos os horários avaliados (3,72±2,83; 3,43±0,84; 2,18±0,52; 1,02±0,12 e 1,56±0,56; 1,48±0,17; 1,06±0,10; 1,49±0,44, respectivamente) comparado à hora 0, exceto na hora 12 para RNAm de prorenina. Em conclusão, nossos resultados evidenciam a presença de prorenina/(P)RR no CL bovino e sugerem um maior envolvimento no processo de luteinização em relação à luteólise. A pesquisa foi financiada pela CAPES e CNPq - Brasil.

SBTE 242 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Perfil de progesterona plasmática e características luteais de cabras da raça saanen gestantes e não gestantes

Mário Felipe Alvarez Balaro; Jeferson Ferreira Da Fonseca; Alex Silva Santos; Luis Fernando Guaraná Macedo Moura; Natalia Assis Coelho De Faria; Joanna Maria Gonçalves De Souza Fabjan; Carlos Otávio De Paula Vasconcelos; Felipe Zandonadi Brandao
Universidade Federal Fluminense.

Palavras-chave: Ciclo estral; corpo lúteo cavitário; ovário

O objetivo deste estudo foi associar o perfil de progesterona (P4) plasmática em cabras da raça Saanen gestantes e não gestantes com o número de corpos lúteos (CL) e presença de cavidade luteal a partir do acompanhamento de um ciclo estral completo. Um total de 23 cabras (64,1 ± 5,4 kg / 3,3 ± 0,4 ECC / 2,8 ± 1,4 anos de idade) tiveram o estro sincronizado, na estação reprodutiva, por meio de duas doses de 37,5 ug de d-cloprostenol (Prolise®, Tecnopec LTDA, São Paulo, Brasil) intervaladas de sete dias. Após detecção do estro, todas as cabras foram acasaladas. A partir do primeiro dia do ciclo estral (dia seguinte à ovulação), diariamente, foi realizada a coleta de sangue para mensuração de P4 junto ao monitoramento ultrassonográfico (Sonoscape®, Shenzhen, China) da dinâmica luteal até a luteólise e ovulação subsequente ou gestação aos 21 dias. A P4 plasmática foi mensurada por meio da técnica de radioimunoensaio de fase sólida com kit comercial próprio (Beckman Coulter®, Immunotech, Marseille, França). Os dados foram submetidos à ANOVA, seguida pelo teste de Bonferroni (P<0,05). Foi acompanhado um total de 50 CLs, de 10 cabras gestantes e 13 não gestantes. As fêmeas não gestantes apresentaram maior frequência de CLs solitários (83,3%) comparadas às gestantes (16,7%). Não houve diferença entre a presença de dois (54,5% vs 45,5%) ou três (33,3% vs 66,7%) CLs, assim como a presença ou não de cavidade luteal (54,0% vs 46,0%) na taxa de gestação. Não houve efeito do número de CLs e da presença de cavidade luteal sobre a concentração plasmática de P4 nas cabras que ficaram gestantes ou não. Verificou-se efeito de dia do ciclo estral e interação dia x prenhez sobre os valores de P4. As cabras gestantes apresentaram perfil plasmático distinto das não gestantes a partir do 16º dia do ciclo (16,7 ± 4,8 vs 10,2 ± 5,8 ng/mL). Dentro do grupo de cabras gestantes, foi constatado a estabilização e produção máxima de P4 a partir do 8º dia do ciclo (12,8 ± 2,2 ng/mL) até o 21º dia obtendo concentrações médias de 13,6 ± 2,9 ng/mL ao longo do período. Já no grupo das não gestantes, foi verificada a estabilização e produção máxima de P4 a partir do 6º dia do ciclo (9,8 ± 2,8 ng/mL) até o 16º dia obtendo concentrações médias de 12,3 ± 3,8 ng/mL ao longo do período. Ademais, houve queda hormonal brusca a partir do 17º dia (5,9 ± 5,3 ng/mL) até atingir valores basais no 21º dia (1,1 ± 0,8 ng/mL). Em conclusão, as cabras não gestantes tiveram maior frequência de CLs solitários. Embora não fora encontrada diferença nas concentrações plasmáticas de P4 sobre o número de CLs e presença ou não de cavidade luteal no estado fisiológico final das cabras, verificou-se que nas gestantes, a estabilização e produção máxima de P4 ocorre tardiamente quando comparado às fêmeas não gestantes.

SBTE 243 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Principais causas de abortos em fêmeas de corte no sul do brasil e no uruguai

Mariani Farias Fiorenza[1]; Manuelle Lautert Jardim[2]; Karine De Vargas Aires[2]; Taison Souza Balestrin[2]; Diego Fontoura Simões[2]; Janislene Mach Trentin[1]; Julia Brum Spreckelsen Casarin[2]; Ana Paula Martini[2]; Gilson Antonio Pessoa[1]; Mara Iolanda Batistella Rubin[2]
1.Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul; 2.Universidade Federal De Santa Maria.

Palavras-chave: Ureaplasma sp; leptospira sp; manejo reprodutivo

As perdas gestacionais representam prejuízos genéticos e econômicos na indústria e, frequentemente, resultam no descarte involuntário das fêmeas. Sobretudo, se a causa tem origem em doenças contagiosas para outros animais e/ou humanos (Grooms, Vet Clin North Am Food Anim Pract 20:5-19, 2004). O objetivo deste estudo foi determinar as principais causas de abortos em rebanhos bovinos com aptidão para corte de duas fazendas com manejo de criação extensiva. O rebanho com 10.832 bovinos de corte *Bos taurus taurus* e cruzas (A) estava localizado no município de Melo, Cerro Largo/Uruguai. A outra fazenda, localizada em Cachoeira do Sul, RS/Brasil, possuía 3.280 bovinos *Bos taurus taurus* (B) e nenhuma propriedade aplicava vacinas para doenças reprodutivas. Os animais foram separados por categorias (nulíparas, primíparas e multíparas) e de acordo com o manejo reprodutivo: inseminação artificial (IA) ou monta natura (MN). Amostras de sangue de animais da fazenda A (152 fêmeas e 16 touros) e de B (90 fêmeas e 14 touros) foram coletadas. O soro serviu para exames de microaglutinação em placa para *Leptospira* sp, e swab vaginal ou lavado prepucial para identificação de *Ureaplasma* sp através de nested-PCR. Para a análise estatística utilizou-se o MEANS e PROC GLIMMIX do SAS (SAS 9.3, USA, 2003). Na fazenda A: 57,2% (87/152) das fêmeas e 87,5% dos touros (14/16); e na fazenda B: 78,9% (71/90) das fêmeas e 57,1% (8/14) dos touros foram soropositivos para *Leptospira* sp. *Ureaplasma* sp. foi identificado em 28,3% (43/152) das fêmeas e 62,5% (10/16) dos touros na fazenda A; e 40,0% (36/90) das fêmeas e 57,1% (8/14) touros na fazenda B. Os sorovares identificados com maior frequência foram *L. pomona* 87,2% (157/180) e *L. hardjo* 37,7% (68/180). Outros sorovares com sorologia concomitante e em menor percentual foram: *L. icterohaemorrhagiae*, *L. butembo*, *L. bratislava* e *L. canicola*. A taxa de aborto em fêmeas soropositivas para *Leptospira* sp foi de 64% (101/158) e 25% (21/84) para fêmeas soronegativas. *Ureaplasma* sp foi responsável por 70,9% (56/79) dos abortos (P = 0.0169). A taxa de aborto nas fêmeas soronegativas para Leptospirose e negativas para Ureaplasma foi de 6,6% (3/45). Maior índice de aborto ocorreu em fêmeas nulíparas 67,5% (27/40), enquanto que nas primíparas o índice foi de 49,2% (31/63) e de 46% (64/139) nas multíparas. O tipo de manejo não interferiu na taxa de aborto (P = 0.8242), pois a MN resultou em 54,9% (84/153) dos abortos e IA em 42,7% (38/89). A vantagem do uso da IA foi evidenciada aqui pelo menor percentual de fêmeas positivas para Ureaplasma, 4,5% (4/89), enquanto as fêmeas submetidas a MN o índice foi 49,0% (75/153) (P = 0.0001). Em relação ao número de partos, 84,6 % (11/13) das nuliparas abortaram. Além do mais, *Ureaplasma* sp e *Leptospira* sp conduziram a perdas de gestação em ambos os rebanhos.

SBTE 244 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Prorenina bloqueia o efeito da forscolina e reinicia a meiose em oócito bovino

Alessandra Bridi; Andressa Minussi Pereira Dau; Paulo Roberto Antunes Da Rosa; Mariana Priotto De Macedo; Juliana Germano Ferst; Matheus Pedrotti De Cesaro; Gustavo Freitas Ilha; Manuela Wolker Manta; Paulo Bayard Dias Gonçalves; Alfredo Quites Antoniazzi
Universidade Federal De Santa Maria.

Palavras-chave: Ampc; gmpc; células do cumulus e oócito

Níveis de prorenina são aumentados no fluido folicular após o pico de LH. Recentemente, identificamos a presença de receptor de (pro)renina [(P)RR] no complexo cumulus-oócito (CCO) bovino. Nosso objetivo foi avaliar o efeito da prorenina no reinício da meiose e nos níveis de AMPc e GMPc nas células do cumulus (CCs) e oócitos. Para isso, ovários bovinos foram adquiridos em abatedouro local e aproximadamente 20 CCOs/tratamento foram cultivados em 200µl de TCM-199 por 15 horas a 39ºC.Os tratamentos foram: controle positivo,controle negativo (FSK; 200µM), FSK mais prorenina (10-10M) e FSK, prorenina mais alisquireno (ALK; inibidor direto de renina; 10-7 M).Para avaliação da maturação nuclear, os oócitos foram avaliados quanto a proporção de oócitos que atingiram a fase de metáfase I (MI) pelo uso de 10µg/ml bisbezimide (Hoechst 33342) em microscópio de fluorescência. As análises de retomada da meiose foram realizadas utilizando o pacote estatístico SAS e adotando como nível de significância 5%. A taxa de oócitos que atingiram MI foi maior no grupo tratado com FSK mais prorenina (38,39%) comparado ao controle negativo (18,92%) e ao grupo FSK, prorenina mais ALK (8,68%; P<0,05). Para determinar o efeito da prorenina na concentração de AMPc e GMPc nas CCs e oócitos, CCOs foram cultivados por 6 e 15h sob as mesmas condições descritas anteriormente e distribuídos nos seguintes grupos: controle positivo, controle negativo(FSK), prorenina sozinha e FSK mais prorenina. Níveis de AMPc e GMPc foram mensurados em CCs (n=60 CCOs) e oócitos (n=50) após 6h de cultivo através do kit cAMP EIA (N°581.001;Cayman Chemical) e kit cGMP EIA (N°581.021; Cayman Chemical) de acordo com instruções do fabricante. Os dados foram comparados por ANOVA e testados para distribuição normal com Shapiro-wilk e normalizados quando necessário. Os CCOs cultivados por 15h foram avaliados quanto à maturação nuclear para controle dos tratamentos. Oócitos tratados com FSK mais prorenina apresentaram maior porcentagem de MI (49,95%) comparado ao controle negativo (25,59% MI; P<0,05), embora menor que o controle positivo (83,12% MI) e o grupo prorenina (78,34% MI). Níveis de AMPc intra-oocitário foram brevemente reduzidos nos CCOs tratados com prorenina mais FSK (8,66±1,20) em comparação ao controle negativo (10,33 ± 0,88). O controle positivo (4,00 ± 1,52) e o grupo tratado com apenas prorenina (3,00 ± 0,57) apresentaram baixos níveis de AMPc comparado ao controle negativo nos oócitos. Níveis de AMPc (15.08±6.7, 9.91±3.68, 2.02±1.43 e 5.05±4.66) e GMPc (0.42±0.19, 0.31±0.07, 0.78±0.4 e 3.61±2.96) em células do cumulus e GMPc em oócitos (0.57±0.09, 0.71±0.09, 0.78±0.12 e 0.60±0.01) não diferiram de acordo com os tratamentos (FSK, FSK mais prorenina, controle positivo e prorenina sozinha, respectivamente). Em conclusão, os resultados indicam que prorenina atua sobre o reinício da meiose em bovinos e sugerem uma regulação nos níveis de AMPc intra-oocitário.

SBTE 245 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Receptor peptídeo natriurético 3 (NPR-3) é regulado negativamente por FSH+LH em células do cumulus de bovino

Matheus Pedrotti De Cesaro[1]; Mariana Priotto De Macedo[1]; Joabel Tonellotto Dos Santos[1]; Paulo Roberto Antunes Da Rosa[1]; Andressa Minussi Pereira Dau[1]; Janduí Escarião Da Nóbrega Jr.[1]; Ricardo Della Méa[1]; Bruno Mezzomo Pasqual[1]; Vilceu Bordignon[2]; Paulo Bayard Dias Gonçalves[1]
1.UFSM; 2.Mcgill University.

Palavras-chave: Cumulus oophorus; expansão; peptídeos natriuréticos

O sistema peptídeos natriuréticos (NP) consiste de três distintos peptídeos endógenos: NP tipo-A (ANP), tipo-B (BNP) e tipo-C (CNP), além de três receptores: receptor NP-1 (NPR-1), NPR-2 e NPR-3. Em camundongos (Zhang et al., 2010, Science, 330, 366-369) e suínos (Zhang et al., 2015, J Cell Physiol, 230, 71–81) foi demonstrado que o CNP, produzido pelas células da granulosa, se liga ao NPR-2 do cumulus e mantém o oócito em vesícula germinativa. Sendo que, após o pico de LH foi observada diminuição da expressão do CNP da granulosa e do NPR-2 do cumulus (Kawamura et al., Hum. Reprod. 26, 3094–3101). Contudo, o papel dos receptores NP nas células do cumulus ainda não foi sistematicamente estudado em espécies monovulares. Trabalhos prévios do nosso grupo utilizando o bovino como modelo, revelaram um aumento na expressão do CNP nas células da granulosa após o pico de LH (*in vitro*). Além disso, nós observamos que os três NP estimularam a retomada da meiose e a expansão do cumulus em meio contendo forskolin (*in vitro*). Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a cinética de expressão dos receptores NP nas primeiras horas de maturação *in vitro* em meio com e sem gonadotrofinas. CCOs foram aspirados de ovários de abatedouro, selecionados (grau 1 e 2) e cultivados em TCM 199 por 3, 6, 9 e 12 h com ou sem FSH (0,5µg/ml) + LH (5,0µg/ml). Em cada um dos horários, além da hora 0, foi capturada imagem de 10 CCOs por tratamento e mensurada sua área total (µm2/CCO; LeicaApplication) para avaliação da expansão do cumulus. Nos mesmos horários 30 CCOs foram desnudados para visualização da progressão meiótica, e as células do cumulus utilizadas para avaliar a expressão dos receptores NP. Os experimentos foram realizados em quadruplicata. Os níveis de transcrição foram quantificados por qPCR e as diferenças entre os grupos foram analizadas utilizado LSMean e Student's, com 5% de significância. Observamos que até as 6 h de cultivo, em ambos os grupos, mais de 80% dos oócitos permaneciam em vesículas germinativas. Porém, após 9 h e 12 h de maturação o grupo com gonadotrofinas apresentou 86,9% e 99.0% de reinício da meiose contra 56,3% e 70,4% do grupo controle, respectivamente. Além disso, observamos que os CCOs do grupo controle apresentavam área total semelhante a hora 0 durante as 12 h de cultivo. Contrariamente, o grupo com gonadotrofinas apresentou um aumento de três vezes das 6 h as 12 h. Não houve diferença nos níveis de transcrição de NPR-1 e o NPR-2 quando comparados entre horários e tratamentos. Entretanto, o nível de mRNA para NPR-3 no cumulus no grupo com gonadotrofinas diminuiu das 0 h as 9 h de cultivo. O grupo controle apresentou o maior nível de mRNA para NPR-3 com 12 h. Esses resultados indicam que a expressão de NPR-3 é negativamente regulada por FSH e LH durante as primeiras horas de maturação *in vitro*.

SBTE 246 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Remodelamento dinâmico da matriz extracelular endometrial regula a receptividade ao embrião em bovinos

Saara Carolina Scolari[1]; Guilherme Pugliesi[1]; Ricardo De Francisco Strefezzi[2]; Mário Binelli[1]
1.FMVZ-USP; 2.FZEA-USP.

Palavras-chave: Endométrio; receptividade; bovinos

Objetivou-se investigar se no endométrio bovino: (1) a expressão de genes envolvidos no remodelamento da matriz extracelular (MEC) é regulada pelo ambiente endócrino peri-ovulatório e (2) mudanças no transcriptoma relacionadas à MEC estão associadas ao sucesso gestacional. No Experimento 1, o crescimento do folículo pré-ovulatorio foi manipulado de maneira a se obterem dois grupos de animais com diferentes pefis endócrinos peri-ovulatórios: o grupo folículo grande-CL grande (FG-CLG) serviu como um paradigma para maior receptividade e fertilidade e exibiu maiores concentrações de estradiol no pro-estro/estro e de progesterona no diestro inicial comparado com o grupo folículo pequeno-CL pequeno (FP-CLP). O endométrio foi coletado nos dias 4 e 7 do ciclo estral. Análises histológicas revelaram uma maior abundância de fibras colágenas nos dias 4 e 7 no grupo FP-CLP. No Experimento 2, vacas foram inseminadas e, 6 dias após, colheram-se biópsias endometriais. Os animais foram retrospectivamente classificados como Prenhes (P) ou Não Prenhes (NP) após diagnostico realizado no D30. Em ambos experimentos, a expressão de genes relacionados ao remodelamento da MEC foi estudada por RNA-seq e qPCR. Análises de ontologia gênica demonstraram a inibição da expressão de genes relacionados à MEC nos grupos com alta receptividade (FG-CLG e P). Especificamente houve inibição da expressão de TGFB2, ADAMTS2, 5 e 14, TIMP3 e COL1A2, COL3A1, COL7A1 e COL3A3 nos grupos FG-CLG e P, e isso foi confirmado por qPCR. Os resultados sugerem que a receptividade está associada com um controle específico da abundância de components da MEC, e que sua desregulagem pode perturbar o contato inicial do embrião com o tecido materno, levando ao insucesso gestacional. Em resumo, o conjunto de genes diferencialmente expressos em ambos modelos de fertilidade: (1) sugere que a desregulagem do remodelamento da ECM pode prejudicar a receptividade uterina e (2) pode ser usado como marcador para predizer o sucesso gestacional em bovinos.

SBTE 247 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Transferência dois hemi embriões aumenta a taxa de gestação mas não a taxa de nascimentos

Carlos Antônio De Carvalho Fernandes[1]; Ana Cristina Silva De Figueiredo[2]; Ciro Alexandre Alves Torres[3]; Tochimara Aparecida Miyauchi[4]; Miller Pereira Palhão[4]; João Henrique Moreira Viana[5]; Marcela Gimenez[2]
1.Biotran - Universidade De Alfenas; 2.Biotran; 3.Universidade Federal De Viçosa; 4.UNIFENAS; 5.EMBRAPA GADO DE LEITE.

Palavras-chave: Embriões; micromanipulação; gestação

O objetivo do estudo foi comparar a viabilidade de hemi embriões inovulados sozinhos ou em pares em comparação a embriões intactos. Foram utilizadas vinte e sete doadoras das raças Simental e Angus e 153 novilhas mestiças como receptoras. As doadoras foram superovuladas utilizando protocolo convencional com oito doses decrescentes de FSH e os embriões foram coletados pelo método não cirúrgico. Apenas embriões nos estágios de mórula, blastocisto inicial e blastocisto, classificados morfologicamente como excelentes (grau 1) foram utilizados. Setenta e oito embriões foram submetidos à bissecção utilizando uma lâmina metálica de microcirurgia e 52 outros foram utilizados intactos. Os embriões foram transferidos para as receptoras em três tratamentos. T1: (embriões intactos – N=52 receptoras). T2 (1 hemi embrião por receptora – N=51 receptoras) e T3 (2 hemi embriões por receptora – N=50 receptoras). As receptoras foram sincronizadas utilizando uma única aplicação de cloprostenol sódico. Embriões e hemi embriões foram inovulados de 6 a 8 dias após o estro pelo método não cirúrgico no corno uterino ipsilateral ao o corpo lúteo. O diagnóstico de gestação foi realizado aos 30 e 60 dias de gestação. As taxas médias de gestação foram comparadas por $\chi 2$. Foi feita uma análise econômica considerando os custos da produção e inovulação dos embriões, uso das receptoras e custos de preparação como hormônios, meios, sêmen e honorários. Não houve diferença na taxa média de gestação por receptora inovulada entre tratamentos (P>0,05) aos 30 (55,8; 47,1 e 62,0%) e 60 dias (51,9; 37,3 e 54,0% para T1; T2 e T3 respectivamente). A taxa de gestação por embrião original foi maior no T2 (88,9) que T1 (55,8) e T3 (60,8%) aos 30 dias (P<0,05), porém sem diferença aos 60 dias (51,9; 70,4 e 52,9% para T1; T2 e T3 (P>0,05), respectivamente). A variação percentual de gestações gemelares foi de 0 – 0%; 1 – 5,3% e 10 – 37,0% para T1, T2 e T3, respectivamente). Não houve diferença (P>0,05) no número de bezerros nascidos vivos por receptora inovulada (48,1; 31,4 e 34,0 para T1; T2 e T3, respectivamente). O percentual de embriões nascidos vivos foi maior nas vacas de T2 (59.2) que T3 (33,3%). A taxa de aborto for maior nas vacas de T3 (P < 0.05). O custo médio de cada bezerro nascido vivo foi de U$287,3; 262,5 e 385,4 para as vacas de T1, T2 e T3, respectivamente. Conclui-se que a bipartição não reduz os custos dos produtos nascidos vivos. A inovulação de dois hemi embriões numa mesma receptora não aumentou a taxa de prenhez.
Agradecimentos: Fapemig, Capes e CNPq

SBTE 248 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Tratamento intrauterino em vacas leiteiras repetidoras de cio: dados preliminares

Janislene Mach Trentin[1]; Karine De Vargas Aires[2]; Verônica Flores Da Cunha Scheeren[2]; Taison Souza Balestrin[2]; Thainá Minela[2]; Julia Brum Spreckelsen Casarin[2]; Mariani Farias Fiorenza[1]; Ana Paula Martini[2]; Gilson Antonio Pessoa[1]; Mara Iolanda Batistella Rubin[2]
1.Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul; 2.Universidade Federal De Santa Maria.

Palavras-chave: Endometrite; pmn; útero

As infecções uterinas têm alta prevalência e efeito negativo na performance reprodutiva (PR) de vacas leiteiras. A meta-análise sobre a eficiência dos tratamentos da endometrite com PGF2α (Heimerl & Heuwieser, Journal of Dairy Science, 96,2973-87, 2013) revelou grande discordância entre resultados. Na presente pesquisa o impacto de endometrite sobre a PR de vacas leiteiras (n=30) repetidoras de cio com endometrite pós-puerperal crônica foi avaliado após: infusão uterina de 500mL de solução fisiológica + 25mg de cloprostenol sódico IM (Sincrocio®, Ouro Fino, Brasil) (n=10; SFPG), infusão uterina de 500mg de ceftiofur (Ceftiomax®, Biogenesis Bago, Brasil) (n=11; CPG) ou 25mg de cloprostenol sódico IM (Sincrocio®, Ouro Fino, Brasil) (n=9; PG). As fêmeas passaram por exame ginecológico e avaliação ultrassonográfica. Para determinar a presença de endometrite efetuou-se a citologia endometrial (Cytobrush, Minitube, Brasil) conforme Barlund et al. (Theriogenology 69,714-723,2008) (PMN1) do corpo uterino e o ponto de corte foi a presença de ≥7% de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) (Gilbert et al. Theriogenology 64, 1879-1888, 2005). As lâminas foram coradas com panótico rápido. A avaliação citológica determinou o percentual de neutrófilos (%PMN), contando no mínimo 200 células em microscopia óptica (400X) para obter a avaliação quantitativa de inflamação do endométrio. Vacas repetidoras de cio com mais de 3 IA e acima de 100d pós-parto e ≥7% de PMNs foram incluídas no estudo. Dez dias após tratamento nova citologia foi obtida conforme o primeiro exame (PMN2). A IA foi conduzida após observação de cio e a PR observada durante os três ciclos subsequentes. Através de ultrassonografia aos 28d após a IA efetuou-se o diagnóstico precoce de gestação (P/IA). Para análise estatística utilizou-se PROC GLM e PROC GLIMMIX do SAS (SAS 9.3, USA, 2003). O DEL médio foi de 209,6 ± 13,9 dias [SFPG = 227,4 ± 31,8; CPG= 197,1 ± 0,4; PG = 219,4 ± 28,4; (P = 0,7213)], o número de IA de 4,4 ± 0,31 IA/vaca [SFPG = 4 ± 0,5; CPG= 4,7 ± 0,6; PG = 4 ± 0,53; (P = 0,7160)] e a produção média de 26,5 ± 1,4 kg leite/vaca/dia [SFPG = 27 ± 3; CPG= 27,4 ± 2,1; PG = 25 ± 1,3; (P = 0,5902)]. Na PMN1 a média foi 7,07 ± 0,70 e após de 0,99 ± 0,25 e revelou efeito significativo na redução do PMNs após o tratamento [(SFPG: 8,6 ± 0,8% vs 0,6 ± 0,4%), (CPG: 8,5 ± 0,6% vs 0,5 ± 0,2%) e (PG: 8,75 ± 0,9% vs 2,5 ± 1,45%)] (P = 0,002). A comparação entre os tratamentos mostrou tendência (P = 0.067) de maior redução de PMNs nos tratamentos SFPG e CPG e menor no PG. A P/IA no primeiro, segundo e terceiro ciclo após o tratamento foi para SFPG: 45,4%, 33% e 33%, CPG: 30%, 14,3% e 33,3% e PG: 25% 14,3% e 33,3%, respectivamente. A P/IA acumulada após 3 ciclos foi de 72,7%, 60,0% e 55,5% (P = 0.7690). Os tratamentos determinaram redução de PMNs com taxas satisfatórias de P/IA. A continuidade do estudo com maior número de animais é necessária para confirmar as indicações destes achados.

SBTE 249 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Tratamentos de endometrite pós puerperal em vacas leiteiras

André Oliveira Andrade; Marilú Martins Gioso; Carlos Antônio De Carvalho Fernandes; Ana Cristina Silva De Figueiredo; Fabiana Cristina Varago
UNIFENAS.

Palavras-chave: Endometrite; infusão uterina; cefapirina

Objetivou-se avaliar e comparar a eficácia da Cefapirina (Metricure®; MSD; São Paulo- SP; Brasil) com outro antimicrobiano convencional, aplicados via local, para tratamento de infecções pós puerperais. Foram avaliadas 90 fêmeas bovinas entre a 3ª e a 5ª semana pós parto, e os animais divididos em três grupos, de acordo com a ordem de parto. Este experimento foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade José do Rosário Vellano, e protocolado com o registro 0024/2013. O primeiro grupo (n=30) recebeu uma única infusão uterina com Cefapirina 500 mg, o segundo (n=30) foi tratado com infusão de 2g de cloridrato de oxitetraciclina diluídos em 50 mL de soro fisiológico (dose única) e o terceiro (n=30) recebeu apenas infusão uterina com 20 mL de soro fisiológico (dose única). A taxa de cura clínica média total foi de 73,3% para o Grupo 1, 46,7% para o Grupo 2 e 10% para o Grupo 3 ($p < 0,05$). Em relação à Citologia uterina foram comparados os resultados dos grupos 1 e 2, sendo que considerou-se citologia negativa os animais com menos de 10% de células polimorfonucleadas. Dessa forma, o primeiro grupo apresentou 81,8% e o segundo 57,1% de citologia negativa ($p < 0,05$). Quanto ao desempenho reprodutivo após os tratamentos, o Grupo 1 apresentou período de serviço (PS) médio de 142,3 dias e o Grupo 2, 164,5 dias ($p < 0,05$). Além disso o Grupo 1 também obteve maior número de animais gestantes à 1ª inseminação e aos 60, 90, 120 e 180 dias pós-parto. Portanto, concluiu-se que a infusão uterina com Cefapirina 500 mg em dose única para o tratamento de endometrites apresentou eficiência superior que os tratamentos convencionais com Oxitetraciclina.

SBTE 250 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Uso de diferentes dispositivos intravaginais e doses de progesterona para indução de estro sincronizado em ovelhas santa inês doadoras de embriões

Jader Forquim Prates[1]; Fernanda Rocha Batista Oliveira[2]; Ana Lucia Rosa E Silva Maia[3]; Maria Izabel Carneiro Ferreira[4]; Joanna Maria Gonçalves De Souza Fabjan[3]; Felipe Zandonadi Brandao[3]; Jeferson Ferreira Da Fonseca[4]
1.IFSUDESTE-MG; 2.UNIPAC; 3.Universidade Federal Fluminense; 4.Embrapa Caprinos E Ovinos.

Palavras-chave: Transferência de embriões; indução de estro; ovino

A rotina da transferência de embriões (TE) em ovelhas impõe uso sucessivo e elevado de estímulo gonadotrófico aos animais. Estas condições podem comprometer a fertilidade das fêmeas. Em função disto, recomenta-se intercalar esta prática com gestações. O objetivo deste estudo foi testar a eficiência de protocolos de indução de estro sincronizado em ovelhas Santa Inês doadoras de embriões. O estudo foi conduzido entre os meses de janeiro e fevereiro, no município de Coronel Pacheco – MG. Vinte e quatro ovelhas previamente submetidas a seis coletas de embriões não cirúrgicas sucessivas foram equitativamente divididas de acordo com peso (kg) e escore da condição corporal (ECC; variação 1 a 5) em três grupos experimentais. As ovelhas de G1 (n=8; 57,6±12,0 kg; 3,3±0,8), G2 (n=8; 58,5±13,8 kg; 3,4±0,5) e G3 (n=8; 56,6±13,5 kg; 3,3±0,6) receberam implantes vaginais contendo P4 por seis dias além de 37,5µg d-cloprostenol (Prolise®; ARSA S.R.L., Buenos Aires, Argentina) latero-vulvar e 300 UI eCG (Novormon 5000®; Coopers, São Paulo, Brasil) i.m. 24 h antes da retirada do dispositivo. Os implantes utilizados foram CIDR (G1; CIDR®; 330mg, Pfizer Saúde Animal, São Paulo, Brasil), absorvente íntimo humano (G2 e G3; O.B®; Johnson & Johnson, São José dos Campos, Brasil) embebido com 200 (G2) ou 400mg (G3) P4 (Evocanil®; Zodiac Produtos Farmacêuticos, Diadema, Brasil). Após a retirada dos implantes, as ovelhas foram monitoradas para a ocorrência de estro e acasaladas naturalmente duas vezes ao dia (manhã e tarde), não excedendo quatro cópulas por dia por macho. Os dados estatísticos são apresentados de forma descritiva. O percentual de animais em estro e o intervalo para o estro foi respectivamente 100,0% e 41,3±12,2h para G1, 62,5% e 30,0±7,0h para G2 e 100,0% e 28,5±14,2h para G3. A taxa de gestação das ovelhas foi de 50,0% (4/8), 25,0% (2/8) e 50,0% (4/8) para ovelhas de G1, G2 e G3, respectivamente. A taxa de gestação geral considerando apenas ovelhas cobertas foi de 47,6% (10/21). Os resultados deste estudo sugerem que o uso de dispositivo e fonte de progesterona alternativos podem ser considerados para a indução de estro sincronizado em ovelhas Santa Inês após sucessivas colheitas não cirúrgicas de embriões.

Suporte financeiro: Embrapa (Projeto 03.12.01.031.00.00), CNPq (Projeto 310166/2012-8) e Fapemig (Projeto CVZ-PPM 00042-14).

SBTE 251 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Utilização da progesterona como marcador de alterações placentárias e viabilidade fetal em equinos

Ilusca Sampaio Finger[1]; Carlos Wayne Nogueira[1]; Claudia Barbosa Fernandes[2]; Fernanda Maria Pazinato[1]; Lorena Soares Feijó[1]; Bruna Suñé Moraes[1]; Luciana Oliveira De Araujo[1]; Bruna Da Rosa Curcio[1]
1.Universidade Federal De Pelotas; 2.Universidade De São Paulo.

Palavras-chave: éguas; gestação; progesterona

A placentite é a causa mais frequente de aborto e natimorto na espécie equina, comprometendo a unidade feto-maternal por processos de hipoxemia ou infecção (McKinnon; AAEP; 11; 87; 2009). O objetivo deste trabalho foi utilizar a concentração sérica de progesterona (P4) como marcador de alterações placentárias e viabilidade fetal em equinos. Para este estudo foi induzida placentite ascendente em 10 éguas mestiças Crioulas, conforme método já descrito (Feijó; Arq. Bra. Med. Vet. Zootec; 66; 1663; 2014). Cinco éguas induzidas não receberam tratamento e cinco éguas induzidas foram submetidas a tratamento com Sulfametoxazol-Trimetropim (30mg/kg, 12 horas, via endovenosa) e Flunixin Meglumine (1,1mg/Kg, 24 horas, via endovenosa) a partir de 48 horas pós-indução até o momento do parto ou aborto. Foram colhidas amostras de soro pré-indução (15 dias), no dia da indução, pós-indução (2 a 6 dias) e no dia do parto para quantificação sérica de progesterona através do conjunto de diagnóstico comercial Immunotech® (Beckman Coulter Company, Marseille, França) pela técnica de radioimunoensaio. Todos os partos foram assistidos e foi avaliada a viabilidade dos potros, sendo classificados em: A) viáveis e B) natimortos ou debilitados que não sobreviveram. Os potros viáveis seguiram com acompanhamento diário até os 30 dias de vida. Foi realizada avaliação macroscópica e histopatológica da placenta. As éguas foram divididas em dois grupos de acordo com as características histopatológicas: 1) placentite subaguda e aguda; 2) placentite crônica ou sem alteração. Para comparação entre os grupos de histopatologia da placenta e realização de tratamento para placentite foi utilizado teste T, para comparação da viabilidade dos potros foi realizado teste de Kruskal-wallis, sendo considerado nível de significância $P<0,05$. Não foi observada diferença nas concentrações de P4 nos momentos pré-indução, dia da indução, pós-indução e no parto em relação as lesões placentárias e a realização de tratamento. Na avaliação do momento pós-indução, foi observada maior concentração de P4 sérica nas éguas que pariram potros viáveis ($P=0,034$) em relação aos potros natimortos ou debilitados que não sobreviveram, sendo os resultados de média e desvio padrão, respectivamente: 23,48+20,10 e 8,90+3,47. No momento do parto, a P4 não apresentou diferença em relação a viabilidade do potro. Todos os potros mortos ou inviáveis (grupo B) foram provenientes do grupo de éguas com placentite subaguda ou aguda (grupo 1). A progesterona não demonstrou ser um bom marcador de alterações placentárias. As éguas que pariram potros natimortos ou debilitados que não sobreviveram apresentaram valores inferiores de progesterona, sugerindo que esta pode ser utilizada como um indicador de viabilidade fetal/neonatal.

Agradecimentos: Priscila Viau Furtado e Prof. Cláudio Alvarenga de Oliveira - Laboratório de dosagens hormonais FMVZ/USP; CAPES, FAPERGS e CNPq.

SBTE 272 Clonagem, transgênese e células-tronco

A seleção de espermatogônias tronco murinas (mSSC) por morfologia permite a obtenção de uma população de células com caracterítiscas de pluripotência semelhantes as células tronco embrionárias murinas (mESC)

Andrea Giannotti Galuppo; Pedro Cesar Chagastelles; Leonardo Alves Santos; Patricia Pranke
UFRGS.

Palavras-chave: Espermatogônias tronco-murinas; células-tronco embrionárias murinas; pluripotência

O conhecimento de que as espermatogônias tronco murinas (mSSC) apresentam características de pluripotência semelhantes as células tronco embrionárias (mESC) abre um novo caminho nas áreas de terapia celular e medicina regenerativa. O objetivo do trabalho foi avaliar se a seleção das mSSC com base na morfologia permite obter uma população de células com características similares as mESC. As mSSC foram isoladas de camundongos C57Bl/6 de 5-10 dias. Os testículos foram removidos e os túbulos seminíferos tratados com colagenase/DNase seguido de tripsina. Após as células foram passadas por um filtro de nylon de 70 µm e mantidas em cultura em placa tratada com gelatina 0,1%. As células foram submetidas a uma sequência de incubações. O sobrenadante da última incubação foi coletado e colocado sobre uma camada alimentadora de fibroblastos embrionários murinos inativados com mitomicina C. As mSSC foram mantidas a 32°C, 5%CO2 e 90% umidade. O meio de cultura foi o alpha-MEM com soro fetal bovino (SFB), penicilina e estreptomicina, aminoácidos não-essenciais (NEaa), b-mercaptoetanol, N21, GDNF, EGF e bFGF. Como controle foi utilizada uma linhagem de mESC (C57Bl/6) previamente isolada em nosso laboratório. As mESC foram cultivadas em DMEM alta glicose com SFB, penicilina e estreptomicina, LIF, piruvato de sódio, L-glutamina, b-mercaptoetanol e NEaa. As condições de cultivo para as mESC foram 37°C, 5%CO2 e 90% umidade. Para a morfologia das colônias foi utilizado microscópio com contraste de fase e marcação com DAPI/Faloidina. Os marcadores de pluripotência Oct-4 e Sox-2 foram avaliados por imunofluorescência e a expressão de SSEA-1 por citometria de fluxo. A análise da morfologia por contraste de fase e marcação com DAPI/Faloidina mostrou que as mSSC estavam organizadas em colônias como as mESC. Isso pode ser considerado como um sinal inicial da pluripotência das mSSCs, pois é a principal característica morfológica das mESC. A imunofluorescência para Oct-4 e Sox-2 foi positiva em ambos os grupos, o que demonstrou a presença nas mSSCs de dois dos mais importantes fatores de transcrição de pluripotência. A expressão do SSEA-1 foi positiva apenas para as mESC. Entretanto na literatura é descrito que a expressão do SSEA-1 é variável nas mESCs e talvez esse não seja a melhor referência em relação a pluripotência para as mSSCs. Esses resultados preliminares mostraram que o isolamento das mSSC com base na morfologia resultam em células com características de pluripotência quando comparadas com as mESC. Entretanto uma avaliação mais completa das características de pluripotência dessas células é necessária, como a produção de corpos embrióides e quimeras. Considerando que as mSSC não possuem os problemas éticos normalmente associados as mESC podem ser uma importante ferramenta para uso em estudos de terapia celular e medicina regenerativa. Suporte financeiro: CNPq, CAPES, FAPERGS e Instituto de Pesquisa com Células-tronco.

SBTE 273 Clonagem, transgênese e células-tronco

Caracterização de células-tronco de pluripotência induzida através do uso da imunofluorescência e citometria de fluxo em equinos.

Midyan Daroz Guastali[1]; Michelle Silva Araújo[1]; Bianca Andriolo Monteiro[1]; Daniela Martins Paschoal[1]; Rosiara Rosaria Dias Maziero[1]; Taticia Lieh Ikeda[1]; Fabiana Fernandes Bressan[2]; Flavio Vieira Meirelles[2]; Fernanda Cruz Landim Alvarenga[1]
1.Universidade Estadual Paulista Botucatu; 2.Universidade De São Paulo.

Palavras-chave: Células-tronco de pluripotência induzida; imunofluorescência; citometria de fluxo

As células-tronco de pluripotência induzida (iPS) são células adultas geneticamente reprogramadas para um estado semelhante ao de células-tronco embrionárias. Vetores lentivirais são usados na transfecção como uma maneira segura e eficaz de produzir iPS. O cordão umbilical (CU) é uma reserva de células-tronco mesenquimais multipotentes e, por isso pode representar uma fonte eficiente de células a serem reprogramadas. Para caracterizar as células reprogramadas, utiliza-se de marcadores positivos específicos para clones pluripotentes tais como: Oct-4, Nanog, Sox-2, TRA-1-60, TRA-1-81, SSEA-1, SSEA3 e SSEA-4. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi caracterizar células da matriz do cordão umbilical equino após reprogramação com vetor lentiviral pelos métodos de imunofluorescência e citometria de fluxo. Para isso, 5 amostras de CU equinos foram coletadas ao nascimento. As matrizes umbilicais foram submetidas a digestão enzimática, em uma solução de colagenase a 0,004% diluído em PBS, e as células obtidos por filtração foram plaqueadas em frascos de cultura de plástico com 5 ml de DMEM suplementado com 20% de soro fetal bovino, antibióticos, antimicóticos e, seguido de incubação a 37°C numa atmosfera 100% úmida e 5% de CO2. Quando as células atingiram 40% de confluência e uma concentração de 105 células foram transfectadas com 50µl de vetor lentiviral EF1α-human STEMCCA (OKSM) (Millipore, SCR544), que contém os fatores de transcrição OCT-4, SOX2, C-MYC e KLF-4 integrados para a geração de células iPS, de acordo com o protocolo do fabricante, acrescido de 8 ng /mL de polibreno (brometo de hexadimetrina, Sigma). O meio de cultivo foi renovado 12 h após a incubação. Cinco dias após a transfecção, as células foram transferidas para um subcultivo de fibroblastos de camundongo e cultivadas durante 14 dias em meio específico para iPS. As primeiras colônias foram visualizadas após duas semanas de infecção. Quando os clones estavam bem estabelecidos foram realizadas duas passagens mecânicas e duas enzimáticas. Após o reestabelecimento e proliferação das colônias, estas foram submetidas a protocolos de imunomarcação e análise por citometria de fluxo. A imunocitoquímica foi realizada em placas de 6 poços contendo entre 20 e 30 colônias por poço, já na citometria de fluxo foram analisadas 200 mil células para cada um dos anticorpos. Em ambas as técnicas foram utilizados os seguintes anticorpos: Oct-4, Nanog, Sox-2, TRA-1-60 e TRA-1-81. Constatamos que na imunofluorescência as colônias de CCUE marcaram positivamente para Oct-4, Sox-2 e TRA-1-81, já na citometria de fluxo as células foram positivas para Oct-4, Nanog, TRA-1-60 e TRA-1-81. Apesar de o rol de marcadores ser específico para células pluripotentes, não houve correspondência total entre as duas técnicas utilizadas. Podemos concluir que as células do cordão umbilical equino foram reprogramadas com sucesso e apresentaram características de células pluripotentes.

SBTE 274 Clonagem, transgênese e células-tronco

Células tronco adultas e reprodução animal: potencial do uso de células tronco mesenquimais adiposas como alternativa para o sistema tradicional de co-cultivo na PIVE em bovinos

Hamilton Silva Do Nascimento[1]; Mayra Pauline Ribeiro Costa[1]; Cinthia Távora De Albuquerque Lopes[1]; Felipe Brito[1]; Karynne De Nazaré Lins Brito[1]; Carla Carvalho[2]; Simone Do Socorro Damasceno Santos[1]; Otávio Mitio Ohashi[1]; Moysés Dos Santos Miranda[1]
1.Universidade Federal Do Pará; 2.Universidade De São Paulo.

Palavras-chave: Células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo; pive bovinos; co-cultivo

Na PIVE bovina, o sistema de co-cultivo de embriões com células somáticas (tradicionalmente granulosa) protege o embrião contra metabólitos tóxicos e contra o estresse oxidativo (Orsi, et al, Theriogenology. (67), 441–458, 2007). Células tronco mesenquimais (CTMs) são multipotentes, secretam fatores de crescimento, citocinas e podem ser isoladas de tecidos adultos de várias espécies (Dimarino. Front. Immunol. (4) 201, 2013), incluindo bovinos. Neste trabalho, avaliamos o uso de CTMs do tecido adiposo bovino (CTMAs-b) no sistema de co-cultivo da PIVE bovinos. CTMAs-b foram isoladas de uma fêmea adulta e cultivadas em IMDM com 10% SFB. Na passagem 3 (P-3), a multipotência das CTMAs-b foi avaliada por imunofenotipagem (CD73; CD90; CD105) e diferenciação *in vitro* (tecidos ósseo, adiposo e cartilaginoso). Para a PIVE, oócitos foram maturados por 20 horas (TCM-199 com 10% SFB, FSH e LH) e fertilizados com sêmen de um único touro. Os embriões foram cultivados em gotas de 100µl de SOF com 5% SFB e 6 mg/mL BSA por 7 dias em 5% CO2 a 38.5 °C. No primeiro experimento, foram testadas 10^3 ou 10^4 CTMAs-b (entre P-4 e P-6) na gota de co-cultivo. No segundo experimento, os embriões foram cultivados com 10^4 CTMAs-b (entre P-4 e P-6), com células da granulosa derivadas da MIV e sem co-cultivo (Controle). Foram avaliados, a taxa de clivagem e de blastocistos, o número total de células e a expressão dos transcritos POU5F1, G6PDH e HSP70. Os resultados foram analisados por teste t e ANOVA adotando-se 5% de significância. A multipotência das CTMAs-b foi confirmada, tanto por imunofenotipagem (CD73+, CD90+ e CD105+) quanto, pela diferenciação *in vitro*. No primeiro experimento, o uso de 10^4 CTMAs-b aumentou ($p<0,05$) a taxa de blastocistos (54,16%±8,18) em comparação ao uso de 10^3 CTMAs-b (33,11%±6,06). No segundo experimento, a taxa de blastocistos do grupo 10^4 CTMAs-b (45,97% ± 12,5; n= 231) foi superior ($p<0,05$) a do co-cultivo com granulosa (33,67% ± 14,7; n= 231) e do controle (34,70% ± 9,8; n= 232). Além disso, o grupo 10^4 CTMAs-b aumentou ($p<0,05$) o número de células por blastocistos (177,4 ± 35.3; n=28) em comparação ao co-cultivo com granulosa (136,2 ± 26; n=22) e ao controle (115 ± 21; n= 23). Finalmente, blastocistos co-cultivados com CTMAs-b obtiveram maior expressão ($p<0,05$) dos genes POU5f1 (pluripotencia) e G6PDH (metabolismo glicolítico) em comparação aos demais grupos. Em conclusão, CTMAs-b (10^4 células) podem ser uma alternativa para o co-cultivo em PIVE de bovinos. Comparado ao sistema tradicional com células da granulosa, o co-cultivo com CTMAs-b aumentou a quantidade e qualidade de embriões obtidos. Mais estudos devem ser realizados avaliando a taxa de prenhez dos embriões e identificando os fatores responsáveis pelo efeito das CTMAs-b no desenvolvimento embrionário.

SBTE 275 Clonagem, transgênese e células-tronco

Desenvolvimento de embriões suínos produzidos por ativação partenogenética elétrica ou química

Lina Castelo Branco Motta[1]; Lívia Correia Magalhães[2]; Carla Fabiana Gomes De Jesus[2]; Dárcio Ítalo Alves Teixeira[2]; Luciana Magalhães Melo[2]; Vicente José De Figueirêdo Freitas[2]; Maajid Hassan Bhat[2]
1.Universidade Federal Do Ceara; 2.Universidade Estadual Do Ceará.

Palavras-chave: Ativação química; ativação elétrica; partenogênese

Embriões partenogenéticos produzidos após a ativação artificial do oócito têm elevada importância para o estudo de processos embrionários, incluindo alterações morfológicas e bioquímicas essenciais para o desenvolvimento. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do método de ativação partenogenética (elétrica ou química) em oócitos suínos sobre as taxas de desenvolvimento embrionário. Complexos Cumulus-Oócito (CCOs) foram recuperados a partir de ovários de matadouro e maturados em TCM 199 por 48 horas a 38,5 °C e 5% de CO2. Após MIV, os CCOs foram desnudados por sucessivas pipetagens em TCM contendo hialuronidase e por 3 minutos no vórtex. A ativação química foi realizada com ionomicina (5 µM) durante 5 minutos (Grupo IONO) e, nos dois grupos experimentais elétricos, utilizando 20V ou 40V (ambos por 80 µsec), todas as estruturas foram incubadas em 6-DMAP (2 mM) durante 3 horas, seguido de CIV em SOF por oito dias. As taxas de ativação e embrionárias foram avaliadas após três e oito dias de cultivo, respectivamente. Para análise dos dados foi realizada o teste exato de Fisher com p <0,05. Foram obtidos 125 ovários, que após punção renderam 567 CCOs para MIV. Destes, 392 foram maturados resultando em uma taxa de maturação de 69,1%. Estas estruturas foram utilizadas para ativação partenogenética, sendo divididas nos três grupos de ativação (IONO, 20V e 40V). No grupo IONO, 153 oócitos foram ativados, e nos grupos 20 V e 40V, 115 e 124, respectivamente. A taxa de ativação dos grupos IONO, 20V e 40V foram, respectivamente, 74,5% (114/153), 80,9% (93/115) e 78,2% (97/124), sem diferença estatística (P>0,05). Quanto a taxa de desenvolvimento embrionário, foi obtido 21,1% (24/114) no grupo IONO; 17,2% (16/93) no grupo 20V e 15,5% (15/97) no grupo 40V; não apresentando diferenças estatísticas entre grupos (P>0,05). Em conclusão, embriões partenogenéticos suínos podem ser obtidos eficientemente pelos três métodos testados.

SBTE 276 Clonagem, transgênese e células-tronco

Efeito da tricostatina A na produção de embriões bovinos clonados por transferência nuclear com células tronco mesenquimais

Carolina Gonzales Da Silva[1]; Heidi Christina Bessler[2]; Álvaro Moraes Da Fonseca Neto[2]; Carlos Frederico Martins[2]; Sônia Nair Báo[3]
1.Embrapa Cerrados E Universidade De Brasília; 2.Embrapa Cerrados; 3.Universidade De Brasília.

Palavras-chave: Clonagem; epigenética; histona desacetilase

A acetilação das histonas é um dos principais mecanismos de reprogramação epigenética do genoma dos gametas a fim de estabelecer um estado totipotente para o desenvolvimento normal (Ikeda et al., Zygote 17, 209-215, 2009). A desacetilação é catalisada pelas histonas desacetilases (HDAC) que remove grupamentos acetil e causa compactação da cromatina e silenciamento do segmento de DNA neste local (Johnstone, Nature Reviews Drug Discovery 1, 287-299, 2002). A tricostatina A (TSA) é um agente inibidor de HDAC que aumenta a quantidade de histonas acetiladas e a desmetilação do DNA (Lee et al., Journal of Reproduction and Development 57, 34-42, 2011). Neste sentido, a droga vem sendo usada na tentativa de aumentar a eficiência de produção de embriões por transferência nuclear (TN). O objetivo deste estudo foi testar o efeito da TSA em períodos de exposição de 20 e 25 horas, no cultivo de embriões bovinos clonados por meio de TN com células tronco mesenquimais (CTM) provenientes do tecido adiposo. Uma biópsia de pele e tecido adiposo foi coletada da região perineal de uma fêmea bovina da raça Gir, aos dois meses de idade. As células foram isoladas por explante e cultivadas em meio *Dulbeccos Modified Eagle Medium* adicionado de 10% de soro fetal bovino. Complexos cumulus-ovócitos recuperados de ovários de abatedouros foram maturados por 18 h a 38,5ºC e 5% de CO_2. A TN foi então realizada com as CTM do tecido adiposo e os embriões reconstruídos foram submetidos ao cultivo com 50 nM de TSA durante 20 e 25 h, sendo 4 h no meio de ativação contendo 6-DMAP e adicionalmente por 16 ou 21 h em meio de cultivo. Posteriormente, os embriões continuaram no cultivo em meio SOF sem TSA e o controle partenogenético foi realizado em cada manipulação. Cinco procedimentos de TN foram realizados para cada tratamento (20 h, 25 h e sem TSA). As taxas de fusão, clivagem e produção de blastocistos foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). A taxa de clivagem dos embriões partenogenéticos (93,45±7,97) foi superior à taxa de clivagem dos embriões sem tratamento (82,45±5,59), porém foi estatisticamente semelhante à dos embriões tratados por 20 e 25 h (87,25±8,41 e 85,54±3,88, respectivamente). Ainda, não houve diferença na clivagem de embriões tratados e não tratados. A taxa de produção de blastocistos no sétimo dia de cultivo foi superior para o controle partenogenético (59,24±11,75) em relação aos tratamentos por 20 h (36,22±16,80), 25 h (33,66±12,84) e sem o uso da TSA (32,70±9,11), que não diferiram entre si. Pode-se concluir que o uso da TSA não apresentou efeito significativo na melhoria das taxas de clivagem e desenvolvimento de embriões bovinos por transferência nuclear com CTM do tecido adiposo. Porém, estudos adicionais com avaliações da qualidade e padrão de metilação dos embriões devem ser realizados para uma melhor compreensão dos efeitos da TSA em embriões clonados com este tipo celular.

SBTE 277 Clonagem, transgênese e células-tronco

Efeito do ciclo celular e inibição da desacetilação no desenvolvimento de embriões suínos produzidos por transferência nuclear

Vitor Braga Rissi[1]; Werner Giehl Glanzner[1]; Lady Katerine Serrano[1]; Manuela Wolker Manta[1]; Mariana Priotto De Macedo[1]; Alfredo Quites Antoniazzi[1]; Paulo Bayard Dias Gonçalves[1]; Vilceu Bordignon[2]
1.UFSM; 2.Mcgill University.

Palavras-chave: Clonagem; scriptaid; ciclo celular

Existem evidências em diferentes espécies de que o tratamento de embriões produzidos por SCNT com inibidores de enzimas deacetilases (HDACi) facilita a reprogramação celular e melhora o desenvolvimento embrionário. O objetivo deste estudo foi avaliar se o efeito dos HDACi's em embriões clonados é afetado pelas interações de ciclo celular tanto das células quanto dos citoplastos no momento da reconstrução dos embriões. Embriões clonados foram produzidos com citoplastos em MII ou TII e células nas fases G1 ou G2/M do ciclo celular. Para obtenção de células na fase G1-0 do ciclo celular, fibroblasos suínos foram cultivados até atingirem confluência e mantidos por pelo menos 48h, as células foram então fixadas para avaliação do ciclo celular. A proporção de células nas fases G1-0 (88,2 ± 4,3%), S (2,7 ± 1,9%) e G2/M (9,1 ±2,8%) confirmou que a maioria das células estava na fase G1-0. Para obtenção das células da fase G2/M, células obtidas de um cultivo confluente foram tripsinizadas e semeadas em uma densidade não confluente, o que permite um onda sincronizada de células progredindo entre as fases S e G2/M do ciclo celular. As células foram tripsinizadas e fixadas para avaliação do ciclo celular às 0, 16, 20, 24, 28, 32 e 36h pós-passagem. Nós observamos que mais de 30% das células haviam alcançado a fase G2/M do ciclo celular entre 24 e 28h pós-passagem partindo de um cultivo confluente. A partir disto, foram selecionadas como doadoras de núcleo somente as células grandes (diâmetro médio de 25,9µM), coletadas entre 24 e 28h pós-passagem a partir de um cultivo confluente. Embriões reconstruídos com diferentes combinações de ciclo celular foram tratados ou não com Scriptaid (500nM) por 15 horas, e então cultivados *in vitro* até o dia 7. Um total de 568 embriões foram reconstruídos utilizando células doadoras em G1-0 e citoplastos em MII ou TII. O desenvolvimento até o estágio de blastocisto foi significativamente maior quando citoplastos em MII (19,8%) foram utilizados em comparação ao grupo TII (4,6%). De maneira interessante, o tratamento com Scriptaid aumentou o desenvolvimento embrionário quando citoplastos em MII foram utilizados (MII 19.8% vs. MII+S 32.6%; p=0.09), mas não quando citoplastos em TII (TII 4.6% vs TII+S 6.2%; p=0.73) foram utilizados. Um total de 448 embriões foram reconstruídos utilizando células na fase G2/M como doadoras de núcleo. O desenvolvimento até o estágio de blastocisto foi signficamente menor no grupo MII (8,7%) em relação ao grupo TII (22,2%). O tratamento com Scriptaid aumentou o desenvolvimento em embriões reconstruídos com citoplastos em MII (MII 8.7% vs. MII+S 16.6%), mas não quando citoplastos em TII (TII 22.2% vs. TII+S 22.4%) foram utilizados. Nossos resultados indicam que: i) as interações de ciclo celular entre citoplastos e células doadoras de núcleo afetam a reprogramação celular; e ii) a resposta dos embriões reconstruídos ao tratamento com scriptaid depende de fatores presentes em citoplastos em MII.

SBTE 278 Clonagem, transgênese e células-tronco

Potencial do meio condicionado completo (MC), sobrenadante (SN), microvesículas (MV) e microvesículas lisadas (L-MV) derivadas de células estromais mesenquimais (MSC) do amnion equino na supressão da proliferação de linfócitos alogênicos: resultados preliminares

Bruna De Vita[1]; Anna Lange-Consiglio[2]; Pietro Romele[3]; Claudia Perrini[2]; Patrizia Bonassi Signoroni[4]; Fernanda Cruz Landim Alvarenga[1]; Fausto Cremonesi[2]; Ornella Parolini[4]
1.FMVZ - UNESP; 2.Universidade De Milão; 3.Centro Di Ricerca E. Menni/Fondazione Poliambulanza; 4.Centro Di Ricerca E. Menni/ Fondazione Poliambulanza.

Palavras-chave: Célula; mesenquimal; imunidade

MSCs tem demonstrado secretar moléculas com efeitos parácrinos e propriedades imunomoduladoras interessantes que podem ser encontrados no meio onde são cultivadas. Além de fatores solúves, estudos recentes têm sugerido que alguns dos efeitos regenerativos das MSCs são mediados por MVs. MVs podem ser classificadas como vesículas liberadas da membrana plasmática ou exossomos (origem na membrana endossomal) e representam um importante mecanismo de comunicação intercelular. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial do MC completo (fatores solúveis + microvesículas), SN (fatores solúveis), MV e L-MV (conteúdo interno) derivados de células estromais mesenquimais do amnion equino (EqAMSCs) na supressão da proliferação de células sanguíneas periféricas mononucleadas (PBMC). O meio condicionado (MC) foi obtido através do cultivo de 1x106 EqAMSC/mL, overnight, na ausência de soro. Microvesículas foram obtidas através da ultracentrifugação do MC. Após a centrifugação para obtenção das MVs, o sobrenadante (SN) também foi colhido. As microvesículas lisadas (L-MV) foram obtidas através da sonicação das MVs. Três amostras de cada grupo foram analisadas em triplicadas. As diferentes preparações mencionadas acima foram adicionadas em diferentes volumes e concentrações: 170µL, 120µL e 80µL de MC e SN, e 250x106, 50x106, 10x106 e 2x106 MV/well foram adicionadas ao cultivo de PBMC equino (2x105 em volume final de 200µL de meio DMEM completo) na presença do mitógeno fito-hemaglutinina (PHA) na concentração final de 2 µg/mL. A proliferação de linfócitos foi avaliada após 3 dias através da adição de 0.67 µCi/well de [3H]-timidina por 16–18 horas e a incorporação da timidina foi mensurada através de um contador de cintilação e luminescência de microplacas. A seguir, para avaliar o efeito do conteúdo interno das MVs, L-MVs foram plaqueadas de acordo com o volume utilizado no plaqueamento das amostras de MV nas concentrações de 100x106, 50x106 e 5x106 MV/well, ressuspendidas em DMEM. Então, o teste de proliferação de PBMC foi realizado conforme descrito anteriormente. Teste t pareado, Teste t não pareado corrigido por Baseline e ANOVA seguido de teste de Tukey foram utilizados através do Software GraphPad Prism, versão 6 (significância $P \leq 0,05$). Os resultados preliminares obtidos indicam que MC e SN foram ambos capazes de suprimir significativamente em mais de 50% a proliferação de PBMC quando 170 µl e 120 µl foram utilizados; ao passo que nenhuma das concentrações de MV pareceu ter qualquer efeito na proliferação de linfócitos, mesmo depois da lise. Com base nestes resultados, concluímos que MVs e seu conteúdo interno não impactaram a proliferação de linfócitos, diferente do observado com MC e SN. No entanto, os efeitos imunomoduladores da MV não podem ser descartados, uma vez que mais estudos sobre a influência de MVs e L-MVs sobre as diferentes subpopulações linfocitárias são necessários. Agradecimentos: FAPESP, Universidade de Milão e Fundação Poliambulanza.

SBTE 279 Clonagem, transgênese e células-tronco

Produção de embriões clones de cervídeo *(Mazama gouazoubira*) utilizando oócitos de caprino: resultados preliminares

Jesus, C.F.G.; Magalhães, L.C; Motta, L.C.B. ; Teixeira, D.I.A. ; Melo, L.M. ; Freitas, V.J.F.; Bhat, M.H.
UECE.

Palavras-chave: Caprino; cervídeo; tncsi

O veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*) é uma espécie de cervídeo presente no Nordeste do Brasil. Devido a diminuição do seu território e caça predatória, entre outros, esta espécie pode estar ameaçada nos próximos anos. Além disso, a mesma pode ser utilizada como modelo para conservação de espécies já ameaçadas através da utilização da clonagem reprodutiva interespecífica. O objetivo deste estudo foi produzir por Transferência Nuclear de Célula Somática interespecífica (TNCSi) embriões clones (cervídeo-caprino) e avaliar seu desenvolvimento embrionário *in vitro*. Embriões clones intraespecíficos (caprino-caprino) foram utilizados como controle. Quatorze cabras foram utilizadas como doadoras de oócitos após tratamento hormonal constituído de progestágeno/luteolítico/FSH e abate logo após o final do tratamento. Após punção ovariana, os oócitos foram avaliados e colocados para MIV em TCM 199 suplementado com 10% de SFB durante 22-24 horas em atmosfera umidificada a 38,5 °C e 5% de CO2. Após MIV, os oócitos foram desnudados e corados com Hoechst 33342 para a enucleação utilizando microscópio invertido (Nikon TE2000, Tóquio, Japão) equipado com micromanipuladores (Narishige, Tóquio, Japão), sob luz UV. Anteriormente, fibroblastos caprinos e cervídeos foram cultivados até 95% de confluência, e utilizados como carioplastos para TNCS e TNCSi respectivamente, nas passagens 3-7. Os embriões foram reconstruídos por eletrofusão (Multiporator, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), ativados utilizando procedimento ionomicina-DMAP. Aqueles em que foi confirmada a reconstrução foram cultivados *in vitro* por oito dias em mSOF suplementado com 5% SFB em atmosfera umidificada a 38,5 °C com 5% de CO2, 5% O2 e 90% de N2 (Eve, WTA, Cravinhos, Brasil). As taxas de desenvolvimento embrionário foram avaliadas por teste exato de Fisher com P <0,05. A partir de 28 ovários, foram obtidos 124 oócitos, o que resultou em uma média de 4,4 oócitos por ovário. Dos oócitos colhidos 56 (45,0%) foram considerados de Grau I e colocados para MIV. A taxa de maturação foi 75,0% (42/56). Dos oócitos maturados, 24 foram utilizados para TNCSi e 13 para TNCS. As taxas de clivagem foram de 38,4% e 25,0% para embriões TNCS e TNCSi, respectivamente (P>0,05). Já as taxas de blastocistos no grupo TNCSi foi de 50,0% (3/6) enquanto o TNCS 40,0% (2/5), não havendo diferença significativa (P>0,05). Estes resultados preliminares demonstram que oócitos caprinos apresentam potencial para serem utilizados como citoplastos em futuros programas de conservação de cervídeos em risco de extinção.

SBTE 280 Clonagem, transgênese e células-tronco

Protocolo de sincronização de fibroblastos na fase G2/M do ciclo celular

João Ricardo Malheiros Souza[1]; Vitor Braga Rissi[1]; Werner Giehl Glanzner[1]; Karine Campagnolo[1]; Raíza Mengue Freitas[1]; Felipe Ceni[1]; Alfredo Quites Antoniazzi[1]; Paulo Bayard Dias Gonçalves[1]; Vilceu Bordignon[2]
1.Universidade Federal De Santa Maria; 2.Mcgill University.

Palavras-chave: Cdk1; ciclo celular; ro-3306

A coordenação do ciclo celular é importante para estudar interações núcleo-citoplásmicas em pesquisa básica onde se realiza fusão ou transferência nuclear. No entanto não existem protocolos confiáveis que resultam em altas taxas de células sincronizadas na fase G2/M durante o cultivo *in vitro*. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia de um inibidor de CDK1 (RO3306) para sincronizar fibroblastos na fase G2/M do ciclo celular. Para isso, fibroblastos suínos foram mantidos em cultivo até atingirem a confluência e então utilizados para preparar cultivos não confluentes adicionando $5x10^4$ células em placas de 6 poços, o que constituiu uma densidade não confluente. As células foram então fixadas para análise do ciclo celular as 0, 16, 20, 24, 28, 32, 36 e 40 horas pós-passagem. Uma densidade de células não confluente a partir de um cultivo mantido em confluência permite uma onda sincronizada de células progredindo pelas fases S e G2/M do ciclo celular. Foi observado que mais de 30% das células progrediram até a fase G2/M entre 24 e 28 horas após a passagem a partir de um cultivo confluente. Baseado nestes resultados foram testadas duas doses (5µM e 9µM) do RO3306 iniciando o tratamento as 16 ou 20 horas pós-passagem a partir de cultivos confluentes. As células foram fixadas para análise do ciclo celular às 24, 28, 32, 36 e 40 horas pós-passagem. Para análise do ciclo celular, as células foram tripsinizadas (0,25% tripsina-EDTA) e resuspendidas em solução de fixação (70% etanol e 30% PBS) por 15 minutos em gelo. As células fixadas foram centrifugadas e ressuspendidas em PBS, antes da análise por citometria de fluxo as células foram centrifugadas em ressuspendidas em 1ml de PBS contendo 50µg de iodeto de propídio e 100µg de RNAse, sendo mantidas a 37˚C por 40 minutos. A quantidade de DNA de 10.000 células por amostra foi determinada por citometria de fluxo (fluorescence-activated cell sorting - FACS). As porcentagens de células em G1-0, S e G2/M foram calculadas utilizando o FACSsuite Software (BD Biosciences). Quando o tratamento iniciou as 16h pós-passagem, a maior proporção de células na fase G2/M (41,9%) foi obtida no grupo exposto a 5µM de RO3306 até as 32h, o qual foi significativamente maior do que o grupo controle no mesmo tempo (22,2%). Quando o tratamento iniciou as 20 horas pós-passagem, as maiores porcentagens de células nas fases G2/M foram obtidas nos grupos tratados com 9µM de RO3306 e fixadas as 36h (61,7%) e 40h (56,1%) pós-passagem. O diâmetro das células que estavam em diferentes fases do ciclo celular foi determinado em células tratadas com 9µM de RO3306 e fixadas as 36 ou 40h pós-passagem. O diâmetro médio das células em G1-0 e G2/M foi de 13,9µm e 25,9µm, respectivamente. Os resultados proporcionam uma metodologia confiável baseada na inibição da CDK1 e diâmetro celular para obtenção de células na fase G2/M.

SBTE 281 Clonagem, transgênese e células-tronco

Transferência nuclear de células somáticas em equinos com células de doadores no G2 e oócitos em telófase II

Marc Peter Maserati Jr, Perla Fleury
In Vitro Clonagem

Palavras-chave:

A produção de equinos de transferência nuclear das células somáticas (SCNT) só foi relatada por alguns laboratórios devido à falta de oócitos equinos disponíveis e ao alto custo para manter e trabalhar com os equinos. O protocolo usado para a clonagem comercialmente equina pelos nossos concorrentes foi adaptado a partir do procedimento utilizado para clonar Dolly, a ovelha. Em 2005 a In Vitro Clonagem (IVC) desenvolveu um novo procedimento para a clonagem bovina que foi mais tarde adaptado para uso em equinos. O protocolo Dolly usa células do doador em G1 ou G0 do ciclo celular e enuclea os oócitos em metáfase II. Já o protocolo da In Vitro Clonagem usa células do doador em G2 do ciclo celular com os oócitos enucleados em Telófase II da meiose. Aqui comparamos o procedimento utilizado para clonar Dolly com a nova técnica de clonagem da IVC, ambos adaptados para utilização no equino. Os nossos resultados demonstram uma taxa semelhante de clivagem e uma taxa superior de produção de blastocisto e gestação inicial em comparação com o método de clonagem de Dolly. Em geral, observa-se: 1. As taxas de clivagem de embriões foram semelhantes entre ambos os protocolos; 2. O aumento observado na taxa de blastocisto do IVC sobre o método de clonagem de Dolly foi estatisticamente significativa; 3. O aumento observado na taxa de prenhes do método de clonagem IVC sobre o método de clonagem de Dolly foi estatisticamente significativa; 4. Perdemos a prenhe estabelecida utilizando o método de clonagem de Dolly enquanto temos 4 potros nascidos a partir do método de clonagem IVC. Nós adaptamos com sucesso o nosso método de clonagem bovina utilizando oócitos em Telófase II e células de doadores em fase G2 do ciclo celular adaptado para uso em equinos. O protocolo adaptado supera o método utilizado para clonar Dolly em termos de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto e gestações que instituem. Embora ainda estejamos à espera de resultados de nascimentos vivos, nós já entregamos 4 equinos clonados e estamos à espera de mais para nascer no próximo ano.

SBTE 284 Biotecnologias de suporte: criopreservacão, criobiologia, biologia molecular e "ômicas"

Abordagem bioinformática para estabelecimento de marcadores da competência oocitária em células do cumulus

Lúcia Von Mengden Meirelles; Marco Antônio De Bastiani; Fábio Klamt
UFRGS.

Palavras-chave: Cumulus; biomarcador; oócito

Uma das maiores dificuldades das terapias de reprodução assistida é a seleção de células germinativas de boa qualidade para posterior fertilização e implantação. Por isso, a busca por bioindicadores da qualidade oocitária é constante. O cumulus oophorus forma um conjunto de células somáticas que circundam o oócito. As células do cumulus oophorus têm sido muito estudadas, pois possuem uma relação íntima com o oócito durante todo o processo de foliculogênese, maturação oocitária e ovulação. A expressão gênica e atividade bioquímica das células do cumulus são influenciadas pelas condições do oócito, do ambiente folicular e por interações com o ambiente ovariano. Ainda, estas células são descartadas após técnicas de fertilização *in vitro*, o que as torna um material de fácil acesso, que pode ser coletado de maneira não invasiva nestes tratamentos, além de serem livres de vieses éticos. Nosso objetivo foi identificar, em nível das células do cumulus, genes relacionados à competência oocitária. Para isso, buscou-se em repositórios públicos (Gene Expression Omnibus) por dados de expressão gênica oriundos de microarranjo advindos de experimentos utilizando células do cumulus oophorus e que disponibilizam também a descrição clínico-patológica das amostras, incluindo desfecho clínico da célula germinativa (clivagem, formação de blastocisto, implantação). Nestes bancos de dados, foram utilizadas amostras comparando cumulus provenientes de folículos que originaram oócitos de boa e má qualidade (GSE55654, GSE54135, GSE37277, GSE22869, GSE18559, GSE9526), e também amostras de pacientes de diferentes grupos amostrais, como pacientes obesas e portadoras de ovários policísticos (GSE10946). Para avaliar as diferenças entre grupos experimentais nos diferentes bancos de dados e obter informações sobre a competência oocitária, utilizamos três abordagens computacionais: 1) análise de expressão diferencial em ambiente estatístico R utilizando o pacote LIMMA; 2) enriquecimento de vias utilizando o método GSEA; e 3) enriquecimento de processos biológicos utilizando a ferramenta online DAVID. Ainda, para reforçar e corroborar a abordagem e os resultados, esta abordagem também foi utilizada em estudos de reprodução assistida animal, mostrando-se promissora na identificação da qualidade oocitária (GSE65269, GSE36605, GSE31261). Nossos resultados, além de estabelecer biomarcadores da qualidade oocitária, ressaltam também a relevância do uso do cumulus para identificação de oócitos de qualidade.

SBTE 285 Biotecnologias de suporte: criopreservacão, criobiologia, biologia molecular e "ômicas"

Associação de hCG e acetato de deslorelina na indução da ovulação em éguas: alteração no perfil proteico do fluido folicular

Gabriel Oliveira Santos[1]; Henrique De Araujo Bastos[1]; Bianca Petrucci Rocha[1]; Marcus Ferreira Sá[2]; Júlio Ferraz Jacob[2]; Anita Mylius Pimentel[1]; Caroline Antoniazzi Wolf[1]; Maria Inês Mascarenhas Jobim[1]; Rodrigo Costa Mattos[1]; Adriana Pires Neves[3]
1.UFRGS; 2.UFRRJ; 3.UNIPAMPA.

Palavras-chave: Fluido folicular; indução da ovulação; perfil proteico

Substâncias presentes no fluido folicular (FF) são essenciais para a proliferação e diferenciação das células da granulosa, processos relacionados à ruptura da parede folicular, maturação e fertilização do oócito e luteinização. Na égua, poucos relatos de análises proteômicas do FF estão disponíveis (FAHIMINIYA, Prot Sci, 9:1, 2011; PETRUCCI, J Eq Vet Sci, 34:115, 2014). A capacidade para induzir a ovulação de forma confiável é importante no manejo reprodutivo equino em diversas situações, os principais indutores de ovulação utilizados são hCG e deslorelina. O objetivo do presente estudo foi comparar o perfil proteico do FF de éguas induzidas à ovulação com hCG ou com a associação de hCG e acetato de deslorelina. Foram utilizadas 14 éguas (3 a 12 anos). Quando detectado folículo ≥ 35mm e edema endometrial, a égua era submetida a um dos protocolos de indução: Grupo H 1000UI, IV, de hCG ou Grupo HG 1000UI hCG, IV, + 1,5mg de acetato de deslorelina, IM. No ciclo subsequente a égua era submetida ao outro protocolo. As amostras foram coletadas por aspiração transvaginal, 32 h após a indução e submetidas à quantificação de proteínas pelo método de Bradford. Realizou-se eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida 12,5% e corados com Comassie G250, digitalizados e analisados usando PDQuest v. 8.0.1. Os spots com diferença significativa na abundância relativa foram recortados, submetidos à digestão em tripsina e a espectrometria de massa. Neste trabalho, a concentração de proteína total no FF das éguas do Grupo HG foram maiores (73,07 ± 6,42 mg/ml) do que as induzidas somente com hCG (63,97 ± 6,97 mg/ml). A análise comparativa mostrou diferença significativa na abundância de 5 spots entre os grupos. Duas Alfa-1-antiproteinase 2 (A1AT2), a Serotransferrina (TF) e a Antitrombina III (ATIII) apresentaram menor expressão relativa no Grupo HG e a Haptoglobina (HP) demonstrou maior abundância no mesmo grupo. A menor expressão da A1AT2 no momento final de maturação folicular que antecede a ovulação provavelmente está relacionada à necessidade de diminuição da ação inibitória sobre atividade proteolítica, permitindo um fino ajuste que controla a degradação da matriz extracelular, inflamação e cascata de coagulação (BIANCH, J Prot, 90:61, 2013). ATIII também é uma proteína inibidora de endopeptidases do tipo serina. A última proteína que foi menos expressa no grupo HG foi a TF. Aumento dos níveis celulares de ferro estimulam a expressão de algumas MMP's que degradam a ECM. Há relatos do aumento de transferrina nas células da granulosa e oócito de folículos em estágios mais avançados de maturação, o que poderia explicar a diminuição de transferrina no FF. A ultima proteína identifica foi a HP, com abundância aumentada no grupo HG e exerce ação anti-inflamatória, devido à inibição do dano oxidativo. Estas proteínas provavelmente estão relacionadas aos eventos finais de maturação oocitária/folicular, que desencadeiam a ovulação e posterior luteinização.

SBTE 286 Biotecnologias de suporte: criopreservacão, criobiologia, biologia molecular e "ômicas"

Avaliação da taxa de embriões produzidos *in vitro*, e reexpansão pós descongelamento, com dois diferentes meios de cultivo

Luiz Gustavo Araujo Oliveira; Luis Mauro Valadao Queiroz; Arthur Levantezi Santos; Mauricio Antonio S. Peixer
Bio Biotecnologia Animal.

Palavras-chave: Criopreservação; vitrificação; criobiologia; criotolerância

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) está disseminada no Brasil, tanto na pecuária bovina de leite como na de corte. No entanto, a criopreservação de embriões FIV permanece como um grande passo a ser dado para o emprego da FIV em uma escala ainda maior. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da suplementação proteica com soro fetal bovino (SFB) e albumina sérica bovina (BSA) durante o cultivo *in vitro* (CIV) no desenvolvimento embrionário e na criotolerância. Os ovócitos selecionados foram maturados *in vitro* por 24 horas e, posteriormente, fertilizados *in vitro* por mais 24 horas. Os zigotos foram divididos em 2 grupos de cultivo *in vitro*, Grupo Controle, cujo cultivo foi feito em meio CIV + 10% SFB, e o Grupo BSA-SFB, cuja suplementação proteica foi 0.6% BSA, durante as primeiras 72 horas, e 10% SFB, nos 4 dias subsequentes. A taxa de desenvolvimento embrionário foi avaliada em D.7, quando foram vitrificados os embriões classificados como blastocisto expandido (Bx). Para a análise da criotolerância, os embriões foram desvitrificados, cultivados *in vitro* por 48 horas em meio CIV acrescido de 10% SFB. Após 48 horas de CIV as taxas de reexpansão e eclosão embrionária foram avaliadas. O Grupo BSA-SFB apresentou uma taxa de produção de 23%a (146/637), menor do que o Grupo Controle, 34%b (236/700),($p \leq 0,01$). Entretanto, o Grupo BSA-SFB apresentou uma maior criotolerância, 88%a (63/72), comparado ao Grupo Controle, 77%b (66/86), ($p \leq 0,05$). Portanto, os embriões do Grupo BSA-SFB, embora tenham uma taxa de desenvolvimento embrionário inferior aos embriões do Grupo Controle, apresentam uma maior taxa de sobrevivência embrionária pós-descongelamento.

SBTE 287 Biotecnologias de suporte: criopreservacão, criobiologia, biologia molecular e "ômicas"

Avaliação de kits de amplificação de DNA para análise genômica de biópsias de células oriundas de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

Andrea Cristina Basso[1]; Bruno Valente Sanches[1]; Marc Masserati[2]; Mayra Fernanda Alves[1]; Daniel Robert Arnold[1]; Flavia Lombardi Lopes[3]
1.In Vitro Brasil Sa; 2.In Vitro Brasil Clonagem Animal Sa; 3.Faculdade De Medicina Veterinária De Araçatuba.

Palavras-chave: Genômica; biopsia; embrião

Produtores de gado estão continuamente buscando maneiras de aumentar o número de animais geneticamente superiores e, ao mesmo tempo, reduzir os custos de produção. Um perfil genético dos embriões produzidos *in vitro* para características de importância econômica, antes da transferência, beneficiaria enormemente seleção genética e reduziria custos. Esta técnica envolve a remoção de algumas células do embrião em crescimento na fase de mórula ou de blastocisto. As limitações da análise do genoma inteiro (WGA) das biópsias de embriões é equilibrar o número de células que podem ser removidas sem comprometer o embrião e a obtenção de quantidades suficientes de DNA. Com o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular, tais como a amplificação do DNA, estas limitações não são mais um problema. Os objetivos deste projeto foram avaliar: 1) os efeitos da biópsia e vitrificação em esquema fatorial 2x2 sobre a reexpansão do embrião, e 2) a "call rate" de DNA em biópsias de embriões que foram amplificados com kits de amplificação disponíveis comercialmente. No experimento 1, embriões em D7 não foram manipulados (C) ou foram submetidos à biópsia de células (B), onde cerca de 10 células da camada de trofoblasto foram removidas. Ambos os grupos foram colocados novamente em cultura durante 18 horas (fresco; C/F e biopsiados/Fresco; B/F) ou foram vitrificados (C/V e B/V). Embriões vitrificados, em seguida, foram descongelados e colocados em cultura durante 24 horas. A taxa de re-expansão foi avaliada em todos os grupos. No experimento 2, o DNA de embriões biopsiados foi amplificado por GenomePlex Single Cell WGA (Sigma), ou Repli-g Single Cell (Qiagen) ou Illustra Single Cell GenomiPhi (GE Healthcare) kits. A análise do genoma foi realizada no Geneseek Genomic Profiler LD (GGP-LD) para Indicus-35.000 SNP Platform (Neogen). One-way ANOVA foi utilizado para determinar a significância ($P<0,05$) para re-expansão e o "call rate" e as diferenças de médias foram determinadas por Tukey`s. A re-expansão dos embriões B/F (93,3 + 4,6%) não foi diferente do grupo C/F (100%). A re-expansão de embriões do grupo B/V (75,0 + 6,7%) foi menor do que C/F, os embriões C/V tiveram as mais baixas taxas de re-expansão (52.2+ 15,5%). Houve uma diferença significativa no "call rate" para DNA amplificado utilizando o Repli-g (86,6 + 5,2%) e GenomiPhi (59,9 + 7,8%; $P <0,05$) kits. O kit GenomePlex (82,7 + 2,1%) não foi diferente dos outros kits. Estes resultados sugerem que a análise do genoma de biópsias de embriões é possível com a amplificação do DNA, sem comprometer a sobrevivência dos embriões.

SBTE 288 Biotecnologias de suporte: criopreservacão, criobiologia, biologia molecular e "ômicas"

Avaliação *in vitro* da indução da hiperativação com procaína e cálcio ionóforo do espermatozóide equino criopreservado

Monique De Albuquerque Lagares[1]; Hariany Seabra Martins[2]; Fabiola De Oliveira Paes Leme[2]; Rubens Stahlberg[3]
1.Universidade Federal De Minas Gerais; 2.UFMG; 3.PUC-MINAS.

Palavras-chave: Congelamento; sêmen; capacitação espermática

O presente trabalho teve como objetivo testar 2 protocolos *in vitro* de hiperativação do espermatozóide equino criopreservado. Após o descongelamento do sêmen, os espermatozóides foram selecionados pelo o método swim-up e distribuídos em 3 alíquotas de acordo com os tratamentos: T1) Controle: Meio Whitten capacitante (MWc), T2) Procaína: T1 + 5mM cloridrato de procaína (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) e T3) Cálcio ionóforo: T1 + 5µM cálcio ionóforo A23187 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Após 10 min. a 37°C, as amostras foram diluídas para 10x106 esp./mL para análise da motilidade espermática computadorizada (CASA). Para o ensaio de ligação espermática a zona pelúcida (ZBA) bovina, os oócitos, obtidos de aspiração folicular ovariana de bovinos abatidos em frigorífico, foram armazenados em solução hiperosmótica (Yanagimachi et al., Fertil Steril, v.31, n.5, p.562-574, 1979). Os espermatozóides foram distribuídos nos 3 tratamentos descritos com 35µg/mL do corante Hoescht 33342 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) e ressuspendidos a 2x106 esp./mL com MWc. Os oócitos foram incubados a 38,5°C com 5% de CO_2 por 1 hora e distribuídos 5/gota sob óleo mineral (Coutinho da Silva et al., Reproduction, v. 143, p. 577–585, 2012). Após 2 horas de co-cultivo, o número de espermatozóides ligados a ZP foi determinado com microscopia de epifluorescência. Foi utilizado o delineamento experimental em blocos casualizados. As médias foram comparadas pela ANOVA e teste de Tukey para o número de espermatozóides ligados à zona pelúcida (ZBA), ANOVA, teste de Tukey e Scott-Knott para as características espermáticas avaliadas pelo CASA: VCL, VSL, VAP, LIN, STR e teste de Friedman para ALH e BCF. Os dados foram analisados com o programa SAS (Statistical Analysis System), sendo a probabilidade de $P<0.05$ considerada significativa. A indução da hiperativação pelo cálcio ionóforo mostrou um menor número de espermatozóides ligados a ZP (1,9±2,1) comparados a Procaína (5,9±3,7) e ao controle (5,7±3,6, $P<0,05$). Os espermatozóides hiperativados com procaína obtiveram os menores valores de VSL, VAP e LIN, enquanto não diferiram do controle e dos hiperativados com o cálcio ionóforo para ALH e BCF ($P>0,05$). Conclui-se que o espermatozóide equino criopreservado respondeu melhor a indução com a procaína do que com o cálcio ionóforo, sendo portanto o primeiro indutor de hiperativação espermática mais indicado para se estudar protocolos de FIV equina com sêmen congelado.

SBTE 289 Biotecnologias de suporte: criopreservacão, criobiologia, biologia molecular e "ômicas"

Caracterização lipídica por MALDI-MS de embriões bovinos produzidos *in vitro* com diferentes cinéticas de desenvolvimento

Kelly Annes[1]; Mateus José Sudano[2]; Alessandra Tata[3]; Vanessa Gonçalves Santos[3]; Katia Roberta A. Belaz[3]; Roberta Ferreira Leite[1]; Marcos Nogueira Eberlin[3]; Marcella Pecora Milazzotto[1]
1.Universidade Federal Do Abc; 2.Universidade Federal Do Pampa; 3.Universidade Estadual De Campinas.

Palavras-chave: Lipídeos; embrião bovino; espectrometria de massa

Estudos em embriões têm demonstrado que diferenças morfológicas relacionadas as primeiras divisões celulares e sua cinética (rápido e lento), parecem ser relevantes para a viabilidade do embrião (Meseguer,M, Hum.Reprod, 26, 2658-71, 2011; Lundin,K, Hum.Reprod, 16, 2652-2657, 2001). A viabilidade embrionária também pode ser severamente comprometida por acúmulo de lipídios em embriões PIV e pode até mesmo prejudicar aplicações comerciais, como a criopreservação (Abe,H, Mol.Reprod.Dev, 61, 57-66, 2002). Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar a relação entre cinética de desenvolvimento e perfil lipídico em embriões bovinos. Para tal, embriões PIV foram produzidos e, 18 horas pós inseminação (hpi), os presumíveis zigotos foram individualmente cultivados em meio sequencial (estabelecido em estudos prévios). Primeiramente, foram cultivados por 22h em KSOM (Millipore) [suplementado com 10% de FCS, 0,25mL/mL de gentamicina e 4.5µL/mL de aminoácidos não essenciais], e classificados como embriões rápidos (F – 4 ou mais células) ou lentos (S - 2-3 células). O meio foi substituído por SOF [contendo 5% de FCS, 10ul/ml de aminoácidos não essenciais e 20uL/mL aminoácidos essenciais] e os embriões permaneceram em CIV até a fase de blastocisto (168hpi). Um grupo de embriões produzidos *in vivo* foi adicionado ao estágio de blastocisto (VBL). A caracterização lipídica, por MALDI-MS, foi realizada às 40hpi (FCL vs SCL), 96hpi (FMO vs SMO) e 168hpi (FBL vs SBL vs VBL). Os dados foram submetidos à análise estatística multivariada, pelo método de Mínimos Quadrados - Análise Discriminante (PLS-DA), usando o website MetaboAnalyst 3.0. Os íons evidenciados foram submetidos à ANOVA com posterior teste Tukey (software GraphPad Prism 5 Inc), para mostrar suas relevâncias nos grupos estudados. Os grupos F e S apresentaram diferentes abundâncias relativas de esfingomielinas (SM) e fosfatidilcolinas (PC) de membrana às 40hpi (de *m/z*: 725.5, 732.6, 758.6, 788.6, 808.6, com $p<0.05$) e 96hpi (de *m/z*: 706.5, 725.5, 782.6, com $p<0,05$). Em relação ao estágio de blastocisto, o grupo SBL apresentou maior abundância relativa de espécies de SM e PC semelhantes ao grupo VBL (de *m/z* 703.5, 760.6, 784.6 e 808.6, com $p> 0,05$). Apesar disso, os grupos SBL e FBL ainda apresentaram alguma semelhança, o que pode ser resultado da exposição ao mesmo ambiente *in vitro* (SM de *m/z*: 703.5 e PC de m/z 734.6, às 96hpi. PC de *m/z*: 786.6 e 808.6, às 168hpi, $p>0.05$). Em adição à função estrutural de membrana, estas classes lipídicas têm um papel importante para sinalização celular relacionada a estresse, prenhez e criopreservação. Os dados obtidos nas classes de PC e SM, apontam uma maior semelhança entre SBL e VBL.
Agradecimentos: FAPESP (2013/13199-0) e UFABC

SBTE 290 Biotecnologias de suporte: criopreservacão, criobiologia, biologia molecular e "ômicas"

Características da h3k4me3 em embriões bovinos produzidos *in vivo* com sêmen sexado e submetidos à criopreservação

Fabiana De Andrade Melo Sterza[1]; Mirela Brochado Souza[1]; Jonathan Vinivicus Dos Santos[1]; Jair Sabio De Oliveira Junior[1]; Ralf Poehland[2]; Ana Caroline Bini De Lima[1]
1.Universidade Estadual Do Mato Grosso Sul; 2.Leibniz Institute For Farm Animal Biology (Fbn).

Palavras-chave: Epigenética; metilação de histonas; sexagem do semen

A criopreservação de embriões produzidos *in vivo* é considerada eficiente e o conhecimento de sua biologia básica pode ser utilizado como parâmetro para melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na baixa eficiência da criopreservação dos embriões produzidos *in vitro*. O objetivo desse estudo foi avaliar as modificações da trimetilação da lisina 4 na Histona 3 (H3K4me3) em embriões bovinos produzidos *in vivo* com sêmen sexado e submetidos a criopreservação. Vacas da raça Girolando (n=5) foram superovuladas e inseminadas com sêmen sexado ou convencional. Após a coleta de embrião (D7), parte dos embriões coletados foram armazenados em Paraformaldeído logo após a coleta, e outra parte armazenada no mesmo meio logo após a criopreservação/descongelamento. Todos os embriões (frescos/sêmen convencional; frescos/sêmen sexado; criopreservados/sêmen convencional e criopreservados/sêmen sexado) foram avaliados por imunofluorescência sob microscopia confocal, para identificação da H3K4me3. Das 190 estruturas coletadas, 100 foram produzidas com sêmen convencional e 90 com sêmen sexado. O uso do sêmen convencional proporcionou a produção de embriões viáveis (72%), sendo a maioria (52,77%) em fases mais avançadas do desenvolvimento (blastocistos expandidos; 52,77%). Por outro lado, os embriões produzidos com sêmen sexado apresentaram menores taxas de viabilidade (36,7%) e a maioria foi coletada em estágios mais precoces de desenvolvimento (Mórula e Blastocisto; 42,42%; $p<0,05$). Embriões na fase de mórula (209,26±10,95), independente da criopreservação ou do uso de sêmen sexado, apresentaram maior intensidade do sinal da trimetilação da H3K4 quando comparada com o embrioblasto de blastocistos (160,35±10,52) ($p<0,05$). Esses são os primeiros resultados que caracterizam o padrão da trimetilação da Histona 3 na Lisina 4 de embriões bovinos produzidos *in vivo*. Tanto embriões frescos como criopreservados, produzidos com sêmen convencional ou sexado, apresentaram o mesmo padrão da trimetilação da H3K4, no entanto em mórulas essa característica foi mais acentuada.

SBTE 291 Biotecnologias de suporte: criopreservacão, criobiologia, biologia molecular e "ômicas"

Características da trimetilação da lisina 4 da histona 3 em oócitos bovinos submetidos a maturação *in vitro* e criopreservação - resultados preliminares

Mariane Gabriela Cesar Ribeiro Ferreira[1]; Mirela Brochado Souza[1]; José Felipe Warmling Sprícigo[2]; Jonathan Vinivicus Dos Santos[1]; Ralf Poehland[3]; Margot Alves Nunes Dode[2]; Fabiana De Andrade Melo Sterza[1]
1.Universidade Estadual De Mato Grosso Do Sul; 2.EMBRAPA; 3.Leibniz Institute For Farm Aninal Biology.

Palavras-chave: Epigenética; cryotop; H3K4

Já foi relatado que oócitos imaturos são mais sensíveis à vitrificação que os maduros. Fatores como a maturação podem alterar o padrão de metilação do DNA e de histonas, comprometendo o desenvolvimento embrionário. Nesse sentido, acredita-se que a criopreservação de oócitos possa ser influenciada por alterações epigenéticas. Logo, o objetivo do trabalho foi caracterizar o padrão da H3K4 trimetilada (H3K4me3) em oócitos maduros e imaturos, antes e após a vitrificação. Oócitos foram obtidos por meio da punção folicular de ovários bovinos provenientes de abatedouro, posteriormente rastreados e classificados de acordo com sua morfologia e então, divididos em quatro grupos: grupo 1 = imaturo fresco (n=15); grupo 2= imaturo criopreservado (n=15); grupo 3= maduro fresco (n=15); grupo 4 maduro criopreservado (n=15).Os grupos 4 e 3 foram maturados por 24 horas em estufa (5% CO_2; 38,5°C). Os grupos 2 e 4 foram vitrificados pelo método cryotop. Todos os grupos foram acondicionados em PAF 3% a 4 ºC Para a investigação da H3K4me3, os oócitos foram expostos ao anticorpo primário policlonal contra H3K4me3 (CellSignaling®; 1:1000), e ao anticorpo secundário (anti-Rabbit-Alexa 647; Invitrogen A21245; 1:200), e então submetidos a coloração do núcleo (SYBR Green, Molecular Probes, Goettingen, Germany; 1:500). Por fim, os oócitos foram avaliados sob microscopia confocal. A intensidade do sinal foi analisada com auxílio do programa ImageJ. Os dados foram analisados por ANOVA (fatorial) e quando necessário realizado o teste de Tukey a 5% de probabilidade (Programa R). Os oócitos maduros apresentaram maior intensidade de sinal (193,43 pixels) que os imaturos (149,00 pixels) ($p<0,05$), diferente do esperado, já que a transcrição nesse é período é conhecidamente reduzida e suportada pelo fato de que também a metilação do DNA é alta em oócitos maduros. Já os oócitos frescos, ou seja, que não foram submetidos a vitrificação, apresentaram maior intensidade de sinal (178,00 pixels) que os vitrificados (164,43 pixels) ($p<0,05$). Fato esperado, já que a criopreservação pode causar injúrias que culminem com a menor atividade transcricional o que pode interferir na qualidade dos oócitos e na sua capacidade de se tornar um embrião viável. Hipótese suportada pela menor taxa de desenvolvimento embrionário de oócitos criopreservados/descongelados. A interação das variáveis não foi observada ($p>0,05$). Conclui-se portanto, que a maturação e a criopreservação de oócitos bovinos interferem na trimetilação da H3K4.

SBTE 292 Biotecnologias de suporte: criopreservacão, criobiologia, biologia molecular e "ômicas"

Comparação das taxas de concepção após transferência de embriões *in vitro* frescos, vitrificados ou criopreservados para transferência direta

Perla Dagher Cassoli Fleury[1]; Bruno Valente Sanches[2]; Bruna Lopes Cardoso[2]; Andrea Cristina Basso[2]; Daniel Robert Arnold[2]; Juliana Hayashi Tannura[2]; Marcos Henrique Colombo Pereira[3]; Douglas Gaitkoski[2]; Marcelo Marcondes Seneda[4]
1.In Vitro Clonagem; 2.In Vitro Brasil S/A; 3.Fazenda Santa Luzia; 4.Universidade Estadual De Londrina.

Palavras-chave: Embriões FIV; criopreservação; transferência direta

Embora taxas de concepção acima de 30% tenham sido alcançadas recentemente na transferência (TE) de embriões produzidos *in vitro* (PIV) e vitrificados, o complexo processo de reaquecimento destes embriões após a vitrificação continua a representar um obstáculo ao uso comercial desta técnica, com pouca aplicabilidade em condições de campo. O objetivo deste trabalho foi comparar as taxas de concepção obtidas após a TE de embriões bovinos PIV frescos, vitrificados ou congelados para transferência direta na rotina comercial de uma grande propriedade leiteira. Oócitos (n=3171) recuperados por OPU de 120 fêmeas Girolando foram selecionados e submetidos à MIV por 24 h a 38,5 °C, com 5% CO_2 em ar e umidade saturada. A FIV foi realizada com sêmen sexado descongelado de 5 touros Holandeses. Após FIV, os prováveis zigotos foram desnudados e cultivados por sete dias nas mesmas condições de temperatura e umidade da MIV e da FIV, porém com 5% de CO_2 e 5% de O_2. Embriões grau I nos estágios de BL ou BX foram transferidos a fresco, vitrificados ou congelados para transferência direta (TD). Os embriões foram transferidos para receptoras previamente sincronizadas. As taxas de concepção aos 30 dias obtidas foram de 51.35% (133/259) nos embriões transferidos a fresco, de 34.62% (84/234) nos vitrificados e de 42.11% (96/228) nos embriões da transferência direta. As taxas de concepção foram analisadas pelo Binomial Logistic Regression of IBM SPSS e o nível de probabilidade de $p< 0.05$ foi considerado significante. Os índices obtidos com os embriões PIV vitrificados e com os da transferência direta não diferiram significativamente entre si, mas foram menores que os embriões transferidos à fresco. Porem, estes resultados indicam que a criopreservação dos embriões PIV proporciona resultados semelhantes aos obtidos após a transferência de embriões PIV frescos. Destacamos os aspectos positivos da possibilidade de criopreservação de embriões PIV com a praticidade da transferência direta.

SBTE 293 Biotecnologias de suporte: criopreservacão, criobiologia, biologia molecular e "ômicas"

Comparação entre o uso dos diluidores bioxcel® e tolera-d® sobre a taxa de aproveitamento dos ejaculados de touros de diferentes raças

Anelise Ribeiro Peres[1]; Erika Silva Carvalho Morani[2]; Marcelo Roncoletta[2]
1.FCAV-UNESP; 2.Top Bulls Semen Technology.

Palavras-chave: Sêmen; criopreservação; citometria de fluxo

A fertilidade masculina é sempre colocada à prova quando submete-se um reprodutor a coleta e criopreservação de sêmen. Existem vários fatores que interferem na manutenção da viabilidade espermática frente aos processos de criopreservação e descongelação do sêmen, sendo a qualidade de um diluidor de sêmen um deles. O objetivo deste trabalho foi comparar a utilização de dois diluidores sobre taxa de aproveitamento (sêmen recusado ou liberado para comercialização) dos ejaculados de touros. Utilizaram-se seis doadores bovinos, de três raças diferentes (03 Nelore, 01 Angus, e 02 Senepol). Os ejaculados foram coletados utilizando-se o método de colheita convencionalmente utilizado para cada indivíduo, e o sêmen in natura avaliado quanto a volume, turbilhonamento, motilidade/vigor e morfologia. O volume de cada ejaculado foi fracionado em 02 partes iguais, e uma das partes foi submetida à diluição com Tolera-D® (Inprenha, Jaboticabal, Brasil) e outra com Bioxcell (IMV, L'Aigle, França). A partir da diluição, as frações foram submetidas às curvas de resfriamento, período de equilíbrio e curva de congelação idênticos (procedimentos esses utilizados na rotina da empresa). A congelação foi realizada em palheta fina de 0,25mL. Uma amostragem aleatória de 04 palhetas de cada fração foi descongelada em água a 35ºC e submetida as avaliações subjetivas em microscopia de contraste de fase (motilidade/vigor à descongelação (MOT/V0h); motilidade/vigor após incubação a 37ºC por 3h (MOT/V3h); motilidade/vigor após incubação a 45ºC por 30 minutos (MOT/V30) e % de viáveis em citômetro de fluxo MUSE® (%VIACOUNT). O VIACOUNT foi padronizado seguindo protocolo recomendado pelo fabricante, com ajustes no fator de diluição (121 vezes) e 10.000 eventos considerados. O padrão aceitável para aprovação do sêmen congelado foi de MOT/V0h >40/4; MOT/V3h >20/2; MOT/V30 >20/2; % VIACOUNT >40%; Concentração >$20x10^6$sptz/dose, defeitos morfológicos totais <30% ou maiores <20%. A taxa de aproveitamento de ejaculados congelados com Tolera-D foi de 83% (100% no Nelore e no Angus e 50% de aproveitamento no Senepol). Já a taxa de aproveitamento de ejaculados congelados com Bioxcell foi de 67% (83% no Nelore, 0% no Angus e 50% no Senepol). Os resultados não demonstraram diferença estatística (comparação pelo teste t) quando comparados a taxa de aproveitamento de ejaculados industrializados frente ao diluidores utilizados (Bioxcell® ou Tolera- D®), todavia comprovou-se a particularidade de alguns indivíduos testados frente a diferentes diluidores. No geral, ambos os diluidores contem composição baseada em crioprotetores semelhantes (glicerol e lecitina de soja) e demonstraram boas taxas de aproveitamento de ejaculados.
Apoio: FAPESP/ PIPE, Inprenha Biotecnologia

SBTE 294 Biotecnologias de suporte: criopreservacão, criobiologia, biologia molecular e "ômicas"

Criopreservação de fibroblastos bovinos em palhetas após submissão á pressão negativa.

Luana Zanferari; Diana De Matia Liposki; Larissa G. Silva; Claudio F. Brogni; Joana Claudia Mezzalira; Lain Uriel Ohlweiler; Alceu Mezzalira
UDESC.

Palavras-chave: Estresse controlado; criopreservação; células somáticas

A criopreservação de células somáticas vem se destacando não apenas como aliada na preservação de germoplasma, mas também na manutenção de genótipos utilizados para a indução de pluripotência, formação de linhagens e clonagem por transferência nuclear. O estudo dos efeitos do estresse controlado em gametas ou células somáticas tem demonstrado que, além de proporcionar maior sobrevivência em condições experimentais, outros parâmetros podem ser influenciados, como por exemplo, o padrão de crescimento em cultivo. Para isto, fibroblastos bovinos de primeira passagem, obtidos por procedimento padrão de explantação de cartilagem, foram distribuídos uniformemente em quatro grupos experimentais conforme descrito a seguir: Fibroblastos em cultivo foram submetidos por 4 minutos à pressão negativa de 500 mBar, imediatamente (PN0h) ou 3horas antes (PN3h) do congelamento, realizado em solução padrão (10% DMSO em D-MEM). Após a tripsinização, as células eram envasadas em uma concentração de 1 x 106 células/mL, em palhetas de 0,25 mL, num volume total de 200 µL. As palhetas eram seladas e estabilizadas em geladeira (5-7 ˚C) por 30 minutos, expostas ao vapor de nitrogênio (4 cm acima da superfície) por 5 minutos, e então mergulhadas no mesmo. O descongelamento era realizado em banho-maria a 36°C por 20 segundos. Fibroblastos não submetidos à pressão foram utilizados como controles congelado (CC) e fresco (FC). Foram avaliados a viabilidade pós-congelamento, e posteriormente o índice de replicação, baseado no tempo de duplicação da população (PDT) celular, com intervalos de 24h e duração de 8 dias. A cada avaliação, um poço de cada grupo era tripsinizado e o número de células viáveis era determinado em câmara hemocitométrica, após a coloração com Azul de Trypan. O PDT foi determinado utilizando-se o algoritmo disponível online (http://www.doubling-time.com): TD = t x lg2/(lgNt – lgN0). Os dados foram submetidos à ANOVA e teste T, com 5% de significância. A sobrevivência celular média dos grupos CC (89,8%) e PN0h (88,1%) foram superiores ao grupo PN3h (68,7%). O tempo de PDT foi semelhante nos grupos FC (27,5±0,35 h); CC (30,1±2,3 h) e PN0h (32,4±1,6 h), havendo uma tendência (P=0,06) de aumento do tempo de PDT no grupo PN3h (34,8±2,3 h), em relação ao CF. As palhetas plásticas se mostraram adequadas para o congelamento de fibroblastos bovinos, não sendo observados efeitos negativos da submissão à pressão negativa imediatamente antes do congelamento. O cultivo por 3 h após PN reduz o ritmo de crescimento de fibroblastos após o descongelamento. Novos estudos devem ser conduzidos para avaliar se o tratamento por pressão negativa afeta o padrão de senescência ou a viabilidade de embriões clones produzidos a partir de células tratadas.

SBTE 295 Biotecnologias de suporte: criopreservacão, criobiologia, biologia molecular e "ômicas"

Dinâmica lipídica no desenvolvimento embrionário inicial de bovinos

Mateus José Sudano[1]; Tatiana Silva Rascado[2]; Alessandra Tata[3]; Katia Roberta A. Belaz[3]; Vanessa Gonçalves Santos[3]; Roniele Santana Valente[1]; Fernando Silveira Mesquita[1]; Christina Ramires Ferreira[3]; Marcos Nogueira Eberlin[3]; Fernanda Cruz Landim Alvarenga[2]
1.Universidade Federal Do Pampa; 2.FMVZ-UNESP; 3.Laboratório Thomson De Espectrometria De Masas, UNICAMP.

Palavras-chave: Lipidômica; período pré-implantacional; desenvolvimento embrionário inicial

O desenvolvimento embrionário pré-implantacional de mamíferos é complexo, conservador e um processo bem orquestrado envolvendo mudanças moleculares e estruturais dinâmicas. O entendimento da flutuação do perfil lipídico de membrana durante este período é fundamental para acessar os mecanismos celulares e moleculares que governam a embriogênese. O completo entendimento das assinaturas lipídicas do desenvolvimento embrionário inicial é, entretanto, ainda desconhecido. O objetivo primário do presente trabalho foi, portanto, monitorar as mudanças dinâmicas dos perfis lipídicos estágio-específicos durante o desenvolvimento embrionário inicial de bovinos. Para tanto, a MALDI-MS foi utilizada e as mudanças observadas foram associadas com a quantidade de gotas lipídicas citoplasmáticas. Oócitos imaturos (-24h após a inseminação [hpi]) foram recuperados de ovários de abatedouro, e embriões de 2 células (32-40 hpi), 8-16 células (72 hpi), mórula (120 hpi) e blastocisto (168 hpi) foram produzidos *in vitro* utilizando dois meios de cultivo diferentes (SOFaaci suplementado com 2,5% de soro fetal bovino e SOF-BE1 livre de soro). Para análise estatística, modelos uni e multivariados foram utilizados. O conteúdo lipídico, monitorado pela coloração lipídica (n=5-9 por estágio), aumentou ($P<0,05$) no estágio de mórula seguido de uma forte queda ($P<0,05$) no estágio de blastocisto ($58,4\pm10,5^{ac}$, $62,5\pm9,4^{ac}$, $85,9\pm8,2^{a}$, $148,3\pm7,4^{b}$, $37,4\pm9,9^{c}$; respectivamente para oócito imaturo, 2 células, 8-16 células, mórula e blastocisto). A quantidade de gotas lipídicas citoplasmáticas foi aumentada ($P<0,05$) pelo meio SOFaaci nos estágios de mórula (162.6±11.3 vs 137.1±9.2) e blastocisto (49.9±9.9 vs 20.7±9.9) quando comparada ao meio SOF-BE1. Diferenças nos perfis dos fosfolipídios monitorados pela MALDI-MS (n=5-9 per stage) foram acessadas por análise multivariada. Mudanças características na dinâmica dos perfis dos fosfolipídios (fosfatidilcolinas, esfingomielinas, e fosfatidiletanolaminas) foram observadas durante o desenvolvimento embrionário inicial e relacionadas com alterações significativas do nível de instauração, do tamanho da cadeia carbônica, e a composição da classe lipídica. O presente estudo fornece uma análise compreensiva das assinaturas do lipidoma estágio-específica durante o desenvolvimento embrionário inicial de bovinos, que podem ser úteis para acessar o papel de espécies lipídicas em importantes eventos da embriogênese assim como melhorar os resultados das técnicas de reprodução assistida tanto na espécie bovina como humana.
Agradecimentos: CNPq; FAPESP; e FAPERGS

SBTE 296 Biotecnologias de suporte: criopreservacão, criobiologia, biologia molecular e "ômicas"

Efeito da adição de plasma seminal de reprodutores ovinos inteiros e vasectomizados ao sêmen após a coleta.

Thiago Antonio De Souza Nascimento Silva[1]; Vladinis Oliveira Miranda[1]; João Ricardo Scaliante[2]; Mauricio Machaim Franco[3]; Bianca Damiani Marques Silva[3]; Alexandre Floriani Ramos[3]; Jairo Pereira Neves[1]
1.UNB; 2.UFU; 3.EMBRAPA.

Palavras-chave: Adição; plasma seminal; ovino

O plasma seminal pode exercer efeito protetor quando adicionado ao sêmen descongelado. Pouco se sabe sobre seu efeito na adição ao sêmen logo após a coleta e se o plasma seminal de carneiros de alta congelabilidade de sêmen coletados de animais inteiros e vasectomizados, pode incrementar o sêmen criopreservado de carneiros de baixa congelabilidade de sêmen. O objetivo deste trabalho foi avaliar a adição do plasma seminal coletado de carneiros inteiros (INT) e vasectomizados (VAS) de alta congelabilidade de sêmen, no sêmen de carneiros de baixa congelabilidade de sêmen, antes do processo de criopreservação. Foram utilizados 4 carneiros de baixa congelabilidade de sêmen como doadores de sêmen e 2 carneiros com sêmen de alta congelabilidade como doadores de plasma seminal. Utilizaram-se três tratamentos: VAS – Adição de 30% de plasma seminal de reprodutor vasectomizado no meio de pré-diluição; INT – Adição de 30% de plasma seminal de reprodutores inteiros no meio de pré-diluição; e controle (CONT) – sem adição de plasma seminal. Avaliou-se a motilidade subjetiva, motilidade total e motilidade progressiva pelo CASA e integridade de membrana após a descongelação (HORA 0) e após o teste de termo resistência (TTR) por 4 horas (HORA 4). Para análise estatística calculando-se media e desvio-padrão dos parâmetros analisados, seguida de análise de variância utilizando-se o procedimento GLIMMIX, sendo a comparação das medias feita pelo teste de Tukey corrigido para comparações múltiplas. Foi utilizado o programa SAS enterprise 5.1. Após a descongelação (HORA 0) os parâmetros motilidade subjetiva, motilidade total, motilidade progressiva e integridade de membrana no tratamento VAS (59.72±3.4, 60.08±2.6, 40.94±3.4, 39.52±2.7) e no tratamento INT (49.84±2.9, 49.74±3.6, 31.79±3.4, 30.95±2.6) foram maiores (P<0,05) do que no tratamento CONT (37.90±2.5, 36.58±3.5, 22.12±1.9, 21.18±2.7). Com relação aos parâmetros após o TTR (HORA 4) a motilidade subjetiva no tratamento VAS (50.78±3.6) e no tratamento INT (40.02±4.0) foram maiores (P<0,05) do que o tratamento CONT (27.88±2.6). Já para os parâmetros de motilidade total, motilidade progressiva e integridade de membrana o tratamento VAS (51.92±3.5, 35.46±3.4, 38.78±1.4) foi maior (P<0,05) que o tratamento INT (38.86±2.9, 24.36±3.5, 24.11±2.0) e o tratamento CONT (28.91±2.2, 12.19±3.0, 11.02±1.6) e o tratamento INT foi maior (P<0,05) que o tratamento CONT. A adição de plasma seminal, antes do processo de criopreservação, pode melhorar a resistência dos danos causados no sêmen ovino criopreservado, tendo o plasma seminal coletado de animais vasectomizados melhores resultados.

SBTE 297 Biotecnologias de suporte: criopreservacão, criobiologia, biologia molecular e "ômicas"

Efeito da adição de ácido linoléico conjugado ao meio de cultivo *in vitro* na viabilidade após a transferência dos embriões bovinos vitrificados

Ana Carolina Leite; Virgílio Barbosa Andrade; Eliane Beatriz Magalhães; Álan Maia Borges
UFMG.

Palavras-chave: Vitrificação; ácido linoléico conjugado; transferência de embrião

Embriões produzidos *in vitro* apresentam baixa criotolerância devido à elevada concentração de lipídios citoplasmáticos (Abe et al., J. Reprod. Dev., v.49, p.193, 2003). O ácido linoléico conjugado trans-10, cis-12 (CLA) diminui a lipogênese nas células, melhorando a qualidade do embrião e, possivelmente, diminuindo sua sensibilidade à criopreservação (Mitchell e McLeod, Biochem. Cell Biol., v.86, p.293, 2008). Foi avaliado o efeito da adição de CLA ao meio de cultivo *in vitro* na viabilidade após a transferência dos embriões bovinos vitrificados. Foram utilizados três meios de cultivo: Controle (n=340 oócitos): meio SOF acrescido de BSA e SFB, sem adição de CLA; SFB+CLA (n=359 oócitos): meio SOF acrescido de BSA, SFB e CLA; CLA (n=339 oócitos): meio SOF acrescido de BSA e CLA, sem adição de SFB. Os blastocistos foram submetidos à vitrificação pelo método de Open Pulled Straw, para posterior aquecimento. O estro das receptoras foi sincronizado usando protocolo com dispositivo intravaginal de progesterona (1,9g), associado à benzoato de estradiol (2,0mg) e cipionato de estradiol (1mg), eCG (250UI) e análogo da PF2α (0,05mg de cloprostenol sódico). Foram transferidos um ou dois embriões para o corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo (CL): T1 [receptoras que receberam um blastocisto (n=17 embriões, sendo Controle=5, SFB+CLA=6 e CLA=6)]; T2 [receptoras que receberam dois blastocistos, (n= 54 embriões, sendo Controle=18, SFB+CLA=14 e CLA=22)]. No D7 após o estro induzido as receptoras foram avaliadas para a confirmação do CL. 58% dos animais responderam de forma exacerbada ao protocolo de indução de estro, apresentando múltiplas ovulações (2 a 7 CLs) e crescimento folicular (folículos de até 1,9cm e folículos maiores que 2,0cm). A transferência de embrião foi realizada somente em animais com CL e folículos menores que 1,9cm. Para avaliar a viabilidade, embriões vitrificados foram aquecidos (Controle=27; SFB+CLA=30; CLA=17) e cultivados *in vitro* para verificar a reexpansão e eclosão após 24, 48 e 72 horas de cultivo. Não houve diferença na produção de blastocistos em relação ao total de oócitos submetidos à fecundação (37,1% para Controle; 35,4% para SFB+CLA; e 28,3% para CLA) (P>0,05). Apenas uma gestação foi verificada nos diagnósticos precoce e confirmatório, resultado da transferência de um embrião do grupo Controle. As taxas de gestação para os grupos Controle, SFB+CLA e CLA foram, respectivamente, de 4,35% (1/23), 0% (0/20) e 0% (0/28). Quanto à reexpansão, o tratamento CLA (47,1%) apresentou taxa inferior (P<0,05) ao Controle (70,4%) e superior ao SFB+CLA (43,3%). Os três tratamentos apresentaram taxas de eclosão semelhantes (P>0,05), observando-se 42,1%; 23,1%; 25% para os grupos Controle; SFB+CLA; CLA, respectivamente. Novas transferências embrionárias deverão ser realizadas para se avaliar o efeito do CLA na sobrevivência embrionária *in vivo*, referendando a taxa de reexpansão e de eclosão *in vitro*.

SBTE 298 Biotecnologias de suporte: criopreservacão, criobiologia, biologia molecular e "ômicas"

Efeito da biópsia manual em embriões bovinos no sexto dia após a fecundação *in vitro*

Carolina Capobiango Romano Quintão; Eliza Diniz De Souza; Clara Slade Oliveira; Célio Freitas; Juliane Ariane Da Silva Oliveira; Luiz Sérgio De Almeida Camargo
Embrapa Gado De Leite.

Palavras-chave: Biópsia; embriões; *in vitro*

A seleção genômica é uma ferramenta útil para o melhoramento animal e que pode ser aplicada em embriões produzidos *in vitro* por meio da análise do material retirado por biópsias. Contudo, é necessário avaliar a viabilidade dos embriões biopsiados em estágios precoces. O objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto da técnica de biópsia em embriões com seis dias após a fecundação *in vitro* sobre o desenvolvimento e qualidade embrionária, sem o uso de equipamentos de micromanipulação. Oócitos obtidos de ovários de abatedouro foram maturados e fecundados *in vitro*. Após final da FIV, os possíveis zigotos foram desnudados e cultivados em CR2aa suplementado com 2,5% SFB a 38,5ºC com 5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2 e umidade saturada. No sexto dia pós-fecundação (D6) os embriões (mórulas e blastocistos iniciais) foram distribuídos, aleatoriamente, em dois grupos: G1-controle (n=61) e G2-biopsia (n=64). Os embriões foram seccionados manualmente com microlâminas (Bioniche, Canadá) em gotas de 20 □L de meio TALP-HEPES com 2% SFB sob micróscopio estereoscópio e, em seguida, voltaram a condição de cultivo anterior, porém em gotas individuais de 20□L de meio CR2aa. Foi avaliada a taxa de blastocistos presentes nos dias sete (D7) e oito (D8) pós-fecundação (24h e 48h após a biopsia, respetivamente). No D8, os blastocistos de ambos os grupos foram fixados e avaliados pela técnica de TUNEL (Promega, EUA) quanto ao número de células totais e o número de células apoptóticas e então calculado o índice apoptótico. O desenvolvimento embrionário (taxa de blastocisto no D7 e D8) foi analisado pelo teste do Qui-quadrado. O número total de células, de células apotóticas e índice apoptótico foram analisados pelo teste de t-Student e seus valores são mostrados como média+EPM. Quando somente embriões biopsiados em estágio de blastocisto no D6 foram analisados, a taxa de blastocistos no G2 foi menor ($P<0,01$) tanto no D7 (43,5%) como no D8 (30,7%) em relação ao G1 (78,7% e 67,8% em D7 e D8, respectivamente). A análise conjunta das biópsias em mórulas e blastocistos mostrou haver efeito significativo na formação de blastocistos somente no D8 (78,5% vs 43,5% para G1 e G2, respectivamente). Não houve diferença ($P>0,05$) no número de células totais entre G1 e G2. No entanto, o número de células apoptóticas foi maior ($P<0,05$) em G1 do que em G2 (29,4±4,5 vs 10,0±1,5, respectivamente). O mesmo ocorreu para o índice apoptótico (27,5±3,9 vs 9,7±1,3, para G1 e G2, respectivamente, $P<0,01$). Conclui-se que a biópsia manual em embriões no D6 interfere no desenvolvimento embrionário, mas não afeta o número total de células nos blastocistos em D8, com 48h de cultivo *in vitro* após biópsia. O menor índice apoptótico observado em embriões biopsiados pode ser devido a retirada inadvertida de parte da massa celular interna durante a biópsia, região que apresenta maior número de células apoptóticas.
Apoio financeiro: CNPQ, Fapemig e Embrapa.

SBTE 299 Biotecnologias de suporte: criopreservacão, criobiologia, biologia molecular e "ômicas"

Efeito da fonte proteica durante o cultivo na resposta de embriões bovinos produzidos *in vitro* ao congelamento lento

Severino Bernardino Sena Netto[1]; José Felipe Warmling Sprícigo[1]; Luiz Manoel Souza Simoes[2]; Ligiane Oliveira Leme[1]; Margot Alves Nunes Dode[3]; Ivo Pivato[1]
1.Universidade De Brasilia; 2.Universidade Federal De Lavras; 3.Embrapa - Cenargen.

Palavras-chave: Congelamento clássico; bsa; viabilidade

As condições de cultivo podem influenciar diretamente a qualidade dos embriões PIV e a sensibilidade à criopreservação. A suplementação dos meios de MIV e CIV com SFB é rotineiramente utilizada na PIVE, entretanto a presença de soro pode resultar em acúmulo de lipídios e redução na criotolerância. A BSA é uma alternativa de fonte proteica que pode ser usada em substituição ao SFB para melhorar a resposta à criopreservação de embriões PIV (HIROYUKI ABE. MOLECULAR REPRODUCTION AND DEVELOPMENT 61:57-66.2002). O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito destas diferentes fontes proteicas no desenvolvimento embrionário e resistência ao congelamento clássico de embriões bovinos PIVE. Os CCOs obtidos de ovários de abatedouro foram selecionados e distribuídos em 2 grupos: 1) controle: CCOs maturados e cultivados em meios suplementados com 10 e 5% de SFB, respectivamente; 2) CCOs maturados e cultivados em meios suplementados com 0,4% de BSA. Em D7 os embriões em estágio de BX de cada grupo foram distribuídos em dois tratamentos, sendo que metade foi mantida fresca e a outra metade foi congelada. O congelamento foi realizado utilizando 1,5M de EG em palhetas de 0,25 ml e colocadas na maquina de congelamento (FREEZE CONTROL®, Model CL-863 System, Cryologic, Austrália). Após o descongelamento os embriões foram avaliados às 24h e 48h quanto a expansão e eclosão. Os dados foram analisados pelo teste Qui-Quadrado ($P<0,05$). A taxa de clivagem foi semelhante para os grupos 1 (85,8%, n=239) e 2 (81,7%, n=213), entretanto a taxa de blastocisto foi superior para o grupo 1 (41,4%, n= 99 vs 26,8%, n= 57). Após o descongelamento, o grupo cultivado na presença de SFB e criopreservado, apresentou uma menor taxa de eclosão as 24 h (3,2%) do que o fresco (30,6%). Já no grupo produzido na presença de BSA, a taxa de eclosão foi semelhante entre o grupo criopreservado (19.0%) e o fresco (13%). Às 48 h de cultivo pós-descongelamento a taxa de eclosão foi menor no congelado do que no fresco tanto no grupo cultivado com SFB (6,5 e 61,1%) quanto no grupo cultivado no BSA (30,4 e 61,9%). Entretanto, para os criopreservados, o grupo com BSA apresentou maior taxa de eclosão do que os com SFB. Os resultados sugerem que os embriões produzidos na ausência de SFB apesar da menor produção de blastocistos, apresentam melhor resistência ao congelamento do que os cultivados na presença de SFB.

SBTE 300 Biotecnologias de suporte: criopreservacão, criobiologia, biologia molecular e "ômicas"

Efeito da suplementação com ácido linoléico (ômega 6) durante a produção *in vitro* de embriões bovinos sobre a modulação do teor intracitoplasmático de lipídios e resistência à criopreservação

Gisele Zoccal Mingoti; Melissa Meneghel; Priscila Chediek Dall Acqua; Marcela Ambrogi; Beatriz Caetano Da Silva Leão; Nathália Alves De Souza Rocha-Frigoni
UNESP.

Palavras-chave: ácido linoléico; criotolerância; embrião bovino

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da adição de ácido linoléico (LA) ao meio de cultivo em diferentes momentos da produção *in vitro* (MIV, CIV ou MIV+CIV) sobre o acúmulo de lipídios intracitoplasmáticos, desenvolvimento e criotolerância de embriões bovinos. COCs (n=526) foram maturados durante 22h a 38,5°C e 5% de CO_2 em ar em meio TCM 199 com 25 mM de bicarbonato, 10% SFB, 0.5 µg/mL FSH e 100 IU/mL hCG, acrescido ou não de LA (100 µM), sem óleo mineral. Após, os oócitos foram submetidos à FIV e os prováveis zigotos foram cultivados em meio SOFaa acrescido ou não de LA (100 µM), sem óleo mineral, a 38,5°C e 5% de CO_2 em ar. Portanto, haviam 4 tratamentos: Controle, LA durante a maturação (MIV), LA durante o cultivo (CIV) e em ambos (MIV+CIV). O desenvolvimento embrionário foi avaliado no D7, quando os blastocistos expandidos (Bx) foram corados ou criopreservados. Para a determinação do conteúdo lipídico intracitoplasmático, uma parte dos Bx (n=133) foi corada com o corante lipofílico Sudan Black B e foram avaliados em microscópio de luz. As imagens obtidas foram analisadas pelo Software Q-Capture Pro Image para conversão em escala de cinza e delimitação dos embriões para determinação da intensidade da coloração. O grupo Controle foi escolhido como calibrador e o valor da intensidade de cinza de cada grupo foi dividida pela média do calibrador para gerar os valores em unidades arbitrárias. Os demais Bx (n=68) foram vitrificados pelo método Vitri Ingá® (Maringá, PR, Brasil). A taxa de re-expansão foi avaliada logo após a desvitrificação (0h) e após 24h de CIV em meio SOFaa. As taxas de desenvolvimento embrionário e de reexpansão foram avaliadas pelo teste do Qui-Quadrado, enquanto que o conteúdo lipídico foi submetido à análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey ($P<0,05$). Não foi observada diferença significativa ($P>0,05$) na taxa de blastocistos entre o grupo Controle (46,7%) e os grupos MIV (42,9%) e CIV (46,6%), porém observou-se menor produção de embriões ($P<0,05$) no grupo MIV+CIV (32,8%) comparado aos grupos Controle e CIV. A quantidade de lipídios intracitoplasmáticos do grupo Controle (1,0±0,0) foi semelhante ($P>0,05$) ao grupo MIV (0,9±0,1), mas diferiu ($P<0,05$) dos grupos CIV (0,8,±0,1) e MIV+CIV (0,7±0,1). A partir destes resultados, optou-se por avaliar o tratamento com LA apenas durante o CIV quanto à criotolerância, e observou-se que a taxa de re-expansão as 24h foi numericamente maior (28/43; 65,1%), porém não diferiu ($P>0,05$) do grupo Controle (18/39; 46,52%). Apesar disso, o efeito biológico foi evidente, uma vez que foi recuperado maior número de estruturas transferíveis. Em conclusão, o tratamento com LA reduziu a quantidade de lipídeos intracitoplasmáticos em embriões bovinos PIV, o que acarretou na recuperação de um número maior de blastocistos viáveis após desvitrificação, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa.
Agradecimentos: Fapesp (Processo 2013/07382-6) e CAPES

SBTE 301 Biotecnologias de suporte: criopreservacão, criobiologia, biologia molecular e "ômicas"

Efeito de dois tratamentos de estimulação ovariana utilizando FSH sobre a dopplervelocimetria e diâmetro da artéria ovariana de caprinos

Samara Silva De Souza; Yara Pereira Diógenes; Maajid Hassan Bhat; Luciana Magalhães Melo; Vicente José De Figueirêdo Freitas; Dárcio Ítalo Alves Teixeira
Universidade Estadual Do Ceará.

Palavras-chave: Artéria ovariana; caprinos; color doppler

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito de dois tratamentos de estimulação ovariana utilizando FSH, sobre a dopplervelocimetria e diâmetro da artéria ovariana. Foram utilizadas 4 cabras SRD, com idade entre 4-7 anos. Para a sincronização do ciclo, esponjas intravaginais contendo 60 mg de MAP durante 10 dias, foram inseridas e no sétimo dia de tratamento, foi aplicado, por via i.m. 50 µg de d-cloprostenol. Para estimulação ovariana, as cabras foram distribuídas em dois grupos experimentais: i) multidoses (MD) com administração de 120 mg de pFSH, os quais foram divididos em cinco doses decrescentes, administradas por via intramuscular, iniciadas no 7º dia de tratamento com progestágeno com intervalos de 12h, sendo a última aplicação 24 horas antes da retirada do dispositivo intravaginal; ii) one-shot (OS) com 70 mg pFSH, acrescido de 200 UI de eCG administrados por via intramuscular 36 h antes da retirada da esponja. Foi utilizado o aparelho ultrassom Doppler digitalizador (CTS-8800V, SIUI, China), equipado com a sonda transretal linear (6-8 MHz). As cabras foram mantidas na posição em estação, tendo como guia para localização ovariana a bexiga urinária, a sonda foi inserida com o transdutor orientado perpendicularmente à parede abdominal ventral e o escaneamento foi realizado no sentido horário de 90° e anti-horário 180°, para localização dos ovários e artérias ovarianas direita e esquerda sendo estas espiraladas e aderidas intimamente ás veias uterinas. O ângulo de insonação utilizado foi de 60º, e as imagens obtidas foram analisadas pelo programa Image J (National Institutes of Health, EUA) previamente calibrado (62,3 pixels/cm). Os exames foram realizados antes da inserção e retirada da esponja, para mensurar a vascularização e diâmetro da artéria ovariana. Os dados foram apresentados como média ± desvio padrão e o teste -t pareado foi utilizado para verificar diferenças entre os grupos. Foi possível a visualização do fluxo sanguíneo da artéria ovariana em todos os exames ultrassonográficos. A Velocidade Diastólica Final (EDF) no grupo MD no D0 foi de 11,20 ± 1,94 e no OS foi de 13.5 ± 3.91, já no D10 o grupo MD obteve média de 15,3 ± 3,91 e OS de 15,5 ± 5,17 cm/s. A Velocidade do Pico Sistólico (PSV) atingiu uma média no D0 de 25,6 ± 7,60 para MD e 28.5 ± 4.63 cm/s para OS, o mesmo parâmetro obteve médias no D10 de 27,4 ± 3,71 para o grupo MD e 29,7 ± 6,08 cm/s no OS, não havendo diferenças entre os grupos nos parâmetros dopplervelocimétricos ($P < 0,05$). O diâmetro da artéria ovariana no D0 foi de 0,21 ± 0,03 e 0,17 ± 00,7 nos grupos MD e OS respectivamente, enquanto que no D10 as médias obtidas foram de 0,30 ± 0,04 e 0,22 ± 0,03 nos grupos MD e OS nesta ordem. Diferenças significativas ($P > 0,05$) foram observadas entre os dias D0 e D10 no grupo MD, porém não houve diferença entre os grupos no D10. Conclui-se que a utilização de dois tratamentos diferentes para estimulação ovariana não alterou a irrigação sanguínea do ovário em caprinos.

SBTE 302 Biotecnologias de suporte: criopreservacão, criobiologia, biologia molecular e "ômicas"

Efeito do fator de crescimento de fibroblasto-10 durante a pré-MIV e MIV na qualidade de embriões bovinos PIV

Mateus Nunes Diógenes[1]; Ana Luiza Silva Guimarães[1]; Ligiane Oliveira Leme[1]; Margot Alves Nunes Dode[2]
1.Universidade De Brasília; 2.Embrapa Recursos Genéticos E Biotecnologia.

Palavras-chave: embriões; expressão gênica; competência ovocitária.

Com o objetivo de melhorar a competência ovocitária, tem sido proposto por diversos autores um período de pré-MIV, no qual a retomada da meiose, que ocorre logo após a aspiração, é bloqueada, mas nenhum incremento na produção de embriões tem sido obtido (Bilodeau-Goeseels, 2012; Guemra et al., 2014, Theriogenology, v. 81,, p. 982–7; Guimarães et al., 2015 Theriogenology, 83:52-7). Os fatores de crescimento de fibroblastos (FGF) são importantes fatores de crescimento que atuam desde a formação inicial das células reprodutivas até a atresia ou ovulação. Dentre eles o FGF10, quando adicionado durante MIV, melhora a qualidade embrionária (Zhang et al., 2010, Reproduction, v. 140, p. 815–26). O presente estudo objetivou avaliar se a suplementação do meio de pré-MIV e MIV com FGF10 melhora a qualidade de embriões bovinos avaliados pela cinética de desenvolvimento e pela expressão gênica. Para isso, CCOs foram aspirados de ovários de abatedouro e, após a seleção, foram distribuídos em três grupos: T1 (Controle), com CCOs maturados por 22 horas (N=116); T2 (PMC-MC), com CCOs pré-maturados por 22 horas e posteriormente maturados por 22 horas (N=119); T3 (PFGF-MFGF), com CCOs pré-maturados por 22h com FGF10 e posteriormente maturados por 22 horas com FGF10 (N=112). O meio pré-MIV continha 0,2% de BSA, 10-4UI/ml de FSHrh e 10µM de Cilostamida, já o MIV, 0,4% de BSA e 10-1UI/ml de FSHrh. A concentração de FGF10 foi de 0,5 ng/ml. Após a maturação, os CCOs foram fecundados e cultivados até o D8 de desenvolvimento. Os blastocistos eclodidos no D8 foram congelados em RNA later para avaliação da expressão gênica por qPCR. Foi avaliada a taxa de blastocisto em D6, D7 e D8 e esses foram categorizados em Bi, Bl, Bx e BE. A expressão relativa dos genes KRT8, PAG2, PLAC8, MSH6, HSPB1, foi avaliada por qPCR usando o Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). O gene ACTB foi usado como controle endógeno. Os dados de taxa de blastocisto e cinética de desenvolvimento foram avaliados pelo teste do Qui-quadrado. A expressão relativa de cada gene foi calculada usando o método de $\Delta\Delta Ct$ com correção da eficiência pelo método Pfaffl, os tratamentos foram comparados com o teste de Dunnett ($P < 0.05$). Não houve diferença entre os tratamentos na taxa de blastocistos em D6 e D7 (T1: 33,6; 53,4; T2: 28,6; 43,7; T3: 33,9; 47,3). Em D8, o grupo T2 apresentou taxa de blastocisto inferior aos demais grupos. A adição de FGF-10 não aumentou a velocidade de desenvolvimento embrionário, pois a taxa de Bx no D7 e Be no D8 nesse grupo (64,2 e 72,0) foi semelhante à do T2 (50 e 64,6) e do T1 (77,4 e 56,2). Somente o gene MSH6, o qual está relacionado com reparo de DNA, apresentou diferença na expressão entre os tratamentos, sendo inferior no grupo T3 quando comparado ao controle ($P<0,05$). Os resultados sugerem que a adição de FGF10 durante um período de pré-MIV e MIV não afeta a quantidade ou a qualidade dos embriões bovinos PIV.

SBTE 303 Biotecnologias de suporte: criopreservacão, criobiologia, biologia molecular e "ômicas"

Efeito do forskolin durante o cultivo *in vitro* sobre a modulação do teor intracitoplasmático de lipídios e resistência de embriões bovinos à criopreservação

Melissa Meneghel[1]; Priscila Chediek Dall Acqua[1]; Marcela Ambrogi[1]; Beatriz Caetano Da Silva Leão[1]; Nathália Alves De Souza Rocha-Frigoni[1]; Gisele Zoccal Mingoti[1]; Marcos Antônio De Achilles[2]
1.Laboratório De Fisiologia Da Reprodução, Faculdade De Medicina Veterinária, UNESP; 2.Achilles Genetics - Biotecnologia Em Reprodução Animal.

Palavras-chave: Forskolin; produção *in vitro* de embriões bovinos; criotolerância

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos de diferentes concentrações de Forskolin, adicionado ao meio de cultivo *in vitro*, sobre a acumulação de lipídios intracitoplasmáticos, desenvolvimento e criotolerância de embriões bovinos. CCOs (n=848) foram submetidos a MIV durante 22h a 38,5°C e 5% de CO_2 em ar, em microgotas de meio TCM 199 com 25 mM de bicarbonato, 10% SFB, 0.5 µg/mL FSH e 100 UI/mL hCG, cobertas com óleo mineral. Após, os oócitos foram submetidos à FIV e os prováveis zigotos foram cultivados em meio SOFaa (Grupo Controle), suplementado no D6 com 2,5 (Grupo F2,5), 5,0 (Grupo F5) ou 10 µM de Forskolin (Grupo F10), a 38,5°C e 5% de CO_2 em ar. O desenvolvimento embrionário foi avaliado no D7, quando os blastocistos expandidos foram corados ou criopreservados. Para a determinação do conteúdo lipídico intracitoplasmático, uma parte dos blastocistos expandidos (n=99) foi corada com o corante lipofílico Sudan Black B, e foram avaliados em microscópio de luz. As imagens obtidas foram convertidas em escala de cinza e os embriões foram delimitados para determinação do conteúdo lipídico pela avaliação da intensidade da coloração pelo Software Q-Capture Pro Image. O grupo Controle foi escolhido como calibrador e o valor da intensidade de cinza de cada grupo foi dividida pela média do calibrador para gerar os valores em unidades arbitrárias. Os demais blastocistos expandidos (n=76) foram vitrificados pelo método Vitri Ingá®- Maringá - PR - Brasil. A taxa de re-expansão foi avaliada logo após a desvitrificação (0h) e após 24h de cultivo *in vitro* em meio SOFaa. A taxa de desenvolvimento embrionário e de reexpansão foram avaliadas pelo teste do Qui-Quadrado, enquanto que o conteúdo lipídico foi submetido à análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey ($P<0,05$). Não foi observada diferença significativa ($P>0,05$) na taxa de blastocistos entre o grupo Controle (44,9%) e os demais tratamentos, todavia observou-se menor produção de embriões ($P<0,05$) no grupo F10 (38,8%) em comparação aos grupos F2,5 (50,5%) e F5 (54,7%). A quantidade de lipídeos intracitoplasmáticos do grupo Controle (1,0±0,0) foi semelhante ($P>0,05$) aos grupos F2,5 (0,9±0,03) e F10 (1,06±0,03), no entanto diferiu ($P<0,05$) do grupo F5 (0,8±0,1). A partir destes resultados, o grupo F5 foi testado quanto à criotolerância e observou-se que a taxa de reexpansão as 24h foi maior ($P<0,05$) no grupo F5 (72,2%) quando comparado ao grupo Controle (46,2%). Em conclusão, o tratamento com Forskolin na concentração de 5 µM foi eficiente para a redução da quantidade de lipídeos intracitoplasmáticos e, consequentemente, melhorou a criotolerância de embriões bovinos PIV.
Agradecimentos: Fapesp (2013/07382-6) e CAPES

SBTE 304 Biotecnologias de suporte: criopreservacão, criobiologia, biologia molecular e "ômicas"

Efeito do uso de moduladores de AMPc durante a maturação oocitária *in vitro* sobre a maturação nuclear e integridade do citoesqueleto de oócitos bovinos vitrificados

Clara Ana Santos Monteiro[1]; Gabriela Ramos Leal[1]; Helena Fabiana Reis De Almeida Saraiva[1]; Agostinho Jorge Dos Reis Camargo[2]; André Luís Rios Rodrigues[1]; Raquel Varella Serapião[2]; Luiz Altamiro Garcia Nogueira[1]; Luiz Sérgio De Almeida Camargo[3]; Joaquim Mansano Garcia[4]; Clara Slade Oliveira[3]
1.Universidade Federal Fluminense; 2.Pesagro-Rio; 3.Embrapa Gado De Leite-LRA CESM; 4.UNESP.

Palavras-chave: Forskolin; IBMX; cilostamide

A criopreservação de oócitos é uma ferramenta estratégica na PIVE, porém com uso limitado devido à complexa estrutura celular dos oócitos, sendo a qualidade oocitária um fator que influencia no sucesso da técnica. Tendo em vista o papel da MIV sobre a qualidade oocitária, foi desenvolvido o sistema Simulated Physiological Oocyte Maturation (SPOM; Albuz, Hum. Reprod, v. 25, p. 12; 2010) que utiliza moduladores de AMPc para alcançar maior competência oocitária através do prolongamento do bloqueio meiótico. O objetivo do presente estudo foi verificar o efeito do sistema SPOM sobre a maturação nuclear e integridade do citoesqueleto de oócitos bovinos vitrificados. Oócitos obtidos de ovários de matadouro foram divididos em 8 grupos: G1 (Oócitos imaturos); G2 (maturados em meio convencional, sem SFB/24 h); G3 (submetidos à pré-MIV/2 h na presença dos moduladores do AMPc, Forskolin (100µM) e IBMX (500µM), e então à MIV estendida/28 h com Cilostamide (20µM) e FSH); G4 (vitrificados imaturos e submetidos a MIV convencional); G5 (vitrificados imaturos e submetidos a pré-MIV e MIV estendida); G6 (submetidos à pré-MIV, vitrificados e, então, à MIV estendida); G7 (maturados em meio MIV comercial (Bioklone ® Reprodução Animal, São Paulo, Brasil), com SFB/24 h); G8 (vitrificados imaturos e submetidos a MIV em meio comercial, com SFB). Para a análise da maturação nuclear, os oócitos (n=429 obtidos em 3 repetições, 15-75 por grupo experimental) foram corados com o HOECHST 33324 para obtenção da taxa de oócitos maturados (MII). Os filamentos de actina do citoesqueleto foram corados com Phalloidin-Atto 532 para avaliação dos padrões de coloração da actina (Corada/Íntegra ou Não corada/Não íntegra; n=373 obtidos em 2 repetições, 9-73 por grupo experimental). A taxa de MII foi avaliada pelo teste Qui-Quadrado ($\chi 2$) e os percentuais dos padrões de coloração/integridade da actina pelo teste exato de Fisher, no programa Instat GraphPad, a nível de significância de 5%. Quanto à taxa de M II foi observado: G1 (Imaturos): 6,67 ^{a}; G2 (MIV convencional): 77,78 ^{c}; G3 (MIV SPOM): 76,19^{c}; G4 (VIT/MIV convencional): 31,43^{ab}; G5 (VIT/pré-MIV e MIV estendida): 18,57^{a}; G6 (Pré-MIV/VIT/MIV estendida): 39,47^{b}; G7 (MIV comercial): 71,74^{c}; G8 (VIT/MIV comercial): 25,71^{ab}. Este resultado sugere que nos grupos vitrificados a maturação foi prejudicada, porém em menor proporção no grupo submetido à pré-MIV antes da vitrificação. Quanto ao padrão de actina (íntegra/não íntegra), foi observado: G1: 100,0^{a}/0,0; G2: 100,0^{a}/0,0; G3: 100,0^{a}/0,0; G4: 50,0^{bd}/50,0; G5:26,0 ^{c}/74,0; G6: 60,3^{b}/39,7; G7: 94,2^{a}/5,8; G8: 37,9^{cd}/62,1. Demonstrando que nos grupos vitrificados o padrão não íntegro é predominante, exceto no grupo submetido à pré-MIV antes da vitrificação. A pré-MIV do sistema SPOM favorece a progressão meiótica e a integridade do citoesqueleto dos oócitos submetidos à vitrificação, sugerindo-se seu emprego em programas de criopreservação de oócitos. Apoio: FAPERJ (E26/111.61/2013) e CAPES.

SBTE 305 Biotecnologias de suporte: criopreservacão, criobiologia, biologia molecular e "ômicas"

Interferência da via GMPc sobre a expressão de transcritos relacionados com metabolismo lipídico de oócitos bovinos maturados *in vitro*

Katia Lancellotti Schwarz[1]; Ramon Cesar Botigelli[2]; Fernanda Cavallari Castro[1]; Hugo Fernandes[1]; Cláudia Lima Verde Leal[1]
1.FZEA-USP; 2.UNESP.

Palavras-chave: PDE5; nucleotídeos; sildenafil

Em adipócitos, enzimas relacionadas à lipólise são ativadas quando fosforiladas pela proteína quinase dependente de AMPc (PKA) ou dependente de GMPc (PKG). Portanto, níveis intracelulares desses nucleotídeos estão envolvidos na regulação da taxa de lipólise (LAFONTAN, Endocrinololy,19(4):130-7,2008). Como enzimas de controle dos níveis de GMPc e AMPc são expressas em oócitos desnudos (OD) e células do cumulus (CC) (SCHWARZ, Theriogenology,81(4):556-64,2013), é possível que a manipulação dessas vias sinalizadoras durante a maturação, possa exercer influência sobre o metabolismo dos lipídeos em complexos cumulus oócitos (CCOs) bovinos. O objetivo desse trabalho foi investigar a via GMPc durante a maturação oocitária e avaliar seu efeito sobre o nível de GMPc e transcrição de genes envolvidos no metabolismo lipídico. Dois experimentos foram realizados, para ambos CCOs foram maturados em TCM199, com 0,4% de BSA ou 10%SFB, acrescidos de 10^{-5}M de sildenafil (SDF-inibidor da PDE5, enzima de degradação do GMPc) e KT5823 (inibidor da PKG) por 22h. O grupo controle foi maturado com BSA sem a adição das drogas. Após esse período, a mensuração de GMPc foi realizada em pool de 40 CCO usando um kit de imunoensaio (Direct Cyclic GMP EIA) no experimento 1. No experimento 2, os transcritos ATGL, PLINA2 e CPT1B foram avaliados por PCR em tempo real com CC e OD oriundos de pool de 20 CCOs. Análise estatística foi realizada por ANOVA, pós teste Tukey (SAS Institute Inc.,Cary,NC,USA). Os dados de mensuração de GMPc, referentes a 3 replicatas, foram transformados para $\log_{10}$ antes da análise e para expressão gênica foram considerados os valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, referentes a 5 replicatas. O SDF juntos aos grupos de CCOs maturados com BSA ou SFB (56,84 e 53,08 fMol/pool) elevou o GMPc em relação ao grupo controle (38,07 fMol/pool, P>0,05). Enquanto que o grupo de CCOs maturados apenas com SFB apresentaram o menor nível de GMPc (23,08fMol/pool) e se diferenciaram em relação ao grupo associado (SFB+SDF+KT5823, 61,47fMol/poolP<0,05). Os três genes alvos estudados foram expressos em ambos os tipos celulares, sendo que o ATGL ainda não havia sido descrito em CCOs. Em CC a expressão relativa do ATGL foi reduzida pelo SDF em relação ao BSA e SFB (P<0,05) e restaurada quando associada ao KT5823(P<0,05) e a do CPT1B foi elevada apenas com SDF e KT5823(P<0,05). Em relação ao PLIN2, a expressão foi aumentada pelo SFB em relação ao controle BSA (P<0,05), mas a adição de SDF retornou aos níveis de controle e a associação com KT5823 tornou aumentar a expressão (P<0,05), similar ao SFB. Em OD não houve efeito dos tratamentos (P>0,05). Conclui-se: 1) a PDE5 e a PKG estão envolvidas no controle dos níveis de GMPc em CCOs bovinos e que o SFB tende a reduzir tais níveis; 2) a via estudada exerce influência na expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico de CC, o que por sua vez, pode ter efeito sobre o metabolismo lipídico de OD. Agradecimentos: FAPESP

SBTE 306 Biotecnologias de suporte: criopreservacão, criobiologia, biologia molecular e "ômicas"

Isolamento de células somáticas derivadas de tecido auricular de catetos (*Pecari tajacu linnaeus*, 1758) submetido a distintas técnicas de vitrificação

Alana Azevedo Borges; Luiza Bento De Queiroz Neta; Maria Valéria De Oliveira Santos; Magda Lorena Turbano Dos Santos; Gabriela Liberalino Lima; Moacir Franco Oliveira; Alexandre Rodrigues Silva; Alexsandra Fernandes Pereira
UFERSA.

Palavras-chave: Animais silvestres; criopreservação; célula somática

A criopreservação de amostras teciduais de animais silvestres, especialmente catetos (*Pecari tajacu*), representa uma etapa interessante na obtenção e conservação de células somáticas para aplicação na transferência nuclear (clonagem). Contudo, protocolos de vitrificação tecidual necessitam ser otimizados para garantir a máxima preservação das características viáveis das células. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi comparar por cultivo *in vitro* (CIV) duas técnicas de criopreservação de tecido auricular [vitrificação direta em criotubos, VDC, segundo Silvestre *et al*. (2004, Theriogenology 49, 221–229) ou vitrificação em superfície sólida, VSS, conforme Carvalho *et al*. (2011, Theriogenology 76, 933–941)]. Para tanto, fragmentos auriculares (9,0 mm^3) de oito catetos (4 machos e 4 fêmeas) com 7-12 meses de idade, oriundos do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS/UFERSA), foram coletados e criopreservados em solução constituída por meio essencial mínimo modificado por Dulbecco (DMEM) acrescido de 3,0 M de dimetilsulfóxido, 3,0 M de etilenoglicol, 0,25 M de sacarose e 10% de soro fetal bovino. Após duas semanas, fragmentos aquecidos e não criopreservados (controle) foram cultivados *in vitro* e avaliados quanto à morfologia celular, aderência, início da subconfluência (70% da placa coberta por células) e viabilidade celular por azul de Tripan (em %). Todos os dados oriundos dos oitos animais foram analisados por ANOVA seguida de teste *post-hoc* apropriado. Após a colheita das amostras teciduais, um total de 96 fragmentos foi dividido para os três grupos experimentais (VDC: 32; VSS: 32 e controle: 32 fragmentos). Destes, apenas um fragmento do grupo controle não aderiu à placa após o CIV. Todos os fragmentos aderidos de todos os grupos foram hábeis para a confluência celular, apresentando proliferação celular a partir dos dias 7°, 5° e 3° para os grupos VDC, VSS e controle, respectivamente. Diferenças no início da proliferação foram observadas entre os grupos criopreservados e controle ($P<0,05$). Em geral, todas as células visualizadas apresentaram características fusiformes com núcleo oval no centro, próprias de fibroblastos. Além disso, todas as amostras aderidas foram capazes de atingir a subconfluência nos dias 17,5°; 18,3° e 18,0° para os grupos VDC, VSS e controle, respectivamente ($P>0,05$). Nenhuma diferença foi observada para a viabilidade das células em cultivo (VDC: 89% *vs.* VSS: 86% *vs.* controle: 91%, $P>0,05$). Adicionalmente, considerando o grupo controle como viabilidade máxima alcançada, células derivadas dos grupos VDC e VSS apresentaram uma viabilidade de 98% e 95%, respectivamente. Em conclusão, ambas as técnicas de vitrificação podem ser empregadas para a criopreservação de tecido somático de catetos, permitindo o isolamento de células viáveis para a clonagem e conservação genética desta espécie.

SBTE 307 Biotecnologias de suporte: criopreservacão, criobiologia, biologia molecular e "ômicas"

Padrões globais de metilação e hidroximetilação de DNA em tecidos bovinos

Anelise Dos Santos Mendonça[1]; Thiago Felipe Braga[2]; Eduardo Melo[3]; Margot Alves Nunes Dode[3]; Mauricio Machaim Franco[3]
1.Universidade Federal De Uberlândia; 2.Universidade De Brasilia; 3.Embrapa Recursos Geneticos E Biotecnologia.

Palavras-chave: Bos taurus indicus; hidroximetilação; metilação

A relação entre 5-mC e 5-hmC parece ser importante na reprogramação epigenética durante a gametogênese e embriogênese inicial, devido ao envolvimento na regulação da expressão gênica. Objetivou-se neste trabalho caracterizar os padrões globais de metilação e hidroximetilação de DNA em animais *Bos taurus indicus*. Foram utilizados como fonte de DNA: sangue, tecidos fetais de bezerros Nelore recém-nascidos, espermatozoides de cabeça, cauda de epidídimo e ejaculado de touros Gir. Amostras de sangue (n=19) e tecidos placentários (membrana alantoideana e cotilédone; n=12) foram coletas logo após o parto, armazenados a -20ºC e o DNA extraído utilizando o kit *QIAamp DNA Blood Mini* (QIAGEN, Hilden, Germany). Os espermatozoides de ejaculado foram obtidos através da coleta de sêmen por eletroejaculação (n=5) e para obtenção dos espermatozoides de cabeça (n=5) e cauda (n=2) de epidídimo foi utilizado o método de extravasamento. A extração de DNA foi realizada pelo protocolo *Salting Out*. Para a quantificação dos níveis globais de metilação e hidroximetilação do DNA foram utilizados os kits *MethylFash Methylated* e *MethylFash Hydroxymethylated DNA Quantification* (Epigentek, NY, USA), respectivamente. As médias de metilação de DNA em sangue, membrana alantoideana e cotilédone foram de 12,68±6,75%, 17,26±15,07% e 12,94±5,49%, respectivamente; as médias de hidroximetilação de DNA foram de 3,47±1,93%, 2,86±3,16% e 2,43±2,12%, respectivamente, não sendo observadas diferenças entre os diferentes tecidos analisados. Foi observada diferença no padrão de hidroximetilação em cotilédone entre machos e fêmeas (4,15±1,67% e 0,99±1,13%, respectivamente). Já as médias de metilação de DNA em espermatozoides de cabeça e cauda de epidídimo e espermatozoides do ejaculado foram de 43,27±6,84%, 34,66±8,04% e 35,12±6,40%, respectivamente; e as médias de hidroximetilação de DNA foram de 13,69±7,22%, 6,71±3,03% e 14,34±2,79%. Os padrões de 5-mC e 5-hmC não se alteraram durante o processo de maturação e pós ejaculação nos espermatozoides. Entretanto, esses padrões nas células espermáticas foram maiores que em sangue e tecidos placentários, com exceção da 5-hmC em espermatozoides de cauda de epidídimo, que não apresentou diferenças em relação a nenhum tecido analisado. As médias de 5-mC/5-hmC para sangue, membrana alantoideana, cotilédone, espermatozoides de cabeça e cauda de epidídimo e espermatozoides ejaculados foram, respectivamente, 4,75±3,77; 10,41±10,13; 8,36±8,27; 4,31±2,91; 5,44±1,25 e 2,53±0,65, sendo que essas razões não se alteram entre os tecidos analisados. Os resultados mostraram que as taxas de 5-mC e 5-hmC em bovinos se alteram entre diferentes tipos celulares e de acordo com o sexo em tecidos extraembrionários. Deve-se ressaltar o pioneirismo do trabalho nessa espécie e a importância do conhecimento desses eventos para melhor compreender os mecanismos de regulação epigenética.
Apoio financeiro: FAP-DF (Processo: 193000481/2011), CNPq (Processo: 564376/2010-8) e Embrapa.

SBTE 308 Biotecnologias de suporte: criopreservacão, criobiologia, biologia molecular e "ômicas"

Preservação em curto prazo de COC bovino durante a estação chuvosa de araguaína -TO: efeito da temperatura e do tempo.

Ana Caroline Ongaratto Custódio[1]; Marcio Teixeira Guimaraes[1]; Bergson Pereira Lima[1]; Hugo Machado Ribeiro[1]; Gisele Priscila Nascimento Da Silva[1]; Francisca Elda Ferreira Dias[1]; Tania Vasconcelos Cavalcante[2]; Ana Kelen Felipe Lima[1]
1.Universidade Federal Do Tocantins; 2.Universidade Federal Do Piauí.

Palavras-chave: Conservação; COC; bovino

Pesquisas recentes têm criado oportunidades extraordinárias para a reprodução animal, proporcionado uma grande revolução na multiplicação de animais de elevado potencial econômico. Biotécnicas têm sido desenvolvidas para otimizar e dar suporte à outras já estabelecidas, tais como a FIV e MOIFOPA. Portanto, este trabalho tem como principal objetivo avaliar o efeito do tempo e da temperatura de transporte de ovários de bovinos abatidos, sobre os Complexos Cumulus-oophorus (COC) e analisar a sua viabilidade após esse procedimento. Para tanto, foram coletados 30 pares de ovários no abatedouro municipal de Araguaína, em época chuvosa, transportados em garrafas térmicas contendo solução salina 0,9%. Para análise, os ovários foram divididos em seis grupos experimentais, de acordo com a temperatura e tempo em que cada um foi analisado. Os intervalos de tempo testados foram: 3, 12 e 24 horas, nas temperaturas de 4ºC e 37ºC. Folículos antrais foram aspirados para obtenção de COC com seringa acoplada a agulhas 25x7 ou 25x8. Após a aspiração folicular, os COC obtidos foram corados com Azul de Tripan 4% (1:1) para verificar a integridade de membrana plasmática das células da granulosa e /ou oócito. Foi realizada estatística descritiva, e os resultados foram expressos em percentual (ANDRADE et al. J. Small Rumin. Res. v. 43, p. 235, 2002). Foram avaliados 281 COC bovinos, no qual os ovários que foram transportados no período de três horas, em ambas as temperaturas, não tiveram os seus COC corados com a Azul de Tripan, sugerindo não haver interferência na viabilidade destes. No entanto, os ovários que foram transportados por um período de tempo de 12 horas, começaram a apresentar um declínio na viabilidade dos COC, e quando expostos as diferentes temperaturas, aqueles transportados a 4ºC apresentaram uma melhor taxa de conservação (65%) quando comparado com a temperatura de 37ºC, que obteve uma taxa relativamente baixa de COC viáveis (46%), sugerindo danos na membrana plasmática dessas células. Quando se testou o período de 24 horas, os ovários transportados em 4ºC apresentavam-se com aspecto normal, porém foram obtidos apenas 13 COC, apresentando 77% de viabilidade. Já os ovários transportados em 37ºC, nesse mesmo intervalo de tempo, encontravam-se deteriorados, e de difícil aspiração, e apresentou 100% de COC inviáveis. A partir destes resultados, foi possível concluir que ocorre um declínio na viabilidade dos COC bovinos, quando os ovários são transportados em solução salina a 4ºC ou 37ºC, em períodos acima de 12 horas, durante estação chuvosa.

SBTE 309 Biotecnologias de suporte: criopreservacão, criobiologia, biologia molecular e "ômicas"

Produção de embriões bovinos por transferência de placa metafásica

Felippe Manoel Costa Caixeta[1]; José Felipe Warmling Sprícigo[1]; Regivaldo Vieira De Sousa[2]; Ivo Pivato[1]; Margot Alves Nunes Dode[2]
1.Universidade De Brasília - UNB; 2.Embrapa Cenargen.

Palavras-chave: Competência ovocitária; ovócitos; placa metafásica

A transferência de placa metafásica (TPM) entre ovócitos oferece a possibilidade de resolver problemas que podem inviabilizar o sucesso de algumas técnicas de reprodução assistida. Dentre esses podem ser mencionadas a idade avançada da doadora, a presença de anomalias causadas por mutações no mtDNA e danos citoplasmáticos decorrentes da criopreservação. Além disso, esse procedimento permite estudar vários aspectos da interação núcleo-citoplasma em ovócitos. O objetivo deste estudo foi avaliar a formação de embriões a partir de ovócitos em MII em que a placa metafásica foi transferida para o citoplasma receptor de outro ovócito enucleado. Complexos cumulus ovócitos (COC's) de grau 1 e 2 obtidos de ovários de abatedouro foram maturados por 20 horas a 38,5 °C e 5% CO_2. Após a maturação os COCs foram desnudados em solução de hyaluronidase 0,2% e selecionados quanto à presença de corpúsculo polar (CP) e homogeneidade do citoplasma. Os ovócitos selecionados foram divididos em dois grupos: 1) grupo controle: ovócitos submetidos à ativação partenogenética (AP); 2) Grupo TPM: ovócitos submetidos à TPM e posterior AP. Os ovócitos do grupo 2 foram incubados em solução de Citocalasina D e Hoeschst 33342 em TCM-199, por 30 minutos. Após a incubação, foram enucleados com uma pipeta de aspiração (diâmetro: 30 a 40µm) acoplada a um micromanipulador e, imediatamente receberam uma placa metafásica previamente removida de um ovócito doador em MII. Ao término da reconstrução, as estruturas foram fusionadas (dois pulsos de 2,1 KV/cm). As estruturas fusionadas (n= 42; 56,05% do total) e ovócitos do grupo controle (n= 42) foram ativados em solução de Ionomicina 5µM por 5 minutos e em seguida mantidos em solução de 6-DMAP a 2mM por 4 horas. Posteriormente, foram cultivados por 7 dias sobre monocamada de células do cumulus (CC) a 38,5 °C e 5% CO_2. Os prováveis zigotos foram avaliados em D2 e D7 quanto à taxa de clivagem e de blastocisto, respectivamente. Os resultados foram analisados pelo teste do Qui-quadrado com $P \leq 0,05$. As taxas de clivagem e blastocisto do grupo TPM (19,05% e 4,8%, respectivamente) foram inferiores às do grupo controle (90,48% e 47,6%, respectivamente). Baseando-se nos resultados, concluímos que a TPM mostrou-se promissora para a produção de embriões a partir de ovócitos com competência comprometida por danos devido ao congelamento, à mutações do mtDNA e/ou outras causas.

SBTE 310 Biotecnologias de suporte: criopreservacão, criobiologia, biologia molecular e "ômicas"

Resposta de embriões suínos das raças piau e moura à vitrificação por cryotop

Ligiane Oliveira Leme[1]; José Felipe Warmling Sprícigo[1]; Mateus Nunes Diógenes[1]; Priscilla Cristine Passoni Silva[1]; Mauricio Machaim Franco[2]; Alexandre Floriani Ramos[2]; Margot Alves Nunes Dode[2]
1.UNB; 2.Embrapa Recursos Genéticos E Biotecnologia.

Palavras-chave: Embrião; vitrificação; suíno

As raças suínas Piau e Moura são localmente adaptadas e estão sendo substituídas por raças comerciais, com risco de serem extintas. Por isso, existe uma demanda para que material genético desses animais seja preservado. No entanto, a criopreservação de embriões suínos tem sido limitada pela alta crio-sensibilidade dos mesmos. A vitrificação e, especificamente, o método Cryotop, tem sido proposto como metodologia mais bem-sucedida para a criopreservação de embriões de várias espécies mamíferas, apresentando como vantagem a não formação de cristais de gelo e alta velocidade de resfriamento. Neste estudo, foi avaliada a resposta de embriões suínos das raças Piau e Moura à vitrificação por Cryotop. Para tanto, fêmeas Moura (n = 18) e Piau (n = 58), tiveram cio observado e em D6 após monta natural, foram submetidas a laparoscopia para a coleta *in vivo* dos embriões. Foram recuperados 353 embriões (108 Moura e 245 Piau) em estágios variados de desenvolvimento. Para a vitrificação, utilizou-se embriões frescos em estágio de BL e BX, graus I e II, que no momento das coletas foram divididos em grupo Controle (C, Moura n = 31; Piau n = 47) – não criopreservados, e grupo Vitrificado (V, Moura n = 32; Piau n = 56). Após a desvitrificação, os embriões de ambos os grupos foram cultivados em meio SOF, a 38,5 °C e 5% CO_2 em ar. As 24 e 48 h de cultivo foram avaliadas as taxas de re-expansão e eclosão. Os embriões eclodidos as 48 h de cultivo foram estocados para quantificação da expressão de genes por qPCR, no qual foi utilizado SYBR Green Fast Master Mix. As análises estatísticas para taxas de reexpansão e eclosão foram feitas pelo teste Chi-quadrado ($P<0,05$) e a expressão de genes foi feita pelo $\Delta\Delta Ct$, corrigido por Pfaffl, utilizando a ACTB como controle endógeno. As 24 h de cultivo a taxa de eclosão foi menor ($P<0,05$) nos embriões C da raça Piau (57,4%) do que da Moura (83,9%), enquanto nos vitrificados foi semelhante ($P>0,05$) entre as raças (0% e 8,9%, respectivamente). As 48 h de cultivo a taxa de eclosão não diferiu ($P>0,05$) entre embriões C das duas raças (83,0% e 96,8%, respectivamente), da mesma forma os V tiveram taxa de eclosão semelhante ($P>0,05$) entre eles (19,6% e 21,9%, respectivamente), mas inferiores ($P<0,05$) aos dos embriões controle de ambas as raças. Para análise de expressão de genes, foram utilizados três pools de cinco embriões C e V da raça Piau. Não foi possível realizar o qPCR para embriões Moura devido ao número insuficiente. Dentre os genes analisados, BCL2L1, BAK, CASP3, apenas o BAX apresentou expressão diferencial entre os grupos, sendo mais expresso para o grupo V ($P = 0,04$), em relação ao C. Os resultados obtidos indicam que os embriões suínos, mesmo vitrificados por Cryotop, apresentam baixa recuperação após a criopreservação. No entanto, a resposta da expressão dos genes sugere que os embriões que eclodiram às 48 h reagiram ao stress da vitrificação, o que possivelmente o torna mais viável para continuar seu desenvolvimento.

SBTE 311 Biotecnologias de suporte: criopreservacão, criobiologia, biologia molecular e "ômicas"

Uso de etilenoglicol monometil éter como crioprotetor na vitrificação de embriões bovinos produzidos *in vitro*

Elisangela Mirapalheta Madeira[1]; Bruna Mion[2]; Janaina Fadrique Da Silva[3]; Ligia Margareth Cantarelli Pegoraro[3]; Arnaldo Diniz Vieira[1]; Thomaz Lucia Jr[1]
1.UFPEL; 2.Médica Veterinária; 3.Embrapa Clima Temperado.

Palavras-chave: Crioprotetor; etilenoglicol monometil eter; vitrificacao

Pesquisas vêm sendo direcionadas para identificar protocolos de criopreservação satisfatórios através do processo de vitrificação. Entretanto, pouca atenção foi dada às características termodinâmicas e químicas dos crioprotetores. Para este fim o objetivo deste estudo foi determinar a concentração mais eficiente do crioprotetor etilenoglicol monometil éter (EGMME) em protocolos de vitrificação de embriões bovinos produzidos *in vitro* (PIV). O presente experimento determinou a concentração de EGMME associado ao DMSO com melhor taxa de eclosão, após vitrificação, reaquecimento, através da aferição das taxas de eclosão e expressão gênica de 405 embriões, em 6 repetições. O protocolo de vitrificação utilizado foi descrito anteriormente por Vieira e colaboradores (Animal Reproduction Science, v. 99, p. 377-383, 2007). Em média foram utilizados 22,5 embriões por tratamento/repetição. A variável utilizada foi obtida das médias de eclosão e ainda foram utilizados 30 embriões reaquecidos e implantados em fêmeas bovinas previamente sincronizadas. A taxa de eclosão do tratamento controle (T1), embriões não vitrificados (63.8%) foi maior ($p<0.05$) em relação às taxas observadas para os embriões vitrificados nas soluções contendo EG 20% e DMSO 20% (T2; 37,6%) e EGMME 20% e DMSO, as quais foram similares entre si ($p>0,05$). Já as taxas de eclosão observadas para o tratamento contendo EGMME 15% e DMSO 20% (T4; 10,3%) foi de a menor ($p<0,05$) entre os tratamentos. A expressão dos genes BAX (promotor de apoptose) e CCND2 (marcador de proliferação celular) não diferiu ($p>0,05$) entre os grupos, mas a expressão do gene Bcl-2 (inibidor de apoptose) foi menor ($p<0,05$) no T4 do que nos demais tratamentos. As taxas de prenhez aos 30 dias para embriões de T2 e T3 foram ambas iguais a 26.6%. Sendo que os embriões do tratamento 4 não foram inovulados. Portanto, o EGMME pode ser utilizado como crioprotetor em soluções de vitrificação de embriões bovinos PIV.

SBTE 312 Biotecnologias de suporte: criopreservacão, criobiologia, biologia molecular e "ômicas"

Uso de microfluídica na análise do perfil de genes relacionados à qualidade de embriões provenientes de vacas nelore superestimuladas com P36 ou P36/eCG

Patrícia Kubo Fontes[1]; Eduardo Montanari Razza[1]; Anthony César Souza Castilho[2]; Ronaldo Luiz Ereno[1]; Rafael Augusto Satrapa[3]; Marcelo Fabio Gouveia Nogueira[2]; Ciro Moraes Barros[1]
1.UNESP - Campus De Botucatu; 2.UNESP - Campus De Assis; 3.Universidade Federal Do Acre.

Palavras-chave: Microfluídica; superestimulação ovariana; expressão gênica

Protocolos superovulatórios com gonadotrofinas exógenas têm sido amplamente usados nas biotecnologias de produção de embriões bovinos. O entendimento da dinâmica folicular gerou o desenvolvimento de protocolos hormonais com a finalidade de maximizar a fertilidade, dentre eles, o protocolo de superestimulação ovariana P36. Estudos demonstraram que adaptações no P36, como a substituição das últimas duas doses de FSH por eCG (protocolo P36/eCG), melhorou a taxa de embriões produzidos, possivelmente devido à dupla ação do eCG nos receptores de FSH e LH, respectivamente com maior e menor afinidade. Entretanto, a qualidade dos embriões gerados sob efeito dessas gonadotrofinas é antagônica, variando entre a melhoria e a redução da competência destes. Diante disso, o presente trabalho objetivou quantificar a abundância de mRNA de genes indicadores de qualidade em embriões provenientes de vacas submetidas aos protocolos P36 e P36/eCG. Para tanto, vacas Nelore *(Bos taurus indicus*) foram submetidas à: sincronização do ciclo (Grupo Controle, n=20; não-superestimuladas), protocolo P36 (Grupo P36, n=15) e protocolo P36/eCG (Grupo P36/eCG, n=20). Todos os animais foram abatidos 12 h após a retirada do dispositivo de progesterona. Folículos antrais ovarianos (3-8mm de diâmetro) de vacas controle e de vacas superestimuladas (>9mm) foram aspirados para produção *in vitro* de embriões. O RNA total de pools de embriões foi extraído (5 blastocistos/pool; sendo 5, 3 e 5 pools dos grupos controle, P36 e P36/eCG, respectivamente), submetidos à transcrição reversa e pré-amplificados por 14 ciclos com enzima Taqman® e oligonucleotídeos iniciadores bovino-específicos Taqman®. Para a quantificação da abundância de mRNA de 46 genes indicadores de qualidade embrionária por RT-qPCR, utilizou-se a plataforma microfluídica BioMark HD System™ (Fluidigm®), com controlador HX (96 amostras e 96 ensaios simultaneamente, 96.96 Dynamic Array). A abundância relativa foi calculada pelo método ΔΔCt (gene alvo/GAPDH) com correção pela equação de Pffafl. O efeito do tratamento superestimulatório foi testado por ANOVA (paramétrico) ou teste de Wilcoxon (não-paramétrico, diferença estatística quando $P<0,05$). A abundância de mRNA do IFITM3 e SOX2 foi maior nos blastocistos de vacas do grupo controle comparado às vacas submetidas à superestimulação ovariana, enquanto a abundância de mRNA do ACTB, AQP3, CASP3, CDH1, OTX2 e PAF1 foi maior em blastocistos de vacas submetidas à superestimulação. Deste modo, os presentes achados demonstram que o uso de gonadotrofinas exógenas modifica o perfil de mRNA, de genes relacionados à qualidade embrionária, podendo influenciar a competência de embriões provenientes de vacas submetidas à superestimulação ovariana. Apoio financeiro: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos 2011/50593-2, 2012/50533-2 e 2013/05083-1.

SBTE 313 Biotecnologias de suporte: criopreservacão, criobiologia, biologia molecular e "ômicas"

Vitrificação de complexos cumulus-oócito imaturos bovinos: efeitos sobre o desenvolvimento embrionário e lamina nuclear

Dowglish Ferreira Chaves[1]; Emilie Corbin[2]; Carmen Almiñana[2]; Yann Locatelli[2]; Joanna Maria Gonçalves De Souza Fabjan[1]; Maajid Hassan Bhat[1]; Vicente José De Figueirêdo Freitas[1]; Pascal Mermillod[2]
1.UECE; 2.INRA.

Palavras-chave: Bovino; criopreservação; crioprotetor

O comprometimento na competência ao desenvolvimento após a criopreservação de oócitos está ligado a danos em importantes estruturas. As lâminas nucleares proporcionam estabilidade mecânica, forma nuclear e estão envolvidas em vários processos, tais como a replicação e reparação do DNA. O objetivo do presente estudo foi examinar os efeitos da exposição a crioprotetores (experimento I) e vitrificação por OPS (experimento II), de complexos cumulus-oócito (CCOs) imaturos bovinos sobre o desenvolvimento embrionário e estrutura de lamina nuclear. Os ovários foram obtidos a partir do abatedouro local e somente oócitos inclusos em células do cumulus compactas e citoplasma uniformemente granulado foram selecionados. O meio de base para a preparação das soluções crioprotetoras foi o meio holding (MH), o qual era composto por TCM199 tamponado com HEPES e suplementado com 20% de SFB. Primeiramente, os CCOs foram expostos a MH durante 3 min seguido pela primeira solução de vitrificação: 7,5% DMSO e 7,5% de etilenoglicol (EG) em MH durante 15 min. Em seguida, os oócitos foram transferidos para duas gotas com a segunda solução de vitrificação: 16% de DMSO, 16% de EG e 1 M de sacarose em MH por 20 s cada. Para o aquecimento, os oócitos foram submersos durante 1 min em solução de aquecimento 1 (MH + 1 M de sacarose) e transferidos para a solução de aquecimento 2 (MH + 0,5 M de sacarose) durante 3 min e lavados duas vezes em MH por 5 min. Depois disso, os CCOs foram processados para maturação, fecundação e cultivo *in vitro*. Amostras de CCOs foram fixadas e imunocoradas para avaliação da lamina nuclear. Para análise estatística foi utilizado o teste do qui-quadrado para comparação entre os grupos experimentais ($p < 0,05$). A exposição de CCOs imaturos aos crioprotetores resultou em uma taxa de blastocisto de 29% (31/108), inferior ($p < 0,05$) aos 51% (101/199) observados no grupo controle. No que se refere a eclosão, observou-se uma taxa de 22% (43/199) no grupo controle, a qual foi estatisticamente superior quando comparada a aquela do grupo vitrificado (6%, 7/108). Quanto a lamina nuclear, uma maior proporção contrações e mudanças morfológicas foram observadas no grupo vitrificado (35%) quando comparado ao grupo controle (0%, $p < 0,05$). A vitrificação por OPS afetou a competência ao desenvolvimento apresentando maior taxa de clivagem no grupo controle (79%, 203/256) comparado ao grupo vitrificado (8%, 13/156). Os CCOs do grupo controle apresentaram uma taxa blastocisto de 42% (107/256), enquanto não foram observados blastocistos no grupo vitrificado. A lamina nuclear foi fortemente afetada pela vitrificação, apresentando uma maior proporção de alterações morfológicas (72%) em comparação ao grupo controle (9%; $p < 0,05$). Em conclusão, os CCOs imaturos parecem apresentar tolerância à exposição aos crioprotetores, no entanto a vitrificação resultou em baixas taxas de desenvolvimento embrionário devido, possivelmente, aos efeitos negativos sobre a lamina nuclear.