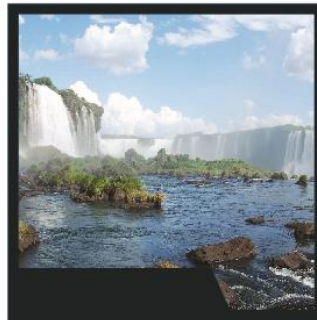
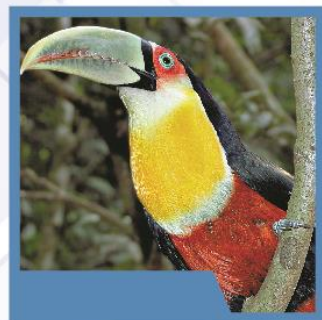
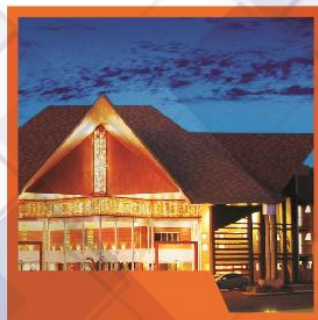
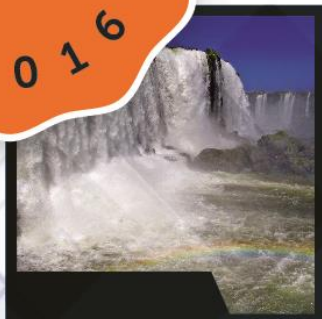


**ANAIS DA REUNIÃO ANUAL**  
DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES



**XXX • 2016**  
**REUNIÃO ANUAL DA**  
**SOCIEDADE BRASILEIRA DE**  
**TECNOLOGIA DE EMBRIÕES**

FOZ DO IGUAÇU - PR



# Anais da XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões



Foz do Iguaçu, PR, Brasil

25 a 27 de Agosto de 2016

Do Presidente da SBTE

Caros colegas

É um grande prazer recebê-los na 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE 2016), sediada no Recanto das Cataratas Resort & Convention, bem como apresentar-lhes os Anais dessa Reunião.

Agradecimentos especiais à nossa Comissão Científica (Drs. Paula Papa, Felipe Perecin e José Eduardo Santos) pela organização de uma excelente programação científica, que contempla tópicos emergentes em ciência básica, assim como importantes temas aplicados relacionados à produção de embriões e fertilidade. Agradeço também aos coordenadores dos workshops e a todos os palestrantes, que fortaleceram nossa Reunião cientificamente e proporcionaram oportunidades valiosas para enxergarmos a ciência e a tecnologia na área da reprodução sob as perspectivas do mercado e dos desafios globais vigentes.

O meu muito obrigado também aos nossos patrocinadores públicos, CNPq e CAPES, e às empresas parceiras. O apoio dessas entidades tem sido absolutamente fundamental para a qualidade científica de nossa Reunião nos últimos anos.

Finalmente, agradeço enormemente à toda diretoria e à secretaria da SBTE, cujos esforços tornaram essa Reunião possível e minha tarefa, muito prazerosa.

Nós esperamos fortemente que vocês aproveitem a Reunião Anual da SBTE-2016 e os artigos e resumos compilados nesses Anais.

José Buratini

Presidente (2016-2017)

## Carta da Comissão Científica

Saudações e sejam bem-vindos à 30<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE), que será realizada de 25 a 27 de agosto de 2016, em Foz do Iguaçu. Essa é a nossa segunda edição com os anais conjuntos com a Associação Europeia de Transferência de Embriões (AETE), que terá sua 32<sup>a</sup> Reunião Anual em Barcelona, Espanha, dias 9 e 10 de setembro de 2016. Nós manifestamos nosso apreço à diretoria da AETE pela continuidade desta colaboração científica; e embora esta versão em português não traga os artigos referentes à reunião da AETE, nós relembramos que a publicação conjunta das duas sociedades estará nos anais em inglês publicados pela Animal Reproduction.

Esta versão em português contém os artigos na íntegra dos palestrantes convidados para a SBTE. O programa da SBTE 2016 inclui uma sessão de abertura, quatro plenárias e 4 sessões concomitantes básicas e aplicadas, com a presença de 17 palestrantes de renome mundial. Nós agradecemos todos os palestrantes pela dedicação em preparar as palestras e os artigos de revisão, e por gentilmente terem aceito e cumprido os prazos apertados impostos pelo cronograma necessário para concluirmos estes anais e a reunião em tempo hábil.

A sessão de abertura terá uma palestra sobre a atual situação da atividade de produção de embriões ao redor do mundo, proferida pela Dra. Christine Wrenzycki, atual presidente da Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões. Na sequência, teremos a palestra de abertura do Dr. Robert Webb, sobre o papel do setor agropecuário no desenvolvimento e aplicação de tecnologias para atender o desafio mundial pela produção de alimentos. Nós organizamos um programa que cobre diferentes aspectos ligados às tecnologias embrionárias e à reprodução animal. As apresentações dos palestrantes englobarão desde aspectos básicos até aspectos com aplicação direta na reprodução animal, como por exemplo, desde os papéis ainda incertos dos pequenos RNAs na biologia reprodutiva até seu uso como ferramenta de diagnóstico gestacional. O programa inclui ainda tópicos sobre epigenética, comunicação celular mediada por vesículas extracelulares, ômicas, fisiologia reprodutiva, saúde uterina, produção de embriões e programas reprodutivos para aumentar a fertilidade em bovinos.

O programa principal será complementado com 5 workshops de alta qualidade, independentemente coordenados. Nós agradecemos ao Mario Binelli, Fernanda Landim, Yeda Watanabe, Roberto Sartori e Edmundo Vilela por dispenderem tempo e recursos para trazerem à nossa reunião anual temas como a comunicação materno-fetal, a biologia e aplicação de células-tronco e uma ampla discussão sobre o desenvolvimento e aplicação de tecnologias reprodutivas na produção animal.

Foram submetidos para a reunião anual cerca de 270 resumos, dos quais 56 inscreveram-se para as competições de estudantes e outros 25 para as premiações de melhor trabalho básico, melhor trabalho aplicado e melhor relato técnico. Nós agradecemos aos coordenadores de eixo dos resumos, aos revisores dos resumos, e aos colegas que avaliaram os resumos inscritos nas competições e premiações. Uma equipe de revisores listados nos anais cuidadosamente avaliou os artigos aqui publicados. Nossos agradecimentos a todos pelo tempo e empenho dedicado ao processo de revisão científica.

Nós também estamos muito gratos ao trabalho de toda a diretoria da SBTE. Eles trabalharam incansavelmente para que essa reunião fosse possível.

Finalmente, nós agradecemos a todos vocês por participarem da reunião anual da SBTE.

**Felipe Perecin**

**Paula de Carvalho Papa**

**José Eduardo Portela Santos**

Comitê Científico SBTE (2016-2017)

**XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE)**  
**Foz do Iguaçu, PR, Brasil**  
**25 a 27 de agosto de 2016**

**Diretoria da SBTE 2016-2017**

*Presidente:* **José Buratini Junior** (IBB-UNESP-Botucatu)

*Vice presidente:* **Luiz Sergio de Almeida Camargo** (Embrapa Gado de Leite)

*1<sup>st</sup> Secretária:* **Claudia Maria Bertan Membrive** (UNESP-Botucatu)

*2<sup>nd</sup> Secretária:* **Lindsay Unno Gimenes** (FCAV-UNESP-Jaboticabal)

*1<sup>st</sup> Tesoureiro:* **Guilherme de Paula Nogueira** (FMVA-UNESP-Araçatuba)

*2<sup>nd</sup> Tesoureiro:* **Alexandre Rossetto Garcia** (Embrapa Pecuária Sudeste)

*Diretor de Comunicação:* **José de Oliveira Carvalho** (UFES)

*Colaborador de Comunicação:* **Anthony César de Souza Castilho** (Unoeste)

*Diretor de Negócios:* **Maurício Antônio Silva Peixer** (Bio- Biotecnologia Animal)

*Representante de Empresas:* **Osnir Yoshime Watanabe** (WTA)

*Representante de Veterinários de Campo:* **Edmundo Rocha Vilela** (Lageado Biotecnologia e Pecuária)

*Comitê científico:* **Felipe Perecin** (FZEA-USP)

*Comitê científico:* **Paula de Carvalho Papa** (FMVZ-USP)

*Comitê científico:* **José Eduardo Portela Santos** (University of Florida)

**Editores**

Felipe Perecin

Paula de Carvalho Papa

José Eduardo Portela Santos

**Diagramação e organização dos Anais**

José de oliveira Carvalho

**Coordenadores de Workshop SBTE**

Edmundo Rocha Vilela

Fernanda da Cruz Landim

Mario Binelli

Roberto Sartori

Yeda Watanabe

**Revisores de Artigos**

Bruno Moura Monteiro

Cliff Lamb

Danila Barreiro Campos

Fabiana Fernandes Bressan

Flávia Lombardi Lopes

Flávio Vieira Meirelles

Inês Cristina Giometti

Jeffrey Stevenson

José Eduardo Portela Santos,

Juliano Coelho da Silveira

Liza Margareth Medeiros de Carvalho Sousa

Marcelo Marcondes Seneda

Mateus José Sudano

Paula de Carvalho Papa

Rafael Sisoneto Bisinotto,

Rubens Paes Arruda

William W. Thatcher

## **Coordenadores de Avaliação de Resumos**

André Furugen Cesar de Andrade  
Antônio Chaves de Assis Neto  
Clara Slade Oliveira  
Danila Barreiro Campos  
Dimitrios Rizos  
Fernanda da Cruz Landim

Gisele Zoccal Mingoti  
Luciana Simões Rafagnin Marinho  
Luiz Gustavo Siqueira  
Manoel Francisco de Sá Filho  
Marcella Pecora Milazzotto

## **Revisores de Resumos**

Alexandre Rossetto Garcia  
André Luís Rios Rodrigues  
Anna Carolina Denicol  
Antônio Chaves de Assis Neto  
Beatriz Caetano da Silva Leão  
Bernardo Gasperin  
Bruna C. Rios Alves  
Bruna de Vita  
Camila Infantosi Vannucchi  
Carla Fredrichsen Moya  
Carlos Eduardo Ambrósio  
Carlos Frederico Martins  
Carlos Otavio de Paula Vasconcelos  
Clara Ana Santos Monteiro  
Claudia Barbosa Fernandes  
Claudia Lima Verde Leal  
Claudia Maria Bertan Membrive  
Daniele dos Santos Martins  
Danila Barreiro Campos  
Danilo José Ayres de Menezes  
Domenico Vecchio  
Eduardo Kenji N Arashiro  
Eduardo Souza Ribeiro  
Eneiva Carla Carvalho Celeghini  
Eriklis Nogueira  
Fabiana Fernandes Bressan  
Fábio Lima  
Fabiola Freitas Paula Lopes  
Felipe Perecin  
Felipe Zandonadi  
Fernanda Patricia Gottardi  
Flavia Lombardi Lopes  
Gabriel Bó  
Gabriela Ramos Leal  
Guilherme Pugliesi  
Henderson Ayres  
Ivan Bianchi  
João Henrique Moreira Viana  
José Eduardo Portela Santos  
Jose Luiz Moraes Vasconcelos  
José Nélío S. Sales

Juliana Corrêa Borges Silva  
Lais Mendes Vieira  
Lindsay Unno Gimenes  
Liza Margareth Medeiros De Carvalho Sousa  
Luciana Simões Rafagnin Marinho  
Luiz Francisco Machado Pfeifer  
Luiz Sergio Almeida Camargo  
Maite del Collado Barrondo  
Marcella Pecora Milazzotto  
Marcelo Fabio Gouveia Nogueira  
Marcelo Marcondes Seneda  
Marcílio Nichi  
Marco Aurélio Carneiro Meira Bergamaschi  
Marcos Henrique Barreta  
Marcos Roberto Chiaratti  
Margot Alves Nunes Dode  
Maria Emília Franco de Oliveira  
Mariana Marques Groke  
Marilu Martins Gioso  
Marina Landim Alvarenga  
Marina Ragagnin de Lima  
Mateus Jose Sudano  
Mayra Elena Ortiz D`Avila Assumpção  
Miller Pereira Palhão  
Monique Mendes Guardieiro  
Nadja Gomes Alves  
Naiara Zoccal Saraiva  
Nathalia Alves de Souza Rocha Frigoni  
Nelcio Antonio Tonizza de Carvalho  
Paula Alvares Lunardelli  
paula de Carvalho Papa  
Pedro Leopoldo Monteiro Jr  
Raquel Varella Serapião  
Ricarda Maria dos Santos  
Rita de Cássia Soares Cardoso  
Rui Machado  
Simone Maria Massami Kitamura Martins  
Valério Marques Portela  
Veronique Duranthon  
Vilceu Bordignon  
Werner Giehl Glanzner

## Equipe

Marcos Maioli  
Julia Cestari Pierucci  
Rodrigo dos Santos Albuquerque  
Ana Caroline Soares  
Milena Lopes Oliveira  
Francislaine Garcia  
Larissa Marchiori Sena

Narian Romanello  
Gabriella Mamede Andrade  
Thiago Martins  
Moana França  
Beatriz Cardoso  
Mariana Sponchiado

## Apoio Financeiro e Condomínio Empresarial

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)  
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)  
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Biodux Laboratórios  
Biogenesis Bagó  
Hertape Calier  
J.A. Saúde Animal  
MSD Saúde Animal  
Ourofino Saúde Animal  
Spectrun  
União Química  
WTA  
Zoetis  
IVP  
CRI Genética





## Conteúdo

### ARTIGOS DA CONFERÊNCIA PRINCIPAL

<b>Desafios globais para o século XXI: o papel e a estratégia do setor agropecuário</b>	<b>36</b>
R. Webb, J. Buratini	
<b>A importância da progesterona e de fatores derivados do conceito para a sobrevivência e desenvolvimento do concepto</b>	<b>46</b>
P. Lonergan, N. Forde, T.E. Spencer	
<b>Estratégias para evitar afogamento na inundação de dados do sequenciamento de profundidade</b>	<b>56</b>
S. Bauersachs	
<b>Diferenças endócrinas e metabólicas entre vacas <i>Bos taurus</i> e <i>Bos indicus</i> e implicações para o manejo reprodutivo</b>	<b>64</b>
R. Sartori, P.L.J. Monteiro Jr., M.C. Wiltbank	
<b>Usos de novas ferramentas analíticas para produção de melhores embriões <i>in vitro</i></b>	<b>78</b>
J.R. Herrick, E. Silva, R.L. Krisher	
<b>Aspectos funcionais do plasma seminal e proteínas espermáticas e seu potencial como marcadores moleculares da fertilidade</b>	<b>88</b>
A.A. Moura, E. Memili	
<b>Marcadores de gestação: como podemos detectar prenhez em bovinos usando glicoproteínas associadas à gestação (PAGs) e microRNAs?</b>	<b>97</b>
S.T. Reese, M.C. Pereira, J.L.M. Vasconcelos, M.F. Smith, J.A. Green, T.W. Geary, R.F.G. Peres, G.A. Perry, K.G. Pohler	
<b>Efeito da maturação do folículo pré-ovulatório no estabelecimento da prenhez em bovinos: o papel da competência oocitária e do ambiente materno</b>	<b>107</b>
S.E. Dickinson, T.W. Geary, J.M. Monnig, K.G. Pohler, J.A. Green, M.F. Smith	
<b>Manutenção ou regressão do corpo lúteo durante vários períodos decisivos da prenhez bovina</b>	<b>115</b>
M.C. Wiltbank, R. Median, J. Ochoa, G.M. Baez, J.O. Giordano, J.C.P. Ferreira, R. Sartori	
<b>Dinâmica de metilação do DNA durante o desenvolvimento do oócito e do embrião e sua associação com alterações induzidas pelo ambiente</b>	<b>132</b>
T. Fair	
<b>Dinâmica e papel dos microRNAs durante o desenvolvimento folicular em mamíferos</b>	<b>140</b>
S. Gebremedhn, H. O. Pandey, D. Salilew-wondim, M. Hoelker, K. Schellander, D. Tesfaye	
<b>Avanços e limitações da produção <i>in vitro</i> de embriões ovinos e caprinos</b>	<b>148</b>
A. Menchaca, N. Barrera, P.C. dos Santos Neto, F. Cuadro, M. Crispo	
<b>Sistemas de cultivo <i>in vitro</i>: quão longe estamos das condições ideais?</b>	<b>155</b>
C. Wrenzycki	
<b>Programas de fertilidade para vacas de leite, suas bases fisiológicas e os fatores críticos para seu sucesso</b>	<b>160</b>
J.P.N. Martins, J.R. Pursley	
<b>Aspectos e Mecanismos da Baixa Fertilidade em Vacas Anovulatórias</b>	<b>168</b>
J. E.P. Santos, M.C. Wiltbank, E.S. Ribeiro, R. S. Bisinotto	



## RESUMOS

### WORKSHOP “PROSEANDO COM O EMBRIÃO IN VIVO: OS IDIOMAS TUBÁRICO E UTERINO” (IV WORKSHOP DO PROJETO TEMÁTICO ASSINATURAS DA RECEPTIVIDADE)

RESUMO	PÁGINA
<b>A Transcriptômica do Oviduto</b>	<b>179</b>
Dimitrios Rizos, Veronica Maillio, Patrick Lonergan	
<b>Transcriptoma e morfologia do oviduto em vacas de corte de alta e baixa fertilidade</b>	<b>179</b>
Angela María Gonella-Díaz; Sônia Cristina da Silva Andrade; Mariana Sponchiado; Júlio Cesar de Carvalho Balieiro; Nilton Pedro dos Santos; Guilherme Pugliesi; Fernando Silveira Mesquita; Veerle Van Hoeck; Ricardo de Francisco Strefezzi; Gustavo R. Gasparin; Luiz L. Coutinho; Mario Binelli	
<b>Análise do perfil de microRNAs no oviduto de vacas de corte de alta e baixa fertilidade</b>	<b>180</b>
Angela María Gonella-Díaz; Sônia Cristina da Silva Andrade; Mariana Sponchiado; Júlio Cesar de Carvalho Balieiro; Nilton Pedro dos Santos; Guilherme Pugliesi; Fernando Silveira Mesquita; Veerle Van Hoeck; Ricardo de Francisco Strefezzi; Gustavo R. Gasparin; Luiz L. Coutinho; Mario Binelli	
<b>O perfil endócrino peri-ovulatório altera a expressão da DICER e AGO4 mas não de AGO1, AGO2 ou XPO5 no oviduto bovino.</b>	<b>180</b>
Kauê Ribeiro da Silva; Angela María Gonella-Díaz; Mario Binelli	
<b>Interações materno-embrionárias e estabelecimento da gestação em bovinos</b>	<b>181</b>
P. Lonergan; D. Mathew; C. Passaro; J.M. Sanchez; N. Forde	
<b>Suplementação com progesterona de longa ação no início do diestro em vacas de corte: efeitos na fertilidade em programas de IATF e TETF</b>	<b>181</b>
Guilherme Pugliesi; Thiago Martins; Felipe Barbosa Santos; Júlio César Barboza da Silva; Thiago Nishimura; José Ricardo de Garla Maio; Mario Binelli	
<b>Efeito da IA sobre a incidência de luteólise precoce de vacas suplementadas com P4 no diestro inicial</b>	<b>182</b>
Thiago Martins; Guilherme Pugliesi; Mariana Sponchiado; Beatriz Cardoso; Kauê Ribeiro da Silva; Nathália Souza Gomes; Fabian D. Cuellar Cuadros; Maressa Izabel S. da Silva; Barbara Piffero Mello; Diego Kenji C. Miyai; Mario Binelli	
<b>Controle molecular da luteólise antecipada em vacas Nelore (<i>Bos indicus</i>) suplementadas com progesterona injetável de longa ação durante o início da fase luteínica</b>	<b>183</b>
Emiliana Oliveira Santana Batista; Beatriz Cardoso; Milena Lopes Oliveira; Fabian David Cuellar Cuadros; Lorena G. Zapata <sup>2</sup> ; Maressa Izabel Santos da Silva; Barbara Piffero Mello; Mariana Sponchiado; Diego Kenji Codá Miyai; Guilherme Pugliesi; Mario Binelli	
<b>Cytobrush: uma ferramenta para avaliação molecular do endométrio bovino</b>	<b>183</b>
Beatriz Cardoso; Guilherme Pugliesi; Milena Lopes Oliveira; Emiliana Oliveira Santana Batista; Mario Binelli	
<b>Sistema Imune Materno e Gestação em Bovinos</b>	<b>184</b>
Trudee Fair	
<b>A assinatura transcricional espaço-específica do funcionamento do endométrio bovino 7 dias após a inseminação</b>	<b>184</b>
Mariana Sponchiado; Nathália Souza Gomes; Guilherme Pugliesi; Thiago Martins; Maite del Collado; Roney dos Santos Ramos; Moana Rodrigues França; Milena Lopes Oliveira; Angela María Gonella-Díaz; Kauê Ribeiro; Fabian David Cuellar Cuadros; Patrícia Kubo Fontes; Athos Pastore; Marcelo Nogueira; Mario Binelli	
<b>Histotrofo e receptividade uterina</b>	<b>185</b>
Thiago Martins; Guilherme Pugliesi; Mariana Sponchiado; Frederich Diaz Rodriguez; Roney Ramos; Ângela Maria Gonella-Díaz; Alejandro Ojeda Rojas; Andréa Cristina Basso; Júlio César Barboza da Silva; Paulo Fantinato Neto; Mario Binelli	
<b>Perfis endócrinos peri-ovulatórios influenciam o transporte, metabolismo e disponibilidade de aminoácidos no lúmen uterino de vacas de corte durante o diestro inicial</b>	<b>186</b>
Moana Rodrigues França; Maressa Izabel Santos da Silva; Guilherme Pugliesi; Veerle Van Hoeck; Mario Binelli	
<b>Estudo dos mecanismos de ação pelos quais o estradiol estimula síntese de PGF2α endometrial em fêmeas bovinas</b>	<b>186</b>

Milena Lopes Oliveira; Barbara Piffero Mello; Guilherme Pugliesi; Roney dos Santos Ramos; Saara Carollina Scolari; Ângela Maria Gonella-Díaz; Mario Binelli; Cláudia Maria Bertan Membrive	
<b>Explorando o transcriptoma endometrial durante o período de pré-implantação</b>	<b>187</b>
Stefan Bauersachs	
<b>Função luteal e aspectos morfofuncionais da interação embrio-/feto-maternal em caninos</b>	<b>187</b>
Mariusz Kowalewski	
<b>Insulina e função do corpo lúteo: insights a partir de estudos em vacas e cadelas</b>	<b>188</b>
Sousa, LMMC; Silva, RS; Bonfim Neto, A; Cardoso, APMM; Papa, PC	
<b>Suplementação com semente de girassol promove modificações endometriais e aumenta a taxa de concepção em fêmeas bovinas de corte</b>	<b>189</b>
Mariângela B. Cordeiro; Mariana S. Peres; Johnny M. de Souza; Leriana G. Reis; Manoel F. Sá Filho; Milton M. Filho; Guilherme P. Nogueira; Guilherme Pugliesi; Mario Binelli; Claudia M. B. Membrive	

#### IATF, TETF e IA

RESUMO	Nº DE SUBMISSÃO		PÁGINA
SBTE 001	1457	<b>Eficiência reprodutiva de vacas nelores submetidas à IATF e repasse com touros</b> Joaquim Esquerdo Ferreira; Otávia Reis Silva; Samuel Rodrigues Bonamichi Couto; Lara Nogueira Silencio; Marco Roberto Bourg Mello	<b>189</b>
SBTE 002	1459	<b>Efeito do prolongamento do proestro em protocolos estradiol e progesterona sobre a taxa de prenhes em novilhas <i>Bos taurus</i></b> Juan Manuel Persico; Guillermo Esperanza; Juan Cruz Muriel; Gabriel Amilcar Bó; Santiago Callejas	<b>190</b>
SBTE 003	1466	<b>Redução do custo em programas de IATF substituindo a fonte de progestágeno em vacas leiteiras</b> João Paulo Nascimento Andrade; Fabiana Sonnewend; João Paulo Moraes Ferreira; Otávia Reis Silva; Osvaldo Almeida Resende; Rosane Scatanburlo Lizieire Fajardo; Marco Roberto Bourg Mello	<b>190</b>
SBTE 004	1467	<b>A análise computadorizada da motilidade espermática apresenta boa capacidade de predição da fertilidade do sêmen para PIV ou IATF?</b> Leticia Zoccolaro Oliveira; Janaina Torres Carreira; Halim Atique Netto; Rogerio Fonseca Guimaraes Peres; Hugo Borges Graff; Fabio Morato Monteiro; Erika Aline Ribeiro Dias; Clara Slade Oliveira; Rubens Paes de Arruda	<b>191</b>
SBTE 005	1468	<b>Retenção de placenta e endometrite subclínica: prevalência e relação com o desempenho reprodutivo de vacas leiteiras mestiças</b> Rodrigo Rossini Buso; Carla Cristian Campos; Thaisa Reis Santos; Tatiane Silva Maia; João Paulo Elsen Saut; Ricarda Maria Santos	<b>192</b>
SBTE 006	1469	<b>Uso de protocolos hormonais para indução da puberdade em novilhas nelores e seu impacto sobre a taxa de prenhez (Relato de caso)</b> João Paulo Moraes Ferreira; João Paulo Nascimento Andrade; Fabiana Sonnewend; Otávia Reis Silva; Marco Roberto Bourg Mello	<b>192</b>
SBTE 007	1475	<b>Inseminação cervical profunda em ovelhas leiteiras sincronizadas com dispositivos intravaginais sem uso de antibiótico (dados parciais)</b> Renata Casali; Luana Zanferari; Maicon Lorena Gaissler Pinto; Rafael Toazza; Paulo Gregianin; Gabriel Bittencourt Camargo; Giselle Dias; Alceu Mezzalana	<b>192</b>
SBTE 008	1477	<b>Efeito da suplementação à base de milho por 41 dias durante o início do protocolo de IATF no perfil metabólico e desempenho reprodutivo de fêmeas nelore</b> Rogerio Fonseca Guimaraes Peres; Rafael Carvalho; Hugo Borges Graff; Jose Humberto Furlan Junior; Adnan Darin Pereira Rodrigues;	<b>193</b>

		Gessica Araujo Franco; Duane Keisler; Michael F Smith; Ky Pohler; Jose Luiz Moraes Vasconcelos	
SBTE 009	1480	<b>Indutores de ovulação em protocolo de curta duração em ovelhas de leite</b> Luana Zanferari; Renata Casali; Rafael Toazza; Giselle Dias; Guilherme dos Santos; Paulo Gregianin; Alceu Mezzalira	<b>194</b>
SBTE 010	1485	<b>Impacto na manifestação de estro, diâmetro do folículo ovulatório, taxa de ovulação e prenhez utilizando CE ou GnRH como indutores da ovulação em protocolos de IATF em novilhas de corte</b> Eduardo Pradebon da Silva; Marcelo Maronna Dias; Amanda Bilha Machado; Lais Steffen Gambin; Humberto Binsfeld Bonadiman; Mariana da Silva; Martin Viana Klafke; Andressa Varella Gonsioroski; Marcio Flores Cunha Chaiben; João Batista Souza Borges	<b>194</b>
SBTE 011	1487	<b>Ressincronização em ovelhas: efeito sobre a função luteal e taxa de prenhez</b> Vladinis Oliveira Miranda; Fernando Caetano de Oliveira; Karina Lemos Goularte; Jenniffer Hauschildt Dias; Henrique Schneider Pestano; Carlos Eduardo Ranquetat Ferreira; Sergio Farias Vargas Jr; Thomaz Lucia Jr; Arnaldo Diniz Vieira; Bernardo Garziera Gasperin	<b>195</b>
SBTE 012	1494	<b>Aumento da recuperação embrionária e da qualidade dos embriões após tratamento intrauterino: relato de caso</b> Otávia Reis Silva; Hellen de Sousa Fernandez; Joaquim Esquerdo Ferreira; Marco Roberto Bourg Mello	<b>196</b>
SBTE 013	1499	<b>Efeito do hCG em baixas doses na dinâmica folicular e ovulação em durante o estro em ovelhas sincronizadas no anestro</b> José Francisco Cox; Jesús Dorado; Fernando Saravia	<b>196</b>
SBTE 014	1500	<b>Avaliação do atraso do momento da inseminação em novilhas nelore cíclicas que não apresentaram cio após a remoção do dispositivo de P4</b> João Paulo Mendes Lollato; Talita Lara Conti; Reuel Luiz Gonçalves; Guilherme Pizzo Santos; Juan Manuel Rodriguez Persico; Arlindo José Saran Junior; José Nélio de Sousa Sales; Pietro Sampaio Baruselli; Roberta Machado Ferreira	<b>197</b>
SBTE 015	1501	<b>Indução de ciclicidade em novilhas nelore pré-púberes com dispositivo cronipres® mono dose com 1 g de P4 novo ou previamente utilizado por 8 dias</b> Reuel Luiz Gonçalves; Talita Lara Conti; Guilherme Pizzo Santos; Juan Manuel Rodriguez Persico; Arlindo José Saran Junior; José Nélio de Sousa Sales; Pietro Sampaio Baruselli; Roberta Machado Ferreira	<b>197</b>
SBTE 016	1502	<b>Redução das doses de benzoato de estradiol e PGF2 em protocolos de IATF de novilhas nelore cíclicas tratadas com dispositivo cronipres® mono dose com 1g de P4</b> Roberta Machado Ferreira; Talita Lara Conti; Arlindo José Saran Junior; Reuel Luiz Gonçalves; Guilherme Pizzo Santos; Juan Manuel Rodriguez Persico; José Nélio de Sousa Sales; Pietro Sampaio Baruselli	<b>198</b>
SBTE 017	1503	<b>Comparação da taxa de concepção de novilhas nelore cíclicas com ou sem CL no início do protocolo de IATF com dispositivo intravaginal cronipres® mono dose com 1g de P4</b> Arlindo José Saran Junior; Talita Lara Conti; Reuel Luiz Gonçalves; Guilherme Pizzo Santos; Juan Manuel Rodriguez Persico; José Nélio de Sousa Sales; Pietro Sampaio Baruselli; Roberta Machado Ferreira	<b>199</b>
SBTE 018	1504	<b>Efeito do uso de PGF2α no D0 e diferentes doses de eCG no D8 de protocolos de IATF com dispositivo cronipres® mono dose 1g sobre a taxa de concepção de novilhas nelore cíclicas</b>	<b>199</b>

		Renato Wihby Giroto; Talita Lara Conti; Althuir Arthur Schneider; José Luiz Baldassari Leite Neto; Reuel Luiz Gonçalves; Guilherme Pizzo Santos; Juan Manuel Rodriguez Persico; José Nélío de Sousa Sales; Pietro Sampaio Baruselli; Roberta Machado Ferreira	
SBTE 019	1505	<b>Comparação da taxa de concepção de novilhas nelore cíclicas tratadas com dispositivo cronipres® mono dose com 0,558g ou 1g de progesterona</b> Talita Lara Conti; Arlindo José Saran Junior; Reuel Luiz Gonçalves; Guilherme Pizzo Santos; Juan Manuel Rodriguez Persico; José Nélío de Sousa Sales; Pietro Sampaio Baruselli; Roberta Machado Ferreira	<b>200</b>
SBTE 020	1506	<b>Comparativo da taxa de prenhez entre inseminação artificial em tempo fixo e monta natural no estado de Sergipe</b> Felipe Costa Almeida; Fábio Franco Almeida; Daniel Castro Burgos; André Mariano Batista; Sildivane Valcácia Silva	<b>200</b>
SBTE 021	1511	<b>A qualidade do sêmen utilizado na IATF é capaz de alterar a concentração sérica de proteína de fase aguda?</b> Eneiva Carla Carvalho Celeghini; Bruna Marcele Oliveira; Rubens Paes De Arruda; Milton Maturana Filho; Daniela Becker Birgel; Fabio Celidonio Pogliani; Eduardo Harry Birgel Junior	<b>201</b>
SBTE 022	1524	<b>Refluxo de espermatozoides em bainhas utilizadas para inseminação artificial em bovinos</b> Gilson Antonio Pessoa; Ana Paula Martini; Aline Policarpo Baioco; Trajano Gomes Jacques; Jean Mussoi Weigert; Thainá Minela; Carlos Eduardo Porciuncula Leonardi; Manoel Francisco Sá Filho; Mara Iolanda Batistella Rubin	<b>202</b>
SBTE 023	1542	<b>Características da dinâmica folicular de novilhas girolandas submetidas a diferentes protocolos de IATF</b> Sílvio Costa e Silva; Alan Maia Borges; Emílio César Martins Pereira; Ricarda Maria Santos; Fernanda Augusta de Oliveira Silva; Jordana Lemos Andrade De Andrade; Giselle Maria Souza; Deize de Cássia Antonino; Alex De Matos Teixeira	<b>202</b>
SBTE 024	1543	<b>Avaliação da taxa de prenhez de vacas <i>Bos indicus</i> submetidas à sincronização da ovulação com progesterona injetável</b> Marcelo Marcondes Seneda; Jefferson Tadeu Campos; Fabio Morotti; Camila Bortoliero Costa; Larissa Zamparone Bergamo; Nathalia Covre da Silva	<b>203</b>
SBTE 025	1549	<b>Sincronização da ovulação com o protocolo 5-day PRID® para o primeiro serviço diminuiu a idade ao primeiro parto e os custos de criação de novilhas holandesas</b> Carlos Eduardo Cardoso Consentini; Paulo David Carvalho; Vanda Santos; Rafael Vilella Barletta; Carolina Maia; Bruno Carneiro; Alessio Valenza; Alexandre Henryli Souza; Paul Milton Fricke	<b>203</b>
SBTE 026	1555	<b>Efeito de diferentes tipos de gonadotrofinas na taxa de prenhez de vacas nelore paridas submetidas à IATF</b> Izaías Claro Junior; Lucas Sartor Valino; Fabrício Martini Mantelo; Lucas Cutaia; Santiago Pérez Wallace; Jose Luiz Moraes Vasconcelos	<b>204</b>
SBTE 027	1556	<b>Taxa de prenhez à IATF de novilhas nelore e cruzadas submetidas ao protocolo J-Synch (6 DIAS)</b> Jessica Cristina Lemos Motta; Marcos Henrique Alcantara Colli; Luciano Penteado; Bernardo Marcozzi Bayeux; Rodolfo Daniel Mingoti; Gabriel Amilcar Bó; Lisbek Cruz Lugo; Romulo Germano Rezende; Pietro Sampaio Baruselli	<b>204</b>
SBTE 028	1559	<b>Influência do diâmetro do folículo dominante 48 horas após a retirada do dispositivo de progesterona na dinâmica folicular de vacas <i>Bos indicus</i> submetidas a protocolo de sincronização da ovulação</b> Luiz Manoel Souza Simões; Miguel Pizzolante Bottino; Gabriel A Crepaldi; Renato Wihby Giroto; Pietro Sampaio Baruselli; José Nélío De Sousa Sales	<b>205</b>

SBTE 029	1561	<b>Fertilidade de ovelhas texel sincronizadas com progesterona, melengestrol ou acetato de medroxi-progesterona</b> Eliaana Burtet Parmeggiani; Matheus Meneghello Carvalho Bernardes; Guilherme Meneghello Carvalho Bernardes; Amanda Souto Tatsh; Ana Paula Martini; Mara Iolanda Batistella Rubin; Gilson Antonio Pessoa	<b>205</b>
SBTE 030	1565	<b>Efeito da suplementação mineral e vitamínica injetável (kit adaptador® MIN e adaptador® VIT, Biogénesis Bagó) sobre as taxas de prenhez em vacas de corte</b> Milton Maturana Filho; Kleber Menegon Lemes; Manuel Agustin Silva; Thiago Santin; Reuel Luiz Gonçalves; Guillermo Alberto Mattioli; Joao Paulo Mendes Lollato; Juan Manuel Persico; Ed Hoffmann Madureira	<b>206</b>
SBTE 031	1574	<b>Desempenho reprodutivo em uma fazenda orgânica de produção de leite no sul dos Estados Unidos</b> Roney Santos Ramos; Kelsey Bryan; Juan Velez; Mario Binelli; Pablo Pinedo	<b>207</b>
SBTE 032	1577	<b>Taxa de concepção, perdas de gestação e proporção de fêmeas nascidas em rebanhos leiteiros, que utilizam inseminação artificial ou transferência de embriões <i>in vitro</i> como técnica reprodutiva para vacas em lactação</b> Marcos Henrique Colombo Pereira; Maurício Silveira Coelho	<b>207</b>
SBTE 033	1580	<b>Capacidade da dupla dose de PGF2<math>\alpha</math> associada ao eCG em ajustar o proestro de vacas mestiças submetidas a um protocolo de IATF</b> Gabriel Felipe Oliveira de Menezes; Alexandra Soares Rodrigues; Mariana Alves de Andrade Silva; Tiago Oliveira Brandão; Aloisio Bitencourt Nascimento; Bia Santos Souza Carôso; Ailton Batista Pereira; Rodrigo Freitas Bittencourt; Marcos Chalhoub; Antonio de Lisboa Ribeiro Filho	<b>208</b>
SBTE 034	1582	<b>Semên bovino refrigerado utilizado na IATF contendo ou não glicerol no diluidor</b> Juliana Correa Borges; Marcio Ribeiro Silva; Erikliis Nogueira; Deiler Sampaio Costa; Luiz Orcirio Fialho de Oliveira; Urbano Pinto Gomes De Abreu; Daniel Barros Marinho; Roberto Sartori	<b>209</b>
SBTE 035	1585	<b>O momento da expressão de estro impacta na fertilidade de protocolo de IATF?</b> Carlos Alberto Rodrigues; Marcos Henrique Colombo Pereira; Camila Bortoletto; Andressa Lavezzo Ranieri	<b>209</b>
SBTE 036	1587	<b>Progesterona injetável pode ser utilizada para indução de ciclicidade em novilhas da raça nelore</b> Augusto Rodrigues Felisbino Neto; Bruno Gonzalez de Freitas; Roney Santos Ramos; Marcus Luciano Guimarães Rezende; Rogério Fonseca Guimarães Peres; João Pozzobon; Denis Fernando; Michele Richeri Bastos	<b>210</b>
SBTE 037	1592	<b>Inseminação artificial intrauterina transcervical com cio induzido em cadela (relato de caso)</b> Elenara Botelho Araujo; Haroldo Francisco Lobato Ribeiro; Sebastião Tavares Rolim Filho; Anelise Sarges Ramos	<b>210</b>
SBTE 038	1594	<b>IATF aumenta a eficiência reprodutiva em sistemas intensivos de produção de leite a pasto</b> Maicon Lorena Gaissler Pinto; Lucas Ramos; Fabricio D. Mozzaquatro	<b>211</b>
SBTE 039	1595	<b>Ressincronização 22 dias após a primeira IATF em fêmeas bubalinas, criadas extensivamente em terras alagadas no estado do Amapá, Amazônia</b> Wilton Figueiredo Lima; Gustavo Alighiere Lopes Silva; Haroldo Francisco Lobato Ribeiro; Sebastião Tavares Rolim Filho; Marina Bezerra Macêdo; Elaine Ferreira Mesquita; Anelise Sarges Ramos; Raphael Castro Conde; Victor da Costa Mileo	<b>211</b>

SBTE 040	1598	<b>Avaliação do efeito da administração de três diferentes preparações comerciais de eCG na taxa de prenhez à IATF de vacas da raça nelore</b> Antonio Francisco Chaves Neto; Bruno Junhiti Castro Watanabe; Bruno Gonzalez De Freitas; Roney Santos Ramos; Marcus Luciano Guimarães Rezende; Rodolfo Daniel Mingoti; Michele Richeri Bastos	<b>212</b>
SBTE 041	1602	<b>Utilização de embriões produzidos <i>in vitro</i> com sêmen sexado – aplicação da técnica para produção de bezerros de corte superiores</b> Alexandre de Oliveira Bezerra; Walvonvitis Baes Rodrigues; Juliana Correa Borges; Luiz Orcirio Fialho de Oliveira; Urbano Pinto Gomes de Abreu; Natalia Albanese Anache; Karine Casanova Da Silva; Alessandra Corallo Nicacio; Erikliis Nogueira	<b>213</b>
SBTE 042	1603	<b>Taxa de prenhez à IATF de vacas nelore (<i>Bos indicus</i>) submetidas ao protocolo de 3 ou 4 manejos com CIDR® ou Sincrogest® novos e reutilizados</b> Rodolfo Daniel Mingoti; Bruno Gonzalez de Freitas; Roney Santos Ramos; Michele Richeri Bastos; Alessandra Ambrósio Teixeira; Marcus Luciano Guimarães Rezende; Marcio Wasilewski de Castro; Anderson Faquim; Manoel Francisco Sá Filho; Pietro Sampaio Baruselli	<b>213</b>
SBTE 043	1608	<b>Validação de testes de bioatividade <i>in vivo</i> em ratas e novilhas de diferentes preparações comerciais de eCG</b> Michele Richeri Bastos; Ana Claudia Carreira; Marcus Luciano Guimarães Rezende; Roney Santos Ramos; Bruno Gonzalez de Freitas; Rodolfo Daniel Mingoti; Mari Cleide Sogayar; Pietro Sampaio Baruselli	<b>214</b>
SBTE 044	1610	<b>GnRH pode aumentar o controle da ovulação em ovelhas sincronizadas com um tratamento curto a base de progesterona</b> Jesús Manuel Dorado; José Francisco Cox; Fernando R Saravia	<b>214</b>
SBTE 045	1615	<b>Efeito do escore de condição corporal nas taxas de prenhez de fêmeas de corte no RS</b> Mariani Farias Fiorenza; Thainá Minela; Mariê Wolski Cabral; Janislene Mach Trentin; Ricardo Olimpio Schenatto; Laurence Boligon de Araujo; Julia Brum Spreckelsen Casarin; Ana Paula Martini; Gilson Antonio Pessoa; Mara Iolanda Batistella Rubin	<b>215</b>
SBTE 046	1616	<b>Efeito da administração de PGF2α no início do protocolo de IATF e do dispositivo intravaginal de progesterona (Fertilcare 600®) em novilhas da raça nelore (<i>Bos indicus</i>)</b> Alessandra Ambrósio Teixeira; Lais Mendes Vieira; Rodolfo Daniel Mingoti; Romulo Germano Rezende; Jessica Cristina Lemos Motta; Renato Wihby Giroto; Pietro Sampaio Baruselli	<b>216</b>
SBTE 047	1619	<b>Taxa de prenhez de vacas nelore sincronizadas com dispositivos de progesterona ou implantes de progestágeno novos ou usados por oito ou nove dias</b> João Paulo Barbuio; Renato Wihby Giroto; Márcio de Oliveira Marques; Luciano Penteado; Romulo Germano Rezende; Rodolfo Daniel Mingoti; Lais Mendes Vieira; Marcos Henrique Alcantara Colli; Pietro Sampaio Baruselli	<b>216</b>
SBTE 048	1621	<b>Gonodotrofina coriônica equina (eCG) na IATF em bovinos de corte: estudo retrospectivo</b> Janislene Mach Trentin; Ricardo Olimpio Schenatto; Laurence Boligon De Araujo; Mariani Farias Fiorenza; Aline Policarpo Baioco; Trajano Gomes Jacques; Julia Brum Spreckelsen Casarin; Ana Paula Martini; Gilson Antonio Pessoa; Mara Iolanda Batistella Rubin	<b>217</b>

SBTE 049	1626	<b>Pré-sincronização com folículo persistente em protocolos de sincronização da ovulação a base de GnRH e PGF em vacas de leite em lactação</b>	<b>217</b>
		Luiz Augusto Capellari Leite da Silva; Ingris Yohana Hernández Martínez; Luiz Manoel Souza Simões; Miguel Pizzolante Bottino; Gabriela Santos; Thomaz Teixeira De Almeida; Ana Paula Castro; José Nélío de Sousa Sales	
SBTE 050	1630	<b>Dinâmica folicular de novilhas nelore submetidas a ressincronização da ovulação com acetato de lecorelina</b>	<b>218</b>
		Thales Ricardo Rigo Barreiros; Carla Rossi Laurini; Felipe Pereira Vianna; Luiz Aguinaldo Ricetto Pegorari Júnior; José Carlos Arevalo Junior; Myrian Megumy Tsunokawa Hidalgo; Henrique Goulart Ribeiro de Mendonça; Wanessa Blaschi	
SBTE 051	1634	<b>Eficiência da ressincronização da ovulação com uma ou duas aplicações de acetato de lecorelina em vacas nelore submetidas à TETF</b>	<b>219</b>
		Wanessa Blaschi; Carla Rossi Laurini; Luiz Aguinaldo Ricetto Pegorari Júnior; José Carlos Arevalo Junior; Felipe Pereira Vianna; Anna Raquel Grimas Almeida; Luiz Fernando Garro Monteiro; Douglas Gaitkoski; Thales Ricardo Rigo Barreiros	
SBTE 052	1636	<b>Taxa de parição em suínos após duas inseminações intra ou pós cervical com diferentes intervalos</b>	<b>219</b>
		Andrea Francisca Araujo; Lucas Daichoum Pais de Oliveira; Vitor Lemes Silva; Jeferson Corrêa Ribeiro; Andréia Santos Cezário; Wallacy Barbacena Rosa dos Santos; Eliandra Maria Bianchini Oliveira; Aline Sousa Camargos	
SBTE 053	1637	<b>Taxa de prenhez à IATF de novilhas cruzadas (<i>Bos taurus</i> x <i>Bos indicus</i>) submetidas ao protocolo de 3 ou 4 manejos</b>	<b>220</b>
		Marcos Henrique Alcantara Colli; Rafael Pardini Abreu Carvalhaes; Rodolfo Daniel Mingoti; Lais Mendes Vieira; Romulo Germano Rezende; Marcelo Henrique Santos; José Nélío de Sousa Sales; Pietro Sampaio Baruselli	
SBTE 054	1638	<b>Taxa de parição em suínos appis 1, 2 ou 3 inseminações</b>	<b>220</b>
		Lucas Daichoum Pais de Oliveira; Andrea Francisca Araujo; Vitor Lemes Silva; Jeferson Corrêa Ribeiro; Andréia Santos Cezário; Wallacy Barbacena Rosa dos Santos; Eliandra Maria Bianchini Oliveira; Aline Sousa Camargos	
SBTE 055	1641	<b>Indução da ciclicidade em novilhas <i>Bos taurus</i> com acetato de melengestrol (MGA)</b>	<b>221</b>
		Ana Paula Martini; Carlos Eduardo Porciuncula Leonardi; Laurence Boligon de Araujo; Nayrema Maciel; Taison Souza Balestrin; Simone Callai Muller; Izaias Claro junior; Mara Iolanda Batistella Rubin; Gilson Antonio Pessoa	
SBTE 056	1644	<b>Avaliação morfofuncional do corpo lúteo e utilização da ultrassonografia Doppler como ferramenta para predição de gestação 20 dias pós IATF em vacas mestiças</b>	<b>222</b>
		Alexandra Soares Rodrigues; Mariana Alves de Andrade Silva; Tiago Oliveira Brandão; Elisiane Sateles Santos; Luiz Di Paolo Maggitti Junior; Eliardo Rodrigues Flores; João Batista Ribeiro da Silva; Rodrigo Freitas Bittencourt; Marcos Chalhoub; Antonio de Lisboa Ribeiro Filho	
SBTE 057	1645	<b>Avaliação da influência do escore de condição corporal (eCC) sobre a ciclicidade e a taxa de prenhes de vacas nelore submetidas ao programa de inseminação artificial em tempo fixo (IATF)</b>	<b>222</b>
		Rafael Rodrigues Corrêa; Gabriel Artur Marciano do Nascimento; Marcos Paulo Garcia	
SBTE 058	1646	<b>Efeito de diferentes fontes e concentrações de progesterona na taxa de prenhez de vacas holandesas submetidas à IATF</b>	<b>222</b>
		Lais mendes Vieira; Rodolfo Daniel Mingoti; Alessandra Ambrósio Teixeira; Romulo Germano Rezende; Jessica Cristina Lemos Motta;	



		Marcos Henrique Alcantara Colli; Luiz Gustavo Martignoni Bragança; Regis José de Carvalho; Pietro Sampaio Baruselli	
SBTE 059	1652	<b>ECG em vacas nelore: diferentes preparações comerciais e mesmas taxas de prenhez</b> Lussandro Comarella Lechinoski; Augusto Rodrigues Felisbino Neto; Leonardo Cappellesso; Bruno Gonzalez de Freitas; Roney Santos Ramos; Marcus Luciano Guimarães Rezende; Danilo Lemos Furtado; Cristiano Passarin; Bruna Martins Guerreiro; Michele Richeri Bastos	223
SBTE 060	1653	<b>Dinâmica folicular de novilhas girolando sincronizadas com diferentes dispositivos intravaginais de P4 (0,558g ou 1,9g) mantidos por 8 ou 9 dias</b> Luciana Ribeiro Peixoto; Barbara Virgínia Rodrigues Rizoto de Mattos; Tatiane Silva Maia; Lorena Martins Araújo; Jairo de Melo Júnior; Deize de Cássia Antonino; Mayara Mafra Soares; Mayara Oliveira; Alex de Matos Teixeira; Gustavo Guerino Macedo	224
SBTE 061	1655	<b>Taxa prenhez à IATF de vacas nelore (<i>Bos indicus</i>) submetidas aos protocolos de 3 ou 4 manejos com administração de PGF em diferentes momentos</b> Rafael Pardini Abreu Carvalhaes; Marcos Henrique Alcantara Colli; Thomaz Teixeira de Almeida; Rodolfo Daniel Mingoti; Lais Mendes Vieira; Marcelo Henrique Santos; José Nélío de Sousa Sales; Pietro Sampaio Baruselli	224
SBTE 062	1658	<b>Progesterona circulante, dinâmica folicular e fertilidade em vacas holandesas durante a reutilização de dispositivos intravaginais de progesterona em protocolo de IATF</b> Leonardo de França e Melo; Anibal Ballarotti Nascimento; Jessica Nora Drum; Camila Spies; Pedro Leopoldo Jerônimo Monteiro jr; Alexandre Barbieri Prata; Milo Charles Wiltbank; Roberto Sartori	225
SBTE 063	1659	<b>Impacto do cipionato de estradiol antes da iatf e da suplementação com progesterona no diestro inicial sobre as respostas ovarianas e taxa de prenhez de vacas de corte</b> Thiago Martins; Guilherme Pugliesi; João Paulo Talamoni; Jose Ricardo Garla Maio; Guilherme Paula Nogueira ; Mario Binelli	225
SBTE 064	1660	<b>Efeito da administração de progesterona após a IATF no desenvolvimento do concepto e na taxa de prenhez em búfalas lactantes</b> Diego Cavalcante de Souza; Nelcio Antonio Tonizza de Carvalho; Julia Gleyci Soares; Lais Mendes Vieira; Angela Maria Gonella-Diaza; Antenor Pereira Bonfim Neto; Ed Hoffmann Madureira; Paula de Carvalho Papa; Mario Binelli; Pietro Sampaio Baruselli	226
SBTE 065	1661	<b>Fertilidade de vacas holandesas (<i>Bos taurus</i>) repetidoras de serviço submetidas ao tratamento hormonal para indução de lactação – estudo retrospectivo</b> Regis José de Carvalho; Rodolfo Daniel Mingoti; Bernardo Marcozzi Bayeux; Romulo Germano Rezende; Jessica Cristina Lemos Motta; Henrique César Pereira Júnior; Leonardo Krauss Santana Pereira; Pietro Sampaio Baruselli	227
SBTE 066	1662	<b>Aumento da taxa de concepção com o uso de progesterona injetável de longa ação 4 dias após a IATF em vacas múltiparas e primíparas nelore paridas</b> Marcelo Seixas Cova; Lussandro Comarella Lechinoski; Wagner Saraiva Ruiz Romero; Bruno Gonzalez de Freitas; Roney Santos Ramos; Bruno Arruda Antunes; Marcus Luciano Guimarães Rezende; Rodolfo Daniel Mingoti ; Michele Richeri Bastos	227
SBTE 067	1664	<b>TETF: taxa de concepção e perda gestacional de acordo com categoria da receptora, estação do ano e estágio de desenvolvimento do embrião da raça girolando</b> Melissa Lobato Defensor; Flávio Luiz Alves Marques; Mayara Oliveira; Ricarda Maria Santos	228

SBTE 068	1666	<b>Taxa de prenhes em vacas nelore sincronizadas com dispositivo Fertilcare 1200® novo ou usado submetidas à IATF 48 ou 54 horas após a remoção do dispositivo</b> Mariana Pallú Viziack; Renato Wihby Girotto; Lais Mendes Vieira; Marcos Henrique Alcantara Colli; Rodolfo Daniel Mingoti; Romulo Germano Rezende; Manoel Francisco Sá Filho; Pietro Sampaio Baruselli	<b>229</b>
SBTE 069	1667	<b>Impacto da dose de gonadotrofina coriônica equina (300 ou 400UI) e tempo de permanência do dispositivo de progesterona (8 ou 9 dias) no crescimento folicular em protocolos de IATF com vacas <i>Bos taurus</i> de corte</b> Paula Finamor Velasquez; Gilson Antonio Pessoa; Isac Roman; Izaías Claro Junior; Cassio Aassal Brauner; Fábio Gallas Leivas; Daniela dos Santos Brum; Marcio Nunes Correa; Mara Iolanda Batistella Rubin; Manoel Francisco Sá Filho	<b>229</b>
SBTE 070	1670	<b>IATF de acordo com o diâmetro do folículo pré-ovulatório, em protocolo de quatro manejos</b> Mariana Cesca Piva; Marco Antonio Gomes de Freitas Santos; Denner Alex Sander dos Santos; Andrei Antonioni Fidelis; Ivo Pivato	<b>230</b>
SBTE 071	1671	<b>Exame ultrassonográfico e sorológico para o diagnóstico precoce da gestação em bovinos: resultados preliminares</b> Cristiano Rodrigues Borges Guimarães; Marcelo Ribeiro de Mendonça; Carlos Antônio de Carvalho Fernandes; José Antonio D. Garcia; Ester Siqueira Caixeta; Jairo Pereira Neves; João Henrique Moreira Viana; Miller Pereira Palhão	<b>230</b>
SBTE 072	1672	<b>Comparação entre DIB monodose e CIDR na taxa de prenhez de novilhas nelore precoce submetidas à IATF</b> Everton Rodolfo Carvalho; Adnan Darin Pereira Rodrigues; Izaías Claro Junior; Jose Luiz Moraes Vasconcelos	<b>231</b>
SBTE 073	1674	<b>Análise da percepção de fatores de risco para a saúde coletiva na utilização de hormônios em programas de reprodução assistida em bovinos</b> Gisele Zoccal Mingoti; Diego Lobon Jimenez Filho; Antonio Ferraud; Beatriz Caetano da Silva Leão; Nathália Alves de Souza Rocha-Frigoni; Erikliis Nogueira; Iveraldo Santos Dutra	<b>231</b>
SBTE 074	1675	<b>Dose de gonadotrofina coriônica equina (300 ou 400UI) e tempo de permanência (8 ou 9 dias) do dispositivo de progesterona em protocolos de IATF com vacas <i>Bos taurus</i> de corte lactantes: impacto na ocorrência de estro e na taxa de prenhez</b> Isac Roman; Fábio Gallas Leivas; Giovane Wolffenbüttel Carloto; Gilson Antonio Pessoa; Cassio Cassal Brauner; Lucas Balinhas Farias; Mara Iolanda Batistella Rubin; Izaías Claro Junior; Daniela dos Santos Brum; Manoel Francisco Sá Filho	<b>232</b>
SBTE 075	1677	<b>Dinâmica folicular de vacas nelore submetidas à ressincronização 14 dias após IATF utilizando P4 injetável para sincronização da onda folicular</b> Romulo Germano Rezende; Bruno Gonzalez de Freitas; Rodolfo Daniel Mingoti; Marcos Henrique Alcantara Colli; Manoel Francisco Sá Filho; João Batista Pereira Carvalho; Jessica Cristina Lemos Motta; Gustavo Guerino Macedo; Lais Mendes Vieira; Pietro Sampaio Baruselli	<b>233</b>
SBTE 076	1678	<b>Impacto da utilização de vacinas reprodutivas e da indução a ciclicidade na prenhez à IATF de novilhas de corte <i>Bos taurus</i></b> Hirya Fernandes Pinto; Giovane Wolffenbüttel Carloto; Cecília Isabel Inês Urquiza Falcão Machado; Bibiana Noal Ribas; Daniela dos Santos Brum; Ana Paula Martini; Gilson Antonio Pessoa; Mara Iolanda Batistella Rubin; Manoel Francisco Sá Filho; Fábio Gallas Leivas	<b>233</b>
SBTE 077	1682	<b>Impacto do desempenho de touros nos programas de IATF</b>	<b>234</b>

		Ricardo Olimpio Schenatto; Janislene Mach Trentin; Julia Brum Spreckelsen Casarin; Mariani Farias Fiorenza; Laurence Boligon de Araujo; Taison Souza Balestrin; Nayrema Maciel; Ana Paula Martini; Gilson Antonio Pessoa; Mara Iolanda Batistella Rubin	
SBTE 078	1684	<b>Uso de suplementação mineral injetável de glicerofosfato de sódio, fosfato monossódico e selenito de sódio durante o protocolo de sincronização da ovulação na concepção de fêmeas Nelore</b> Gustavo Guerino Macedo; Bruno Sivieri Lima; Renato Wihby Girotto; Luciana Ribeiro Peixoto; José Luiz Baldassari Leite Neto; Althuir Arthur Schneider; Arthur Guerra Silva; Giovani Pastre; Luc Durel; Tatiane Silva Maia	<b>234</b>
SBTE 079	1686	<b>Taxa de prenhez de vacas nelore submetidas à ressincronização com início 14 ou 22 dias após prévia IATF</b> Luciano Penteado; Romulo Germano Rezende; Rodolfo Daniel Mingoti; Marcos Henrique Alcantara Colli; Manoel Francisco Sá Filho; Felipe Barbosa Santos; Jessica Cristina Lemos Motta; Bernardo Marcozzi Bayeux; Lais Mendes Vieira; Pietro Sampaio Baruselli	<b>235</b>
SBTE 080	1687	<b>Escore de cio avaliado com bastões marcadores influencia as taxas de gestação de vacas nelore submetidas a protocolos de inseminação artificial em tempo fixo</b> Karine Casanova da Silva; Walvonvitis Baes Rodrigues; Ailson Sebastiao da Silva; Juliana Correa Borges; Urbano Pinto Gomes de Abreu; Dayanne Schiavi Nascimento Batista; Natália Albanese Anache; Alexandre de Oliveira Bezerra; Jean do Prado Jara; Eriklis Nogueira	<b>236</b>
SBTE 081	1688	<b>Eficiência das técnicas de manejo reprodutivo pós-inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em vacas de corte paridas</b> Walvonvitis Baes Rodrigues; Jean do Prado Jara; Juliana Correa Borges; Luiz Orcirio Fialho de Oliveira; Urbano Pinto Gomes de Abreu; Dayanne Schiavi Nascimento Batista; Natalia Albanese Anache; Karine Casanova da Silva; Alexandre de Oliveira Bezerra; Eriklis Nogueira	<b>236</b>
SBTE 082	1689	<b>Impacto da época do ano no perfil de LH e fertilidade em vacas de leite sincronizadas com diferentes tipos de análogos de GnRH (Gonadorelina vs. Buserelina)</b> Alexandre Henryli Souza; Ramon Armengol-Gelonch; J M Mallo; D Ponté; Antonio Jimenez; Alessio Valenza	<b>237</b>
SBTE 083	1692	<b>Uso da ultrassonografia color-doppler para otimizar a seleção de receptoras com melhor receptividade para transferência de embriões produzidos in vitro</b> Guilherme Pugliesi; Júlio César Barbosa Silva; Thiago Nishimura; Diego Miyai; Luciano a Silva; Mario Binelli	<b>238</b>
SBTE 084	1694	<b>Efeito do cipionato de estradiol sobre o momento da ovulação, atividade luteal e a taxa de prenhez em programas de IATF em vacas de corte</b> Diego Bosolasco; Richard Núñez Olivera; Federico Cuadro; Ana Meikle; Alejo Menchaca	<b>238</b>
SBTE 085	1695	<b>Impacto econômico da inseminação artificial associada à IATF em rebanho leiteiro acriano</b> Bruno Pena Carvalho; Claudenor Pinho de Sá; Francisco Aloísio Cavalcante; José Marques Carneiro Junior; Marcio Muniz Albano Bayma	<b>239</b>
SBTE 086	1698	<b>Aplicação de GnRh em vacas com baixa ou sem expressão de estro avaliadas com bastões marcadores aumenta a taxa de prenhez em vacas de corte submetidas a IATF</b> Eriklis Nogueira; Walvonvitis Baes Rodrigues; Ailson Sebastiao da Silva; Juliana Correa Borges; Karine Casanova da Silva; Natalia Albanese Anache; Alexandre de Oliveira Bezerra; Beatriz Caetano da	<b>239</b>

		Silva Leão; Nathália Alves de Souza Rocha-Frigoni; Gisele Zoccal Mingoti	
SBTE 087	1700	<b>Avaliação de um protocolo para inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em cabras leiteiras</b> Fernando R Saravia; F Dorado; J F Cox	<b>240</b>
SBTE 088	1704	<b>Perfil produtivo e reprodutivo das propriedades leiteiras do município de Realeza – PR</b> Adalgiza Pinto-Neto; Nelson Lima Santos jr; Fernando Skoniesky; Marcelo Falci Mota; Antônio Campanha Martinez; Luiz Sérgio Merlini; Rodolfo Casimiro Berber	<b>241</b>
SBTE 089	1706	<b>Efeito da administração de diferentes fontes de progesterona sobre a indução da puberdade e desempenho reprodutivo em novilhas da raça nelore</b> Kleber Menegon Lemes; Milton Maturana Filho; Thiago Santin; Manuel Agustin Silva; Eneiva Carla Carvalho Celeghini; Ed Hoffmann Madureira	<b>241</b>
SBTE 090	1712	<b>O momento do início da ressincronização da ovulação interfere na taxa de gestação em gado de leite</b> Mariana Siqueira Caixeta; Lincoln Silva Amorim; Tatimara Maria Miyauchi; Josiane Rossi Ribeiro; Tochimara Aparecida Miyauchi; Carlos Antônio de Carvalho Fernandes; Ana Cristina Silva de Figueiredo	<b>242</b>

#### OPU-FIV/TE

SBTE 091	1474	<b>Efeito da sazonalidade na produção in vitro de embriões bovinos e bubalinos</b> Emílio César Martins Pereira; Eunice Oba; Marcus Vinicius Prado Silva; Virgílio Barbosa Andrade; Alan Maia Borges; Eliane Beatriz Magalhães; João Gabriel Viana de Grázia; Deize de Cássia Antonino; Natália Vieira Sollecito	<b>243</b>
SBTE 092	1479	<b>Oócitos suínos submetidos ao estresse induzido por pressão negativa melhoram a produção in vitro de embriões</b> Guilherme dos Santos; Claudio f. Brogni; Camila Ceccato Ferreira; Larissa G. Silva; Joana Claudia Mezzalira; Iain Uriel Ohlweiler; José Cristani; Alceu Mezzalira	<b>243</b>
SBTE 093	1482	<b>Adaptação do sistema SPOM melhora a taxa de produção in vitro de embriões bovinos</b> Gabriela Ramos Leal; Maria Alice Guimarães Graciosa; Renata Pasolini; Clara Ana Santos Monteiro; Agostinho Jorge dos Reis Camargo; Clara Slade Oliveira; Raquel Varela Serapião	<b>244</b>
SBTE 094	1483	<b>A regulação da proteína quinase b (AKT) influencia na maturação in vitro de ovócitos bovinos</b> Alinne Gloria Curcio; Tainara Iorani Silva Ribeiro; Roger Cardozo Maia; Carla Sobrinho Paes de Carvalho; Célia Raquel Quirino; Bruna Lomba Dias; Angelo José Burla Dias	<b>244</b>
SBTE 095	1493	<b>Avaliação morfológica e coloração diferencial de células da mci e do te de embriões bovinos produzidos in vitro com a adição de diferentes suplementos nos meios de maturação e de cultivo</b> Elena Carolina Serrano Recalde; Tatiana Lieh Ikeda; Elaine Cristina Galhardo; Mateus José Sudano; Fernanda Cruz Landim	<b>245</b>
SBTE 096	1509	<b>Perfil de eletroforese de células de cumulus de bovino relacionados com a qualidade de oócitos e maturação in vitro</b> Monica Marcela Ramirez Hernandez; Isabel Catalina Velez; Paula Rodriguez Villamil; Arlindo de Alencar Araripe Moura	<b>245</b>
SBTE 097	1516	<b>Embriões oriundos da técnica de transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI) são capazes de desenvolver gestação em bovinos</b>	<b>246</b>

		José Felipe Warmling Srícigo; Severino Bernardino Sena Netto; Carolle Vieira Mutterle; Felipe Manoel Costa Caixeta; Sarah de Andrade Dias Rodrigues; Ivo Pivato; Margot Alves Nunes Dode	
SBTE 098	1533	<b>Impacto de protocolo com P4 injetável e ECG pré-aspiração na produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos</b> Fabiana Sonnewend; João Paulo Nascimento Andrade; Roberto Azevedo Rezende; Alisson Nicolas Borges; André Luis Silva; Marco Roberto Bourg Mello	<b>247</b>
SBTE 099	1541	<b>Ultrassonografia modo Doppler colorido como substituta à laparoscopia na contagem de CL em ovelhas superovuladas</b> Pedro Henrique Nicolau Pinto; Gláucia Mota Bragança; Ceci Ribeiro Leite; Gustavo Bervian Santos; Rômulo Mendonça da Rosa; Vivian Angélico Pereira Alfradique; Ioara Helena Santana Gonçalves; Mário Felipe Alvarez Balaro; Jeferson Ferreira da Fonseca; Felipe Zandonadi Brandao	<b>247</b>
SBTE 100	1544	<b>Sincronização da emergência folicular para aumentar a produção <i>in vivo</i> de embriões ovinos da raça Santa Inês</b> Rômulo Mendonça da Rosa; Mário Felipe Alvarez Balaro; Pedro Henrique Nicolau Pinto; Helena Fabiana Reis de Almeida Saraiva; Ribrio Ivan Tavares Pereira Batista; Vivian Angélico Pereira Alfradique; Lilian Santos Ribeiro; Jeferson Ferreira da Fonseca; Rodolfo Ungerfeld; Felipe Zandonadi Brandão	<b>248</b>
SBTE 101	1548	<b>A maturação <i>in vitro</i> provoca alterações na expressão de miRNAs nos oócitos bovinos</b> Maite Del Collado; Juliano Coelho da Silveira; Tiago Henrique Camara de Bem; Marcelo de Luna Freire Oliveira; Barbara Monteiro da Silva Marques Alves; Augusto Castro Netto; Luciano Andrade Silva; Flávio Vieira Meirelles; Felipe Perecin	<b>248</b>
SBTE 102	1554	<b>Utilização de MAP-5 em protocolo superestimulatório P-36 em vacas da raça Angus (<i>Bos taurus</i>)</b> Ramiro Martins Bonotto; Fernanda De Souza Rosa; Ana Lucia Martins Bonotto; Bruna Mion; Fabricio D. Mozzaquatro	<b>249</b>
SBTE 103	1558	<b>Efeito da duração da etapa de maturação com diferentes atmosferas de oxigênio e do tipo de sêmen nas taxas de clivagem, produção de blastocisto <i>in vitro</i> e prenhez na raça nelore</b> Natali Zanenga Chacha; Raquel Zanetti Puelker; Katarine Rezende Coelho; Carlos Alberto Zanenga; Maria Clara Caldas-Bussiere; Valter Luis Maciel; Célia Raquel Quirino	<b>250</b>
SBTE 104	1562	<b>Desenvolvimento pós-implantacional de embriões holandês-gir biopsiados</b> Beatriz Abdalla Ferraz de Barros; Célio Freitas; Carolina Capobianco Romano Quintão; Agostinho Jorge dos Reis Camargo; Paola Maria da Silva Rosa; Raquel Varella Serapião; Clara Ana Santos Monteiro; Luiz Sérgio de Almeida Camargo; Clara Slade Oliveira	<b>250</b>
SBTE 105	1563	<b>Desempenho de raças bovinas submetidas à OPU e PIV na região do chaco central no Paraguai</b> Gabriel Ferreira Soria; Rafael Ferreira Soria; Miguel Ferreira Soria; Francisco Pedra Lopes; Dario Sotomayor Romero; Evald Friesen	<b>251</b>
SBTE 106	1569	<b>Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos: substituição parcial do soro fetal bovino por albumina sérica bovina no cultivo <i>in vitro</i> e adição de ácido fólico na maturação oocitária</b> Carolina Gennari Verruma; Anderson Mioranza; Cristiana Libardi Miranda Furtado; Reginaldo Aparecido Vila; Ester Silveira Ramos; Raysildo Barbosa Lôbo	<b>251</b>
SBTE 107	1570	<b>Incremento no desenvolvimento de folículos pré-antrais equinos por seis dias de cultivo <i>in vitro</i> com suplementação de FSH</b>	<b>252</b>

		Nathalia Covre da Silva; Marilu Constantino Max; Camila Bizarro da Silva; Suellen Miguez Gonzalez; Andressa Guidugli Lindquist; Isabela Búfalo; Marcelo Marcondes Seneda	
SBTE 108	1575	<b>Validação de modelo experimental para avaliação do crescimento final do folículo dominante de novilhas pré-púberes, tratadas com gonadotrofina coriônica equina (eCG)</b> Mayara Mafra Soares; Gabriel Artur Marciano do Nascimento; Giovana Bongioio Magenis; Vanessa Garcia Rizz <sup>2</sup> ; Lidia Marinho Silva Lima; Carolina Cive Barbosa; Letícia Hatsue Sobreda Doi; Pietro Sampaio Baruselli; Gustavo Guerino Macedo	253
SBTE 109	1578	<b>Caracterização de oócitos de animais pré-púberes da raça Gir: tamanho do oócito, morfologia e atividade metabólica</b> Paola Maria da Silva Rosa; Beatriz Abdalla Ferraz de Barros; Renata Pasolini; Agostinho Jorge dos Reis Camargo; Raquel Varella Serapião; Clara Slade Oliveira	253
SBTE 110	1584	<b>A centrifugação com amortecimento durante a seleção espermática incrementa as taxas de clivagem, fecundação e blastocistos na PIV de bovinos</b> Cecília Isabel Inês Urquiza Falcão Machado; Fábio Gallas Leivas; Daniele Missio; Karine De Mattos; Daniela Dos Santos Brum	254
SBTE 111	1593	<b>Efeito da transferência com embriões frescos ou congelados e da qualidade embrionária sobre a taxa de prenhez em bovinos da raça Angus</b> Bruna Mion; Ramiro Martins Bonotto; Ana Lucia Martins Bonotto; Maicon Lorena Gaissler Pinto; Fernanda de Souza Rosa	254
SBTE 112	1605	<b>Efeito da redução do tempo de interação de oócitos e espermatozoides sobre a produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos</b> Ana Carolina Leite; Bárbara Vanelli Rocha Couto; Natália Vieira Sollecito; Telma Mata Martins; Philipe Pimenta Nunes; Eliane Beatriz Magalhães; Alan Maia Borges	255
SBTE 113	1606	<b>Efeito da suplementação de vacas pantaneiras com linhaça (<i>Linum usitatissimum</i> L.) sobre a produção <i>in vitro</i> de embriões – resultados preliminares</b> Ana Caroline Bini de Lima; Christopher Junior Tavares Cardoso; Giovanna de Lima Ortiz; Leticia da Silva Paes; Pedro Gustavo Loesia Lima; Ruan Francisco Da Silva; Wilian Aparecido Leite da Silva; Mariane Gabriela Cesar Ribeiro Ferreira; Mirela Brochado Souza; Fabiana de Andrade Melo Sterza	255
SBTE 114	1607	<b>Efeito da categoria (pré-púberes, púberes e prenhes) na produção <i>in vitro</i> de embriões de novilhas da raça holandesa</b> Bernardo Marcozzi Bayeux; Luciano Mundim de Carvalho; Yeda Fumie Watanabe; Rodolfo Daniel Mingoti; Aline de Sousa Oliveira; Marina Okano Chiba; Alexandre José Azrak; Pedro Meirelles do Nascimento Castro; Alexandre Henryli Souza; Pietro Sampaio Baruselli	256
SBTE 115	1620	<b>Kisspeptina: Efeito na maturação <i>in vitro</i> de ovócitos bovinos</b> Mayara Oliveira; Kele Amaral Alves; Luciana Ribeiro Peixoto; Tatiane Silva Maia; Emílio César Martins Pereira; José Octavio Jacomini; Marcelo Emílio Belleti; Ricarda Maria Santos; Gustavo Guerino Macedo	256
SBTE 116	1627	<b>Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos em meio de cultivo contendo diferentes concentrações de antioxidante extraído do óleo de <i>Lippia origanoides</i></b> Natália Vieira Sollecito; Emílio César Martins Pereira; João Gabriel Viana de Grázia; Ana Carolina Leite; Bárbara Vanelli Rocha Couto; Virgílio Barbosa Andrade; Eliane Beatriz Magalhães; Alan Maia Borges	257
SBTE 117	1642	<b>Efeito do tratamento com FSH sobre o escore de vascularização ovariana em vacas holandesas doadoras de oócitos</b>	258

		Júlio César Barbosa Silva; Roberta Machado Ferreira; Bruna Marcelle Oliveira; Kleber Menegon Lemes; Milton Maturana Filho; Julianne de Resende Naves; Thiago Santin; Guilherme Pugliesi; Ed Hoffmann Madureira	
SBTE 118	1649	<b>Efeito do Catosal® B12 na reprodução animal: qualidade de ovócito e produção embrionária</b> Emivaldo de Siqueira Filho; Andrei Antonioni Fidelis; Andreia Faria Silva; Louynne Conceição Feliciano; Mara Emília Abadia; Alexandre Sardinha Carvalhêdo	258
SBTE 119	1656	<b>Expressão diferencial de membros do sistema IGF em COCS provenientes de OPU em vacas das raças Gir, Holandesa e meio sangue (½ Holandesa x ½ Gir)</b> Asafe Costa Lopes; Tatimara Maria Miyauchi; Miller Pereira Palhão; Rubia Bueno da Silva; Mateus José Sudano; Carlos Antônio de Carvalho Fernandes; Anthony César Souza Castilho; Ester Siqueira Caixeta	259
SBTE 120	1657	<b>Tratamento cirúrgico de prolapso parcial da mucosa vaginal em vacas Nelore submetidas à aspiração folicular guiada por ultrassom – relato técnico</b> Gabriel Artur Marciano do Nascimento; Ingo Aron Sousa Mello; Rafael Rodrigues Corrêa	259
SBTE 121	1668	<b>Habilidade do corpo lúteo ovino formado após aspiração folicular no estabelecimento e manutenção de gestação obtida a partir da transferência intrafalopiana de oócito</b> Renan Denadai; Luiz Fernando Salgado Scagion; Tatícia Lih Ikeda; Fernanda Cruz Landim; Eunice Oba; Sony Dimas Bicudo	260
SBTE 122	1679	<b>Efeito da sincronização do crescimento da onda folicular na produção de oócitos de bubalinos</b> Eunice Oba; Barbara Virgínia Rodrigues Rizoto de Mattos; Alan Maia Borges; Marc Roger Jean Marie Henry; Ana Carolina Leite; Virgílio Barbosa Andrade; Marcus Vinicius Prado Silva; João Gabriel Viana de Grázia; Emílio César Martins Pereira	261
SBTE 123	1683	<b>Influência do sistema ILPF sobre a produção de embriões bovinos</b> Fabiana de Andrade Melo Sterza; Wilian Aparecido Leite da Silva; Mariane Gabriela Cesar Ribeiro Ferreira; Henrique Kischel; Giovanna de Lima Ortiz; Mirela Brochado Souza; Ana Caroline Bini de Lima; Elielton Dias da Silva Arruda; Ruan Francisco da Silva; Ralf Poehland	261
SBTE 124	1707	<b>Diminuição de espécies reativas de oxigênio em ovócitos suínos pelo uso da proteína recombinante específica do oviduto de porcas no meio de maturação <i>in vitro</i></b> Taynan Stonoga Kawamoto; Lincoln Silva Amorim; Leandro Licursi de Oliveira; Paulo Sávio Lopes; Simone Elisa Facione Guimarães; José Domingos Guimaraes	262

#### FOLICULOGÊNESE, OOGÊNESE E OVULAÇÃO

SBTE 125	1451	<b>miRNAs diferencialmente expressos em células e vesículas secretadas por células no ambiente folicular em bovinos</b> Gabriella Mamede Andrade; Juliano Coelho Da Silveira; Flavio Vieira Meirelles; Felipe Percin	262
SBTE 126	1454	<b>Efeito da ingestão do chá branco (<i>Camellia sinensis</i> (L.) <i>kuntze</i>) sobre a expressão gênica do VEGF no corpo lúteo de ratas superovuladas</b> Francislaine Anelize Garcia Santos; Deyvid Pereira Vieira; Samuel Aparecido Freire; Paula De Carvalho Papa; Calié Castilho; Lilian Francisco Arantes De Souza; Luciana Machado Guaberto; Inês Cristina Giometti	263



SBTE 127	1455	<b>Perfil de miRNAs de exossomos isolados de folículos ovarianos bovinos: associação com a competência oocitária</b> Juliano Coelho Da Silveira; Gabriella Mamede Andrade; Rosane Mazzarella; Marcelo César; Marcelo Fabio Gouveia Nogueira; Claudia Perrini; Felipe Perecin; Flavio Vieira Meirelles	263
SBTE 128	1462	<b>Efeito da alta e baixa contagem de folículos antrais sobre a taxa de crescimento e o diâmetro folicular em vacas Nelore (<i>Bos indicus</i>) submetidas à sincronização da ovulação</b> Fabio Morotti; Gustavo Martins Gomes Santos; Katia Cristina Silva-Santos; Fábio Ferri; Marcelo Marcondes Seneda	264
SBTE 129	1472	<b>Efeito do IGF-I na maturação <i>in vitro</i> de oócitos bovinos submetidos ao choque térmico</b> Ivan Júnior Ascari; Nadja Gomes Alves; Jasmin Jasmin; Carolina Capobianco Romano Quintão; Eliza Diniz De Souza; Jessica Fernanda Souza; Ribrio Ivan Tavares Pereira Batista; Vivian Rachel Araújo Mendes; Felipe Barbosa Junqueira; Luiz Sérgio de Almeida Camargo	265
SBTE 130	1492	<b>Restrição alimentar e suplementação lipídica: idade, peso e concentração de progesterona até a primeira ovulação</b> Nadja Gomes Alves; Felipe Barbosa Junqueira; Ivan Júnior Ascari; José Camisão de Souza; João Pedro Araújo Campos; Letícia Rodrigues Faria; Débora Regina Silva; Fabiane Angélica de Paiva Paula; Renato Ribeiro de Lima; Jeferson Ferreira da Fonseca	265
SBTE 131	1496	<b>Restrição alimentar e suplementação lipídica: efeitos sobre o desenvolvimento folicular ovariano em cordeiras da raça Santa Inês</b> Felipe Barbosa Junqueira; Nadja Gomes Alves; Ivan Júnior Ascari; Débora Regina Silva; João Pedro Araújo Campos; Letícia Rodrigues Faria; Renato Ribeiro de Lima; José Camisão de Souza; Fabiane Angélica de Paiva Paula; Jeferson Ferreira da Fonseca	266
SBTE 132	1507	<b>Efeito da dose de FSH em protocolo de superovulação sobre a dinâmica folicular ovulatória em ovelhas</b> Giovanna Serpa Maciel; Mariana Garcia Kako Rodriguez; Ricardo Perecin Nociti; Ana Paula Rodrigues Simões; Renata Sitta Gomes Mariano; Ricardo Andres Ramirez Uscategui; Jeferson Ferreira da Fonseca; Marcus Antônio Rossi Feliciano; Wilter Ricardo Russiano Vicente; Maria Emilia Franco Oliveira	267
SBTE 133	1518	<b>Parâmetros sanguíneos e taxa de viabilidade oocitária de vacas girolando suplementadas com linhaça (<i>Linum usitatissimum</i> L.) – resultados preliminares</b> Christopher Junior Tavares Cardoso; Wilian Aparecido Leite da Silva; Henrique Kischel; Elielton Dias da Silva Arruda; Mariane Gabriela Cesar Ribeiro Ferreira; Ana Caroline Bini de Lima; Marcus Vinicius Morais de Oliveira; Mirela Brochado Souza; Erikliis Nogueira; Fabiana de Andrade Melo Sterza	267
SBTE 134	1525	<b>Epigallocatequina-3-galato mantém a sobrevivência folicular semelhante ao controle fresco após cultivo <i>in vitro</i> de tecido ovariano ovino</b> Jamilé Maiara da Silva Santos; Thae Lanne Barbosa Gama Lins; Ricássio de Sousa Barberino; Vanuzia Gonçalves Menezes; Bruna Bortoloni Gouveia; Maria Helena Tavares de Matos	268
SBTE 135	1528	<b>Resposta de novilhas Nelore pré-púberes a dois tratamentos de indução da ovulação– dados preliminares</b> Dayane Priscila Vrisman; Natália Marins Bastos; André Roberto Franco Oliveira; Rogério Ribeiro Vicentini; Guilherme Fazan Rossi; Naiara Nantes Rodrigues; Luana Lelis Souza; Fabio Morato Monteiro; Pedro Paulo Maia Teixeira; Maria Emília Franco Oliveira	268

SBTE 136	1532	<b>Distribuição regional de folículos pré-antrais em ovários equinos</b> Suellen Miguez Gonzalez; Camila Bizarro da Silva; Andressa Guidugli Lindquist; Isabela Búfalo; Camila Bortoliero Costa; Livia Aires Lisboa; Nathalia Covre da Silva; Fabio Morotti; Marcelo Marcondes Seneda	269
SBTE 137	1535	<b>Efeito da administração de prostaglandina no momento da IATF em novilhas búfalas submetidas à sincronização da ovulação durante a estação reprodutiva desfavorável (resultados preliminares)</b> Nelcio Antonio Tonizza de Carvalho; Julia Gleyci Soares; Diego Cavalcante de Souza; José Nélio de Sousa Sales; Pietro Sampaio Baruselli	269
SBTE 138	1536	<b>Efeito dos lipopolissacarídeos sobre a expressão de genes envolvidos na esteroidogênese e na ativação da resposta inflamatória nas células da granulosa bovina</b> Joao Alveiro Alvarado Rincón; Felipe Terres de Campos; Diego Andres Acosta; Pedro A S Silveira; Bernardo Garziera Gasperin; Marcio Nunes Correa; Ligia Margareth Cantarelli Pegoraro; Augusto Schneider	270
SBTE 139	1537	<b>Perfil de genes relacionados ao metabolismo lipídico em células da granulosa de vacas Nelore submetidas à superestimulação ovariana</b> Priscila Helena Santos; Patrícia Kubo Fontes; Fernanda Fagali Franchi; Marcelo Fabio Gouveia Nogueira; Ciro Moraes Barros; Mateus José Sudano; Anthony César Souza Castilho	271
SBTE 140	1538	<b>Efeito da administração de somatotropina sobre a expressão de genes em células foliculares do folículo dominante de vacas</b> Diego Andres Acosta; Joao Alveiro Alvarado Rincón; Pedro A S Silveira; Jorgea Pradieé; Marcio Nunes Correa; Ligia Margareth Cantarelli Pegoraro; Augusto Schneider	271
SBTE 141	1540	<b>População folicular na estimativa da resposta superovulatória em ovelhas da raça Santa Inês</b> Helena Fabiana Reis de Almeida Saraiva; Pedro Henrique Nicolau Pinto; Gláucia Mota Bragança; Gustavo Bervian Santos; Lilian Santos Ribeiro; Ribrio Ivan Tavares Pereira Batista; Isabel Oliveira Cosentino; Joanna Maria Gonçalves de Souza Fabjan; Jeferson Ferreira da Fonseca; Felipe Zandonadi Brandão	272
SBTE 142	1546	<b>Exossomos do fluido folicular de vacas Nelore modulam a expressão gênica em células do cumulus e blastocistos bovinos</b> Fernanda Fagali Franchi; Patrícia Kubo Fontes; Priscila Helena Santos; Eduardo Montanari Razza; Bárbara Loureiro; Juliano Coelho da Silveira; Marcelo Fabio Gouveia Nogueira; Ciro Moraes Barros; Anthony César Souza Castilho	272
SBTE 143	1553	<b>Mitofusina 1 é essencial para a fertilidade oocitária, enquanto que a Mitofusina 2 é necessária para a eliminação de DNA mitocondrial mutante em oócitos de camundongos</b> Thiago Simões Machado; Carolina Habermann Macabelli; Karen Freire Carvalho; Bruna Martins Garcia; Fernanda Karina da Silva Ribeiro; Mariana Trevisan; Fabiana de Dio Sarapião; Marcelo Marcondes Seneda; Francisco Eduardo Gontijo Guimarães; Marcos Roberto Chiaratti	273
SBTE 144	1567	<b>Rutina pode substituir a utilização de outros antioxidantes no meio de cultivo para folículos secundários ovinos isolados</b> Thae Lanne Barbosa Gama Lins; Agnes Yasmin Pitombeira Cavalcante; Jamile Maiara da Silva Santos; Vanuzia Gonçalves Menezes; Vanessa Raquel Pinto de Barros; Ricássio de Sousa Barberino; Maria Éllida Sousa Bezerra; Taís Jobard Silva Macedo; Maria Helena Tavares de Matos	274
SBTE 145	1612	<b>Lipídeos oocitários durante a foliculogênese</b>	274

		Kelly Annes; Diana Pedroso Caetano; Diego Borba Muller; Roniele Santana Valente; Jorge Abrão P. Vilela; Jeferson Bueno Fripp; Marcella Pecora Milazzotto; Fernando Silveira Mesquita; Mateus José Sudano	
SBTE 146	1613	<b>Dinâmica do fluxo sanguíneo folicular em vacas Nelore submetidas a protocolos de IATF</b> João Ricardo Scaliante; Mauricio Machaim Franco; Amanda de Castro Gusson; Bianca Damiani Marques Silva	<b>275</b>
SBTE 147	1617	<b>Viabilidade folicular e atividade da SOD em FOPA de fêmeas <i>Bos taurus</i> submetidos a diferentes meios e tempos de transporte</b> Daniele Missio; Maiara Aline Gonçalves; Antônio Carlos Galarça Guimarães; Francielli Weber Santos; Fábio Gallas Leivas; Daniela dos Santos Brum	<b>276</b>
SBTE 148	1625	<b>Variação na resposta à Kisspeptina para avaliação de precocidade em novilhas</b> Guilherme Paula Nogueira; Ana Flavia Paiva; Devani Mariano Pinheiro; Tiago Arriero Rodrigues; Marcos Maioli	<b>276</b>
SBTE 149	1629	<b>Níveis de insulina afeta a sobrevivência e o desenvolvimento <i>in vitro</i> de folicúlos pré-antrais caprinos cultivados <i>in situ</i> na presença da proteína morfogenética óssea 15 e/ou do fator de crescimento e diferenciação 9</b> Deysi Juana Dípaz Berrocal; Johanna Leiva Revilla; Naiza Arcangela Ribeiro de Sá; Maria Helena Tavares de Matos; Juliana Jales de Hollanda Celestino; Benner Geraldo Alves; Kele Amaral Alves; José Ricardo Figueiredo	<b>277</b>
SBTE 150	1639	<b>Retenção da meiose e alteração na configuração da cromatina de ovócitos bovinos submetidos à pré-maturação com Cilostamida e Peptídeo Natriurético do tipo C (NPPC)</b> Felippe Manoel Costa Caixeta; Venâncio Augusto Oliveira Silva; Ana Luiza Silva Guimarães; Ivo Pivato; Margot Alves Nunes Dode	<b>277</b>
SBTE 151	1650	<b>Desempenho, conforto térmico e fisiologia ovariana de novilhas canchim (<i>bos indicus</i> vs <i>bos taurus</i>) mantidas em áreas de pastagem com ou sem a presença de arborização – resultados preliminares</b> Amanda Prudêncio Lemes; Lindsay Unno Gimenes; Sergio N. Esteves; Andre Faria Pedroso; Jose Ricardo Macedo Pezzopane; Cintia Righetti Marcondes; Jessica Helen Guilhardi; Ana Beatriz Bossois Moura; Messy Hanneer de Andrade Pantoja; Alexandre Rossetto Garcia	<b>278</b>

## FISIOLOGIA DA REPRODUÇÃO DO MACHO E TECNOLOGIA DO SÊMEN

SBTE 152	1460	<b>Qualidade do sêmen congelado de garanhões suplementados com nutracêutico</b> Mariane Leão Freitas; Cristiano Silva Bouéres; Tatiana Almeida Pignataro; Francisco José Gonçalves de Oliveira; Marco Antônio de Oliveira Viu; Ivo Pivato; Andrielle Mendes Cunha; Rodrigo Arruda de Oliveira	<b>279</b>
SBTE 153	1461	<b>Imunodeteção da enzima conversora de angiotensina no sêmen de touros nelore</b> Ricardo Garcia de Almeida; Fábio José Carvalho Fariã; Juliana Correa Borges; Breno Fernandes Barreto Sampaio; Marcelo Diniz dos Santos; Carlos Antônio de Carvalho Fernandes; Deiler Sampaio Costa	<b>279</b>

SBTE 154	1463	<b>Avaliação da integridade da membrana plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial de espermatozoides de ovinos suplementados com selênio</b> Carla Fredrichsen Moya-Araujo; Marcelo Piagentini; Danilo Cunha da Silva; Camila Paula Freitas-Dell'Aqua; Gustavo Henrique Marques Araujo; Eunice Oba	280
SBTE 155	1464	<b>Influência de diferentes técnicas de mini-percoll na capacitação espermática e integridade de membrana plasmática de sêmen descongelado de carneiros</b> Carolina Cerqueira Sarmiento Olivares; Vivian Angélico Pereira Alfradique; Joanna Maria Gonçalves de Souza Fabjan; Jeferson Ferreira da Fonseca; Helena Fabiana Reis de Almeida Saraiva; Luana Rangel Côrtes; Lendel Correia da Costa; Felipe Zandonadi Brandao	280
SBTE 156	1486	<b>Determinação da concentração do sêmen ovino por espermatócrito</b> Lucas Dalle Laste Dacampo; Lucio Pereira Rauber; Paulo Mafra de Almeida Costa; João Luis dos Santos; Luana Camillo Basseggio	281
SBTE 157	1488	<b>Efeito de diferentes concentrações de melatonina na integridade da membrana acrossomal do sêmen suíno criopreservado</b> Daniela C Albring; Bruna F. V. Superti; Andressa P. Souza; Eraldo Lourenso Zanella; Ricardo Zanella; Mariana Groke Marques	281
SBTE 158	1495	<b>Efeito de inibidores de serino proteases na criopreservação de espermatozoides bovino</b> José Adalmir Torres Souza; Marlon de Araújo Castelo Branco; Yndyra Nayan Teixeira Carvalho; Felipe Jesus Moraes Jr; Filipe Barros Nunes; Felipe Pereira da Silva Barçante; Marcos Antônio Celestino de Sousa Filho; Viviany de Sousa Rodrigues; Icaro O. Torres Sousa; Geraldo Magela Côrtes Carvalho	282
SBTE 159	1497	<b>Tempo de estabilização e exposição ao vapor de nitrogênio, altera a viabilidade do sêmen canino criopreservado</b> Gabriel Bittencourt Camargo; Larissa G. Silva; Ana K. C. P. Sá; Camila Ceccato Ferreira; Claudio F. Brogni; Lain Uriel Ohlweiler; Joana Claudia Mezzalira; Alceu Mezzalira	283
SBTE 160	1510	<b>Refrigeração de sêmen bubalino (<i>Bubalus bubalis</i>) frente a diferentes extensores e avaliação da motilidade espermática no casa</b> Jaci De Almeida; Veronica Alexandra Becerra; Beatriz Parzewski Neves; Patricia Alencar Auler; Guilherme Oliveira Andrade; Mayara Ferreira Brito; Marc Roger Jean Marie Henry	283
SBTE 161	1527	<b>Comparação entre o sistema automatizado e convencional de criopreservação espermática com relação a qualidade seminal <i>in vitro</i></b> Fabio Morato Monteiro; Erika Aline Ribeiro Dias; Claudia Cristina Paz; Suzane Peres Campanholi; Mariana Furtado Zorzetto; Frederico Ozanam Papa; José Antonio Junior Dell'Aqua; Camila Paula Freitas-Dell'Aqua; Leticia Zoccolaro Oliveira; Maria Eugenia Zerlotti Mercadante	284
SBTE 162	1568	<b>Comportamento das temperaturas de superfície escrotal e qualidade seminal de touros compostos durante as estações de inverno e verão</b> Narian Romanello; Ana Beatriz Bossois Moura; Messy Hannear De Andrade Pantoja; Verônica Schinaider do Amaral Pereira; Alessandro Giro; Daniela Botta; Maria Carolina	284

		Villani Miguel; Cintia Righetti Marcondes; José de Brito Lourenço Junior; Alexandre Rossetto Garcia	
SBTE 163	11600	<b>Correlações entre temperaturas de superfície testicular mensuradas por termografia de infravermelho e parâmetros seminais de ovinos de grupos genotípicos distintos</b> Ana Beatriz Bossois Moura; Messy Hannear de Andrade Pantoja; Narian Romanello; Amanda Prudêncio Lemes; Mauricio Mello Alencar; Sergio N. Esteves; Jeferson Ferreira da Fonseca; Felipe Zandonadi Brandao; Alexandre Rossetto Garcia	285
SBTE 164	1618	<b>Estresse oxidativo como indicador de fertilidade de touros</b> Karine de Mattos; Cecília Isabel Inês Urquiza Falcão Machado; Francielli Weber Santos; Mateus José Sudano; André Luiz Dal Maso; Fábio Gallas Leivas; Daniela dos Santos Brum	286
SBTE 165	1632	<b>Eficiência de software para contagem de células espermáticas bovinas: resultados preliminares</b> Matheus Henrique Alves Sousa; Luciano Carlos Ribeiro Da Silva; Vitor Lemes Silva; Andrea Francisca Araujo; Yamê Fabres Robaina Sancler-Silva; Frederico Ozanam Papa; Eunice Oba; Aline Sousa Camargos	286
SBTE 166	1643	<b>Avaliação do potencial reprodutivo de touros de uma nova raça blonel: análise espermática</b> Ana Paula Balduino Rabelo; Eduarda Gonçalves Damacena; Vitor Lemes Silva; Amanda De Ávila Pires; Andrea Francisca Araujo; Wallacy Barbacena Rosa Dos Santos; Jeferson Corrêa Ribeiro; Andréia Santos Cezário; Aline Sousa Camargos	287
SBTE 167	1697	Características seminais de touros da raça nelore suplementados com fonte de ácidos graxos poliinsaturados em regime de pastagem Guilherme Fazan Rossi; Fabio Morato Monteiro; Erika Aline Ribeiro Dias; Flávia Fernanda Simili; Dayane Priscila Vrisman; Aderson Mauricio Ifran; Roberta Vantini; Henrique Moreira Lopes; Joaquim Mansano Garcia; Gisele Zoccal Mingoti	287

#### EMBRIOLOGIA, BIOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO E FISIOLOGIA DA REPRODUÇÃO

SBTE 168	1452	<b>Fatores de transcrição ativados pelo 17<math>\beta</math>-estradiol no corpo lúteo de cadelas não prenhes</b> Ana Paula Matoso Miskulin Cardoso; Renata dos Santos Silva; Ines Cristina Giometti; Paula de Carvalho Papa	288
SBTE 169	1452	<b>Análise da expressão diferencial de componentes da cascata de sinalização da insulina no corpo lúteo canino após sequenciamento de RNA</b> Renata dos Santos Silva; Ana Paula Matoso Miskulin Cardoso; Suraj Unniappan; Ines Cristina Giometti; Paula de Carvalho Papa	289
SBTE 170	1458	<b>Efeito das infusões intramamárias de LPS sobre os parâmetros inflamatórios e reprodutivos de vacas leiteiras Holandesas</b> Carla Cristian Campos; Ricarda Maria Santos; Ronaldo Luis Aoki Cerri	289
SBTE 171	1465	<b>Resistência embrionária ao estresse subletal induzida por alta pressão gasosa</b> Bruno Silveira Becker; Favorino José de Freitas Collares; Denise Dornelas Mendonça; Marcelo Bertolini; José Luis Rigo Rodrigues	290

SBTE 172	1473	<b>Recuperação da atividade reprodutiva e fertilidade de cabras Saanen acometidas por hidrometra após tratamento com cloprostenol e indução de estro durante a estação de anestro (dados preliminares)</b>	<b>290</b>
		Jeferson Ferreira da Fonseca; Ana Lucia Rosa e Silva Maia; Felipe Zandonadi Brandao; Mário Felipe Alvarez Balaro; Gustavo Bervian Santos; Joanna Maria Gonçalves de Souza Fabjan; Ribrio Ivan Tavares Pereira Batista; Olivardo Facó	
SBTE 173	1476	<b>Uma técnica simples para quantificar a apoptose de oócitos maturados <i>in vitro</i> em vacas</b>	<b>291</b>
		Alejandra Velasquez; Edwin Mellisho-Salas; Joel Cabezas; Maria Jose Nuñez; Lleretny Rodriguez-Alvarez	
SBTE 174	1478	<b>Ocorrência de prenhez em uma novilha após ovariectomia bilateral</b>	<b>291</b>
		Camila Bizarro da Silva; Katia Cristina Silva-Santos; Gustavo Martins Gomes Santos; Antônio Cesar de Oliveira Dearo; Marcelo Marcondes Seneda	
SBTE 175	1489	<b>Ultrassonografia doppler no diagnóstico precoce da gestação em ovinos</b>	<b>292</b>
		Gláucia Mota Bragança; Mário Felipe Alvarez Balaro; Jeferson Ferreira da Fonseca; Pedro Henrique Nicolau Pinto; Rômulo Mendonça da Rosa; Lilian Santos Ribeiro; Marcielli Silva Almeida; Joanna Maria Gonçalves de Souza Fabjan; Alexandre Rossetto Garcia; Felipe Zandonadi Brandão	
SBTE 176	1508	<b>Blastulação precoce de embriões bovinos melhora o desenvolvimento pos eclosao <i>in vitro</i></b>	<b>292</b>
		Edwin Mellisho-Salas; Alejandra Velasquez; Lleretny Rodriguez-Alvarez	
SBTE 177	1512	<b>Caracterização e comparação do perfil de miRNAs em vesículas extracelulares no oviduto ao longo do ciclo estral</b>	<b>294</b>
		Carmen Alminana Brines	
SBTE 178	1513	<b>Regulação da resposta ao estresse oxidativo por miRNAs em blastocistos bovinos produzidos <i>in vitro</i></b>	<b>294</b>
		Monalisa Medrado Bomfim; Juliano Coelho da Silveira; Flavio Vieira Meirelles; Felipe Perecin	
SBTE 179	1514	<b>Análise bacteriológica, citológica e histopatológica do trato reprodutivo de vacas de abate</b>	<b>295</b>
		Julia Brum Spreckelsen Casarin; Janislene Mach Trentin; Mariani Farias Fiorenza; Mara Iolanda Batistella Rubin; Ana Paula Martini; Taison Souza Balestrin; Gilson Antonio Pessoa; Severo Sales de Barros; Luiz Augusto Machado Centeno; Guilherme Machado Zanatta	
SBTE 180	1517	<b>Suplementação com melatonina durante a maturação <i>in vitro</i> na ausência de gonadotrofinas recupera o desenvolvimento embrionário e reduz o estresse oxidativo em embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i></b>	<b>295</b>
		Priscila Chediek Dall Acqua; Marcela Ambrogi; Nathália Alves de Souza Rocha-Frigoni; Beatriz Caetano da Silva Leão; Luana Teixeira Rodrigues; Gisele Zoccal Mingoti	
SBTE 181	1519	<b>Efeitos da modulação do estresse oxidativo e do teor de lipídios sobre o potencial de desenvolvimento, qualidade e criotolerância de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i></b>	<b>296</b>
		Giovana Barros Nunes; Priscila Chediek Dall Acqua; Marcela Ambrogi; Beatriz Caetano da Silva Leão; Nathália Alves de Souza Rocha-Frigoni; Gisele Zoccal Mingoti	
SBTE 182	1521	<b>Efeitos da suplementação com semente de girassol em fêmeas bovinas na produção de oócitos e embriões <i>in vitro</i></b>	<b>297</b>
		Angélica Leão Baltazar; Sheila Merlo Garcia; Gabriel Molinari de Mattos; Beatriz de Moraes Ropelli; Caliê Castilho; José	

		Otavio Folino; Gelci Carlos Lupatini; Guilherme Pugliesi; Mario Binelli; Claudia Maria Bertan Membrive	
SBTE 183	1522	<b>Pré-maturação de oócitos bovinos com moduladores de AMPC e antioxidantes durante o transporte: efeitos sobre o desenvolvimento embrionário e criotolerância</b> Marcela Ambrogi; Priscila Chediek Dall Acqua; Beatriz Caetano da Silva Leão; Nathália Alves de Souza Rocha-Frigoni; Giovana Barros Nunes; Luana Teixeira Rodrigues; Gisele Zoccal Mingoti	<b>297</b>
SBTE 184	1523	<b>Efeito da L-carnitina e o isômero <i>trans-10, cis-12</i> do CLA durante o cultivo no desenvolvimento embrionário e conteúdo lipídico de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i></b> Luzia Renata Oliveira Dias; Ligiane Oliveira Leme; José Felipe Warmling Sprícigo; Margot Alves Nunes Dode; Ivo Pivato	<b>298</b>
SBTE 185	1530	<b>Comparação entre atmosferas com baixo ou elevado nível de oxigênio no cultivo de embriões bovinos partenogênicos</b> Carla Fabiana Gomes de Jesus; Lina Castelo Branco Motta; Dárcio Ítalo Alves Teixeira; Luciana Magalhães Melo; Maajid Hassan Bhat; Vicente José de Figueirêdo Freitas	<b>298</b>
SBTE 186	1539	<b>A adição do soro de vacas no pós- parto recente influencia o desenvolvimento embrionário inicial?</b> Letícia Franco Collares; Joao Alveiro Alvarado Rincón; Bruna Mion; Patricia Carvalho Gindri; Morgana Alves Borges; Janaina Fadrique da Silva; Jorgea Pradieé; Ligia Margareth Cantarelli Pegoraro; Augusto Schneider; Marcio Nunes Correa	<b>299</b>
SBTE 187	1547	<b>Desenvolvimento embrionário após transferência para a tuba uterina ipsi ou contralateral ao corpo lúteo em ovinos</b> Victoria De De Brun; Ana Meikle; Federico Cuadro; Natalibeth Barrera; Pedro Claudino dos Santos-Neto; Diego Bosolasco; Martina Crispo; Alejo Menchaca	<b>299</b>
SBTE 188	1550	<b>Efeitos de SNAP e/ou cilostamida durante a maturação <i>in vitro</i> de oócitos bovinos sobre a cinética de maturação e na produção de embriões</b> Ramon Cesar Botigelli; Katia Lancellotti Schwarz; Maite Del Collado; Fernanda Cavallari Castro; Hugo Fernandes; Cláudia Lima Verde Leal	<b>300</b>
SBTE 189	1552	<b>Alterações da nutrição materna no início da gestação de vacas Nelore modifica o transcriptoma ovariano fetal</b> Heni Falcão da Costa; Maria Carolina Villani Miguel; Alexandre Mendonça Pedroso; Flavia Lombardi Lopes; Juliana Regina Peiró; Guilherme Paula Nogueira	<b>300</b>
SBTE 190	1557	<b>Efeitos do uso de moduladores de AMPC durante a pré-maturação <i>in vitro</i> de oócitos bovinos sobre as junções comunicantes e o potencial de desenvolvimento embrionário</b> Naiara Zoccal Saraiva; Clara Slade Oliveira; Maite Del Collado; Marina Ragagnin Lima; Simone Cristina Méo; Marivaldo Rodrigues Figueiró; Roberta Vantini; Joaquim Mansano Garcia	<b>301</b>
SBTE 191	1560	<b>Histologia e morfometria de cornos uterinos de cadelas nulíparas e múltiparas</b> Mariana Paganini Lourencini; Jose Leonardo Gualberto Ramos; Jacymara Dutra Santos; Larissa Marchiori Sena; Leticia Leal Oliveira; Carla Braga Martins	<b>301</b>
SBTE 192	1566	<b>Efeito de diferentes doses de ácido fólico no cultivo <i>in vitro</i> de embriões bovinos</b> Ana Luiza Silva Guimarães; Margot Alves Nunes Dode	<b>302</b>



SBTE 193	1571	<b>Modulação de embriões bovinos <i>in vitro</i> por t2iGöLIF aumenta o número de células que expressam Nanog na MCI, mas não impede a ativação de Sox17</b> Jesica Romina Canizo; Amada Eugenia Ynsaurralde Rivolta; Patricia Fisher; Mariana Suvá; Alejandra Sonia Guberman; Juan Florencio Aller Atucha; Daniel Salamone; Ricardo Horacio Alberio; Ramiro Alberio	<b>303</b>
SBTE 194	1573	<b>Melhoria das taxas de blastocisto e padrão de expressão gênica de embriões bovinos de ICSI pela MIV com alta concentração de cisteamina e o uso de esperma previamente incubado com COCs</b> Natalia Gabriela Canel; Romina Jimena Bevacqua; Mariana Suvá; María Elena Arias; Ricardo Felmer; Daniel Salamone	<b>303</b>
SBTE 195	1581	<b>Desenvolvimento morfológico e funcional do corpo lúteo de vacas da raça Holandês tratadas com ECG antes ou após a ovulação</b> Bruno Moura Monteiro; Pedro Leopoldo Jerônimo Monteiro Jr; Louise Helen de Oliveira; Alexandre Barbieri Prata; Jessica Nora Drum; Camila Spies; Mario Binelli; Roberto Sartori; Paula de Carvalho Papa	<b>304</b>
SBTE 196	1586	<b>Efeitos de diferentes métodos de ativação do ovócito bovino sobre o desenvolvimento embrionário partenogenético e por injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)</b> Carlos Frederico Martins; Heidi Christina Bessler; Margot Alves Nunes Dode; Carolina Gonzales da Silva	<b>305</b>
SBTE 197	1588	<b>Levantamento epidemiológico de <i>Leptospira borgpetersenii hardjo bovis</i> nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul no período entre maio e dezembro de 2015</b> Bruno Sivieri Lima; Manoel Renato Teles Badke; Giovani Pastre; Marcia Cristina Alves Teixeira	<b>305</b>
SBTE 198	1589	<b>Diagnóstico gestacional e acompanhamento do desenvolvimento fetal em cadela através da ultrassonografia</b> Haroldo Francisco Lobato Ribeiro; Elenara Botelho Araujo; Anelise Sarges Ramos; Sebastião Tavares Rolim Filho; Tarcísio Rodrigo Lopes Mesquita; Victor da Costa Mileo; Raphael Castro Conde	<b>306</b>
SBTE 199	1590	<b>Tratamentos de endometrites com infusão intrauterina de glicose 50% em vacas leiteiras</b> Fernanda de Souza Rosa; Ramiro Martins Bonotto; Tatiane Camacho Mendes; Milena Tomasi Bassani; Genuina Dalberto; Simone Vargas; Ana Paula da Silva; Adiel Cristiano Nino; Jankiel Primon	<b>306</b>
SBTE 200	1609	<b>Consumo de chá verde e de chá branco na proliferação celular do endométrio de ratas</b> Inês Cristina Giometti; Francislaine Anelize Garcia Santos; Samuel Aparecido Freire; Ronaldo Sena e Silva; Paula de Carvalho Papa; Caliê Castilho; Ana Paula Matoso Miskulin Cardoso; Cecília Braga Laposy; Rosa Maria Barilli Nogueira; Érica Solange Caetano Kikuchi	<b>307</b>
SBTE 201	1611	<b>Expressão de genes de competência oocitária é maior em células do cumulus de vacas Nelores de baixa comparada com alta contagem de folículos antrais</b> Camila Oliveira Rosa; Luciana Simoes Rafagnin Marinho; Paulo Roberto Antunes da Rosa; Matheus Pedrotti de Cesaro; Paula Alvares Lunardelli; Katia Cristina Silva-Santos; Vilceu Bordignon; Marcelo Marcondes Seneda	<b>307</b>
SBTE 202	1622	<b>Esteroides foliculares cooperam com o NPPC para retardar a maturação nuclear e aumentar a comunicação oócito-cumulus em bovinos</b>	<b>308</b>

		Ana Caroline Silva Soares; Valentina Lodde; Lorena Sanches; Rodrigo Garcia Barros; Paula Fernanda de Lima; Christopher Alan Price; Alberto M. Luciano; Jose Buratini	
SBTE 203	1624	<b>Efeitos do inibidor da polimerização de actina, “latrunculin a” durante ativação partenogenética de oócitos bovinos</b> Geraldina Vans Landschoot; Sergio Ferraris; Daniel Salamone	<b>309</b>
SBTE 204	1628	<b>O oócito regula a expressão do GDF9 e da BMP15 nas células do cumulus bovinas</b> Paula Fernanda de Lima; Rodrigo Garcia Barros; Jhessica Naomi Sakoda; Ana Caroline Silva Soares; Christopher Alan Price; Jose Buratini	<b>309</b>
SBTE 205	1631	<b>Estradiol altera o perfil imunohistoquímico das proteínas PKC gama, AKR1B1 e receptor alfa de estradiol no endométrio de fêmeas bovinas</b> Bárbara Piffero Mello; Angela Maria Gonella-Diaza; Guilherme Pugliesi; Saara Carolina Scolari; Mario Binelli; Claudia Maria Bertan Membrive	<b>310</b>
SBTE 206	1633	<b>Evidências de que o fator de crescimento dos fibroblastos 2 está envolvido nos mecanismos pelos quais o oócito regula sua própria maturação nuclear</b> Rodrigo Garcia Barros; Debora Jardina Sartor; Paula Fernanda de Lima; Ana Caroline Silva Soares; Lorena Sanches; Christopher Alan Price; Jose Buratini	<b>310</b>
SBTE 207	1635	<b>Análise morfológica, citológica e qualidade oocitária de tratos reprodutivos de fêmeas bovinas submetidas ao abate</b> Larissa Marchiori Sena; Ítalo Câmara de Almeida; Nara Clara Lazaroni e Merchid; Jacymara Dutra Santos; Thadeu de Castro; Bianca Carvalho dos Santos Albuquerque; Maria Augusta Pires da Luz Chieppe; José Oliveira Carvalho; Carla Braga Martins	<b>311</b>
SBTE 208	1647	<b>Estacionalidade reprodutiva em cabras da raça Saanen manejadas no sudeste brasileiro</b> Mário Felipe Alvarez Balara; Alex Silva Santos; Samuel Guarana Valverde Mello; Luiza Mattos Cavalcanti; Loara Helena Santana Gonçalves; Luis Fernando Guaraná Macedo Moura; Joanna Maria Gonçalves de Souza Fabjan; Jeferson Ferreira da Fonseca; Felipe Zandonadi Brandao	<b>311</b>
SBTE 209	1665	<b>Parâmetros reprodutivos de rebanhos leiteiros criados em diferentes sistemas no oeste e sudoeste do estado do Paraná</b> Thainá Minela; Fernando Bracht; José Manuel Constâncio Mendonça; Thiago de Oliveira Cunha; Taison Souza Balestrin; Ana Paula Martini; Gilson Antonio Pessoa; Janislene Mach Trentin; Mariani Farias Fiorenza; Mara Iolanda Batistella Rubin	<b>312</b>
SBTE 210	1669	<b>Dieta insulínogênica, após seu fornecimento, aumenta progesterona circulante mas não altera a expressão gênica de enzimas hepáticas que metabolizam progesterona em vacas holandesas não lactantes</b> Camila Spies; Aurea Maria Oliveira Canavessi; Monique Mendes Guardieiro; Pedro Leopoldo Jerônimo Monteiro Jr; Louise Helen de Oliveira; Leonardo de França e Melo; Jessica Nora Drum; Jessica Zulatto dos Anjos; Alan dos Anjos; Roberto Sartori	<b>313</b>
SBTE 211	1673	<b>O embrião bovino modula a função do endométrio 7 dias após o estro <i>in vivo</i></b> Mariana Sponchiado; Nathália Souza Gomes; Patrícia Kubo Fontes; Maressa Izabel Santos da Silva; Thiago Martins; Guilherme Pugliesi; Maite Del Collado; Athos de Assumpção Pastore <sup>3</sup> ; Marcelo Fabio Gouveia Nogueira <sup>2</sup> ; Mario Binelli <sup>1</sup>	<b>313</b>
SBTE 212	1680	<b>Estradiol modula a expressão de genes envolvidos na síntese de PGF2α no endométrio de fêmeas bovinas</b>	<b>314</b>

		Milena Lopes Oliveira; Angela Maria Gonella-Diaza; Saara Carolina Scolari; Roney Santos Ramos; Guilherme Pugliesi; Mario Binelli; Claudia Maria Bertan Membrive	
SBTE 213	1681	<b>A produção de embriões bovinos sob estresse oxidativo e glicêmico leva a perda do controle transcricional</b> Camila Bruna de Lima; Jéssica Ispada; Erika Cristina dos Santos; Patrícia Kubo Fontes; Marcelo Fabio Gouveia Nogueira; Marcella Pecora Milazzotto	<b>315</b>
SBTE 214	1693	<b>Pré-maturação oocitária de duas horas com forskolin e IBMX modula os perfis lipídico e de expressão gênica em blastocistos bovinos produzidos <i>in vitro</i></b> Eduardo Montanari Razza; Mateus José Sudano; Katia Roberta A. Belaz; Patrícia Kubo Fontes; Fernanda Fagali Franchi; Priscila Helena Santos; Marcos Nogueira Eberlin; Mariana Fernandes Machado; Marcelo Fabio Gouveia Nogueira	<b>315</b>
SBTE 215	1696	<b>Expressão gênica do corpo lúteo após pulsos intrauterinos com doses baixas de prostaglandina E1 e F2 alfa em vacas</b> Julián Camilo Ochoa; Giovanni Baez; Leonardo Melo; Jessica Mota; Francisco Peñagaricano; Alvaro Guerra; João Pinheiro; Roberto Sartori; Milo Wiltbank	<b>316</b>
SBTE 216	1701	<b>Avaliação de diferentes estratégias de suplementação mineral e vitamínica injetável (KIT Adaptador® MIN e Adaptador® VIT, Biogénesis Bagó) na melhoria das taxas de prenhez em vacas de corte</b> Thiago Santin; Milton Maturana Filho; Kleber Menegon Lemes; Manuel Agustin Silva; Reuel Luiz Gonçalves; Guillermo Alberto Mattioli; João Paulo Mendes Lollato; Juan Manuel Persico; Eneiva Carla Carvalho Celeghini; Ed Hoffmann Madureira	<b>316</b>
SBTE 217	1702	<b>Expressão gênica de caspase15 em embriões suínos de diferentes grupos genéticos</b> Lincoln Silva Amorim; Taynan Stonoga Kawamoto; Simone Elisa Facione Guimarães; Priscila Vendramini Silva; Paulo Sávio Lopes; José Domingos Guimaraes	<b>317</b>
SBTE 218	1705	<b>Prevalência de Brucelose, Leptospirose e Neosporose em fêmeas bovinas com retenção de placenta no sudoeste do Paraná</b> Yuri da Fontoura Porto; Adalgiza Pinto-Neto; Fabricio Bernardi; Marina Gabriela Possa; Geovan Vendruscolo; Marcelo Falci Mota; Antônio Campanha Martinez; Rodolfo Casimiro Berber	<b>318</b>
SBTE 219	1710	<b>Efeito da suplementação mineral e vitamínica injetável, (KIT Adaptador® MIN e Adaptador® VIT, Biogénesis Bagó), associado a vacinação contra doenças reprodutivas (bioleptogen® e bioabortogen® h, biogénesis bagó) sobre as taxas de prenhez em vacas de corte</b> Manuel Agustin Silva; Thiago Santin; Milton Maturana Filho; Kleber Menegon Lemes; Reuel Luiz Gonçalves; Guillermo Alberto Mattioli; João Paulo Mendes Lollato; Juan Manuel Persico; Eneiva Carla Carvalho Celeghini; Ed Hoffmann Madureira	<b>318</b>

#### CLONAGEM, TRANSGÊNESE E CÉLULAS-TRONCO

SBTE 220	1456	<b>Geração <i>in vitro</i> de células germinativas primordiais (PGCS) a partir de células pluripotentes induzidas (IPS) em bovinos</b>	<b>319</b>
----------	------	--	------------

		Fabiana Fernandes Bressan; Lucas Simões Machado; Naira Caroline Godoy Pieri; Flavio Vieira Meirelles	
SBTE 221	1471	<b>Efeito da transfecção e co-incubação de espermatozoide bovino com DNA exógeno sobre a funcionalidade e qualidade para seu uso em transferência gênica mediada por espermatozoides</b> Maria Elena Arias; Andrea Soledad Delgado; Esther Sánchez; Ricardo Nicolas Felmer	<b>319</b>
SBTE 222	1481	<b>Isolamento de vesículas extracelulares a partir do meio condicionado de células tronco mesenquimais de tecido adiposo bovino</b> Carla Martins de Queiroz; Tatiana Lieh Ikeda; Leandro Maia; Carolina Nogueira de Moraes; Fernanda Cruz Landim; João C.P. Ferreira	<b>320</b>
SBTE 223	1490	<b>Análise proteômica do secretoma de células endometriais progenitoras de bovinos desafiadas ou não com lipopolissacarídeo bacteriano</b> Carolina Nogueira de Moraes; Leandro Maia; Aspinas Chapwanya; Fernanda Cruz Landim; Eliandre Oliveira; Eunice Oba	<b>321</b>
SBTE 224	1491	<b>Análise proteômica das células-tronco mesenquimais do cordão umbilical equino: uma abordagem global e funcional</b> Leandro Maia; Carolina Nogueira de Moraes; Marianne Camargos Dias; Julia Bauzá Martinez; Antonia Odena Caballol; Fernanda Cruz Landim; Eliandre de Oliveira	<b>321</b>
SBTE 225	1498	<b>Embriões de ovinos geneticamente modificado em IVF e SMGT</b> Patricio Diaz Pumará; Julia Aguerre Cano; Monica Hebe Vazquez-Levin	<b>322</b>
SBTE 226	1576	<b>Análise da sincronização do ciclo celular de fibroblastos provenientes da pele de gato doméstico (<i>Felis silvestris catus</i>) e kodkod (<i>Leopardus guigna</i>)</b> Paula Fernanda Gallegos; Daniel Veraguas; Fidel Ovidio Castro; Lleretny Rodriguez-Alvarez	<b>323</b>
SBTE 227	1583	<b>Caracterização de células-tronco derivadas do endométrio bovino durante a fase folicular do ciclo estral</b> Evelyn Elia Lara; Nathaly Stephanie Rivera; Fidel Ovidio Castro	<b>323</b>
SBTE 228	1599	<b>Transfecção gênica de células primárias de fibroblastos bovinos utilizando nanotubos de carbono multicamadas carboxilados</b> Michele Munk Pereira; Humberto de Mello Brandão; Rafaella de Souza Salomão Zanette; Carolina Capobianco Romano Quintão; Eliza Diniz de Souza; Leonara Beatriz Fayer Almeida; Luiz Orlando Ladeira; Luiz Sérgio de Almeida Camargo	<b>324</b>
SBTE 229	1651	<b>Blastocistos bovinos produzidos a partir de genoma de espermatozoides clonado e ovócitos maduros ou pré-ativado</b> Mariana Suvá; Lucia Natalia Moro; Daniel Salamone	<b>324</b>
SBTE 230	1663	<b>Comparação ultra-estrutural da diferenciação adipogênica induzida de células tronco mesenquimais de tecido adiposo e medula óssea equina</b> Elaine Cristina Galhardo; Bruna de Vita; Danielle Jaqueta Barberini; Elena Carolina Serrano Recalde; Caroline Medeiros Geraldini; Marina Landim e Alvarenga; Carolina Nogueira de Moraes; Leandro Maia; Fernanda Cruz Landim	<b>325</b>
SBTE 231	1690	<b>Avaliação da qualidade de oócitos caprinos e seus efeitos sobre a eficiência da clonagem após maturação <i>in vivo</i> ou <i>in vitro</i></b>	<b>326</b>

Luis Henrique de Aguiar; Carlos Enrique Mendez Calderón; Saul Gaudencio Neto; Rafael Rossetto; Leonardo Tondello Martins; Kaio César Simiano Tavares; Felipe Ledur Ongaratto; Cicera Regina Lazzarotto; Luciana Relly Bertolini; Marcelo Bertolini

**BIOTECNOLOGIAS DE SUPORTE: CRIOPRESERVAÇÃO, CRIOBIOLOGIA, BIOLOGIA MOLECULAR E “ÔMICAS”**

SBTE 232	1470	<b>Sobrevivência de embriões bovinos de 7 dias produzidos <i>in vitro</i> expostos a 0,5 m de sacarose antes de congelamento lento</b> Maria Eduarda Bicca Dode; Chelsie B. Steinhauser; Jane H. Pryor; Tiago Veiras Collares; João Carlos Deschamps; Charles R Looney; David Forrest	<b>326</b>
SBTE 233	1484	<b>Uso de forskolin no cultivo <i>in vitro</i> de embriões bovinos submetidos à vitrificação</b> Daniela Moraes Pereira; Mariane Gabriela Cesar Ribeiro Ferreira; Mirela Brochado Souza; Wilian Aparecido Leite da Silva; Christopher Junior Tavares Cardoso; Henrique Kischel; Elielton Dias da Silva Arruda; Ana Caroline Bini de Lima; Fabiana de Andrade Melo Sterza	<b>327</b>
SBTE 234	1520	<b>Desenvolvimento, número de células totais e apoptose em embriões bovinos submetidos à biópsia manual no sétimo dia após a fecundação <i>in vitro</i></b> Carolina Capobianco Romano Quintão; Clara Slade Oliveira; Célio Freitas; Eliza Diniz de Souza; Jessica Fernanda Souza; Bruna Rios Coelho Alves; Luiz Sérgio de Almeida Camargo	<b>327</b>
SBTE 235	1526	<b>Análise de dados de RNA-seq em um servidor local “galaxy” de ambiente amigável ao usuário, produtivo e reprodutível</b> Jochen Bick; Susanne Ulbrich; Stefan Bauersachs	<b>328</b>
SBTE 236	1534	<b>Efeito da modulação da Acil-CoA sintetase de cadeia longa no desenvolvimento e criotolerância de embriões bovinos</b> Roniele Santana Valente; Tamie Guibu de Almeida; Mayra Fernanda Alves; Daniel Robert Arnold; Fernanda Cruz Landim; José Henrique Fortes Pontes; Andrea Cristina Basso; Mateus José Sudano	<b>329</b>
SBTE 237	1551	<b>Estudo de polimorfismos do gene JY-1 e sua associação à produção <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de embriões em doadoras da raça Holandesa (<i>Bos taurus taurus</i>)</b> Cecilia Rodrigues Alves Silveira; Júlia Cestari Pierucci; Carlos Alberto Rodrigues; Augusto Castro Neto; Gregório Miguel Ferreira de Camargo; Daniel Jordan de Abreu dos Santos; Ana Cláudia de Freitas; Pietro Sampaio Baruselli; Humberto Tonhati; Lindsay Unno Gimenes	<b>329</b>
SBTE 238	1564	<b>Retirada do fluido da blastocle associada à melatonina no meio de cultivo melhora a viabilidade de embriões bovinos vitrificados</b> Thaís Campos Marques; Tiago Omar Diesel; Carolina Gonzales da Silva; Elisa Caroline da Silva Santos; Carlos Frederico Martins; Margot Alves Nunes Dode; Maria Lúcia Gambarini	<b>330</b>
SBTE 239	1572	<b>Influência da suplementação alimentar de novilhas Nelore com ácidos graxos poliinsaturados sobre a criotolerância e o perfil de lipídios de membrana de embriões produzidos <i>in vitro</i> frescos e vitrificados</b> Beatriz Caetano da Silva Leão; Nathália Alves de Souza Rocha-Frigoni; Erikis Nogueira; Elaine Cristina Cabral; Christina	<b>330</b>

		Ramires Ferreira; Marcos Nogueira Eberlin; Monica Ferreira Accorsi; Thiago Vieira Neves; Gisele Zoccal Mingoti	
SBTE 240	1579	<b>Criotolerância e taxa de concepção após exposição de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> ao Forskolin ou ácido linoleico antes da vitrificação</b> Melissa Meneghel; Priscila Chediek Dall Acqua; Marcela Ambroggi; Lucas Maciel Gouvêa; Marcos Antônio de Achilles; Beatriz Caetano da Silva Leão; Eriklis Nogueira; Nathália Alves de Souza Rocha-Frigoni; Gisele Zoccal Mingoti	331
SBTE 241	1591	<b>Avaliação espermática de bubalinos criopreservado em diferentes diluidores com uso de sondas fluorescentes</b> Anelise Sarges Ramos; Nathalia Clemente Barreto; Sebastião Tavares Rolim Filho; Haroldo Francisco Lobato Ribeiro; Elenara Botelho Araujo; Otávio Mitio Ohashi; Henry Daniel Manrique Ayala; Alessandra Ximenes Santos; Arnaldo Algaranhar Gonçalves; Victor da Costa Mileo	332
SBTE 242	1596	<b>Avaliação espermática de bubalinos criopreservado em diferentes diluidores com uso de sondas fluorescentes</b> Eliza Diniz de Souza; Natana Chaves Rabelo; Rhaisa Bernarde Silva Dias; Michele Munk Pereira; Gustavo Torres de Souza; Iuri Drumond Louro; Luiz Sérgio de Almeida Camargo	333
SBTE 243	1597	<b>Taxa de apoptose após vitrificação/reaquecimento de embriões Gir produzidos <i>in vitro</i></b> Clara Ana Santos Monteiro; Beatriz Abdalla Ferraz de Barros; Paola Maria da Silva Rosa; Gabriela Ramos Leal; Agostinho Jorge dos Reis Camargo; Raquel Varella Serapião; Clara Slade Oliveira	333
SBTE 244	1601	<b>Uso de marcadores moleculares CLARIFIDE Nelore para predição de índices reprodutivos em novilhas Nelore</b> Juliano Rodrigues Melo; Aduino José Guedes Franco Filho; Everton Rodolfo Carvalho; Rafael Carvalho; Mauro Meneguetti; Fernando Alfonso Di Croce; Ocilon de Sá Filho; Jason Barrett Osterstock	334
SBTE 245	1614	<b>Influência da via GMPC no conteúdo lipídico de oócitos bovinos maturados <i>in vitro</i></b> Letícia Schefer; Katia Lancellotti Schwarz; Daniela Martins Paschoal; Hugo Fernandes; Fernanda Cavallari Castro; Cláudia Lima Verde Leal	334
SBTE 246	1623	<b>Administração de Cloprostenol na primeira semana pós parto não parece modificar a expressão de PTGFR no endométrio de vacas mestiças</b> Aline Sousa Camargos; Sabine Wohlrres-Viana; Isadora Frazon Costa; Luiz Sérgio de Almeida Camargo; João C.P. Ferreira; Alcides Amorim Ramos; Eunice Oba	335
SBTE 247	1648	<b>A cinética das primeiras clivagens influencia o padrão de metilação de DNA de embriões bovinos</b> Jéssica Ispada; Kelly Annes; Camila Bruna de Lima; Roberta Ferreira Leite; Marc-André Sirard; Marcella Pecora Milazzotto	335
SBTE 248	1676	<b>Efeito das células do cumulus durante a vitrificação de ovócitos ovinos</b> Pedro Claudino Claudino dos Santos Neto <sup>1</sup> ; Marcela Vilariño <sup>1</sup> ; Martina Crispo <sup>2</sup> ; Alejo Menchaca <sup>1</sup>	336
SBTE 249	1703	<b>Influência do touro na cinética de desenvolvimento de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> e na recuperação após vitrificação por Cryotop</b> Ligiane Oliveira Leme; Margot Alves Nunes Dode	336

## Desafios globais para o século XXI: o papel e a estratégia do setor agropecuário

R. Webb<sup>1,3\*</sup>, J. Buratini<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Divisão de Zootecnia, Faculdade de Biociências, Universidade de Nottingham, Nottinghamshire, UK.

<sup>2</sup>Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade do Estado de São Paulo, Botucatu, SP, Brasil.

Título curto: Desafios globais do século XXI

\*Autor para correspondência: bob.webb@nottingham.ac.uk

Tel: +44(115)951-6051

### Resumo

A atividade humana representa um impacto constante no meio ambiente, geologia e ecossistemas. Existe uma probabilidade de 80% que a população mundial aumente para 9,6 a 12,3 bilhões em 2100 e poderia chegar a 10 bilhões em 2056, 6 anos mais cedo do que o esperado. Historicamente, a produção global de alimentos tem ultrapassado o crescimento do consumo. Isto é evidenciado pela diminuição real dos preços dos alimentos, entretanto, existe uma modificação causada por redução dos suprimentos e aumento contínuo da demanda. Paradoxalmente, enquanto bilhões sofrem por falta de alimentos, mais de 2 bilhões de pessoas, aproximadamente 30% da população mundial, apresentam sobrepeso ou obesidade e esta porcentagem continua a crescer. Também é estimado que o mundo tenha que fechar um gap significativo de alimento em 2050, primeiramente em razão do contínuo crescimento da população e mudança dos hábitos alimentares. Aumentos na temperatura global em mais de dois graus Celsius são antevistos como impacto negativo na tentativa mundial de aumentar as colheitas. Os produtos agrícolas, inclusive sua manufatura, preparação e cozimento, contribuem com aproximadamente 30% da emissão de gases de efeito estufa no mundo e a criação de animais por aproximadamente 50% destes 30%. O setor primário será cada vez mais guiado por estas mudanças globais, incluindo-se uma população mundial crescente, desenvolvimento rápido de economias emergentes, com aspirações de estilos de vida ocidentais, crescente instabilidade geopolítica devido a restrições de terras, água, energia, e assuntos de saúde única. Entretanto, uma revolução tecnológica está em andamento, inclusive avanços em nutrição, genética, informática, imagem de satélites, sensibilidade remota, meteorologia, agricultura de precisão e de baixo impacto. Espera-se que estas mudanças continuem a dirigir o investimento global em tecnologias para a agricultura. É de importância vital que os países ao redor do globo reconheçam todas as oportunidades e desafios, e ainda ofereçam toda rede de suporte e infraestrutura apropriados. Neste sentido, aumentar a pesquisa de ponta em produção animal será essencial para ajudar a combater a falta de alimentos e os desafios ambientais e é uma mensagem que cientistas animais e veterinários devem fazer ao redor do mundo para governos e agências de fomento. Práticas agrícolas continuarão a ser modificadas globalmente em virtude das demandas competitivas. Portanto é essencial que o setor pecuário se beneficie tanto das melhorias contínuas

da tecnologia da reprodução quanto da aplicação de tecnologias futuras de modo a atender a estes desafios globais.

**Palavras-chave:** segurança alimentar, gases efeito-estufa, animais de produção, sustentabilidade, tecnologia

### Introdução

Foi proposto que o mundo esteja adentrando ou já tenha adentrado a era do antropoceno, após sair do holoceno, uma vez que a atividade humana apresenta um impacto significativo no meio ambiente, geologia e ecossistemas da Terra (Zalasiewicz *et al.*, 2015). Em um relatório recente da UE (Expo Milano, 2015, UE Recomendações do Comitê Científico Diretor) houve um sumário de alguns dos problemas-chave globais. Por exemplo, o relato afirma que ao redor de 1 bilhão de pessoas sofre cronicamente de fome. Em comparação, em virtude do consumo exagerado de alimentos, associado à redução da atividade física, aproximadamente duas vezes este número de pessoas sofrem de sobrepeso. Ademais, em Paris, em dezembro de 2015, 195 países concordaram em tentar manter a elevação da temperatura global para menos de 2°C acima dos níveis pré-industriais e mesmo engendrar esforços para alcançar 1,5°C, uma vez que um aumento de mais de 2 graus Celsius deve impactar negativamente os rendimentos das maiores colheitas (Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas - IPCC), 2012; 2013; Relatos de choques no clima e na produção global, 2015). Entretanto, infelizmente o setor agropecuário estava ausente das discussões em Paris (Benton e Bajželj, 2016). Também, o impacto do empreendedorismo e atividades humanas associados ao crescimento populacional contínuo, resultará em aumento dos desafios globais no século 21. Este manuscrito aborda alguns desafios globais, o impacto deles na pecuária e possíveis estratégias para mitigá-lo, inclusive o desenvolvimento e benefício de novas tecnologias. Estas serão discutidas em conjunto com possíveis estratégias que países, isoladamente e em colaboração, poderão desenvolver para enfrentar os desafios, utilizando exemplos de programas em andamento no Reino Unido e no Brasil.

### Os desafios globais

O foco desta revisão recai sobre crescimento da população mundial, segurança alimentar, mudanças climáticas e atividade pecuária. Entretanto, o impacto adicional de outros desafios, como a ligação entre saúde



humana e animal, zoonoses, aumento da resistência a antibióticos, precisam ser reconhecidos.

### Crescimento da população

A população mundial no momento da redação deste manuscrito situa-se por volta de 7,5 bilhões de pessoas com um crescimento diário de aproximadamente 200 mil pessoas. Nos primórdios da agricultura, por volta de 8.000 A.C., a população mundial era estimada em 5 milhões, com uma taxa de crescimento de menos de 0,05% para alcançar 2 a 300 milhões por volta do ano 1 D.C. Uma mudança significativa aconteceu com a revolução industrial por volta de 1.800 D.C. com o segundo bilhão de habitantes sendo alcançado em apenas 130 anos. O pico de crescimento aconteceu na década de 60 do século passado quando atingiu aproximadamente 2,2%, mas atualmente encontra-se em declínio ao redor de 1,15% ao ano. As Nações Unidas publicaram recentemente a projeção da população mundial com base em dados até 2012. Análises destes dados revelam que, ao contrário de previsões anteriores, e apesar do declínio na taxa de natalidade, é pouco provável que a população mundial pare de crescer neste século. De fato, existe uma probabilidade de 80% que a população mundial aumente entre 9,6 e 12,3 bilhões em 2100 e poderia mesmo alcançar 10 bilhões no ano de 2056, 6 anos antes do esperado. Muito deste crescimento é esperado acontecer na África, em parte em razão das maiores taxas de fertilidade e em parte por uma recente diminuição do ritmo de declínio da fertilidade. Também, a razão entre pessoas em idade produtiva e idosos tende a diminuir em todos os países, mesmo naqueles que hoje possuem uma população jovem (Gerland *et al.*, 2014). Atualmente o Banco Mundial indica uma proporção de 8% para pessoas acima dos 65 anos de idade, mas isto alcança os 20% em alguns países da Europa ocidental.

Dados recentes do Departamento de Assuntos Sociais e Econômicos das Nações Unidas, Divisão de população, demonstra que mais mulheres utilizam planejamento familiar, com algumas regiões mais pobres registrando o ritmo mais rápido de crescimento desde o ano 2000. Em 2015 estima-se que 64% de todas as mulheres casadas ou vivendo com seu parceiro entre 15 e 49 anos utilize planejamento familiar, em comparação aos 36% de 1970. Entretanto, apesar do sucesso dos últimos 40 anos, concluiu-se que investimento em planejamento familiar é necessário para manter alta a demanda e satisfazer as necessidades das mulheres que não tem acesso aos serviços (veja Conselho Populacional). Ademais, em comentário recente na revista *Lancet* (Abortos mundiais de 1990 a 2014, 2016) concluiu-se que conhecimento adicional em relação à incidência de abortos induzidos é necessário para motivar e informar mulheres a evitar a gravidez indesejada e monitorar o progresso para este fim. Estima-se que as taxas de aborto tenham diminuído significativamente desde 1990 no mundo desenvolvido, mas não nos países em desenvolvimento. Uma conclusão importante enfatizou que assegurar o acesso à saúde sexual e reprodutiva poderia ajudar milhões de mulheres a evitar gravidez indesejada e assegurar o acesso ao aborto seguro.

Em resumo, apesar do sucesso no uso de contraceptivos, a população mundial continua a crescer, resultando em demanda crescente por alimentos e recursos. A organização de alimento e agricultura (FAO) demanda projeções e o Instituto Mundial de Recursos (WRI; Ranganathan *et al.*, 2016), estima que o mundo necessite suprir ao menos um gap alimentar calórico de 60% entre as calorias disponíveis em 2006 e as previstas para 2050 (Foley, 2011). Em conclusão, o gap alimentar resultará primariamente do contínuo crescimento da população e mudança de hábitos alimentares.

### Segurança alimentar

A segurança alimentar, definida pela FAO, ocorre quando: todas as pessoas, em todos os momentos, tem acesso físico, social e econômica suficiente, à alimentação segura e nutritiva que atenda suas demandas nutricionais e preferências para uma vida ativa e saudável. Apesar dos progressos existem 800 milhões de pessoas que sofrem de fome cronicamente nos países em desenvolvimento, com aproximadamente 3 milhões de crianças morrendo a cada ano devido à sub ou má nutrição e ainda 160 milhões de crianças de até 5 anos que tem problemas de desenvolvimento e carregarão este fardo por toda sua vida. Globalmente estamos longe de possuímos uma segurança alimentar (Fatos e Estatísticas da Fome e Pobreza Mundiais, 2015). De fato é estimado que ao redor de 2 milhões de pessoas sofram de deficiência de ferro (Organização Mundial da Saúde - WHO, 2012) ou deficiências de outros micronutrientes causadas primariamente pela falta de acesso aos alimentos, o que na maioria das vezes não se deve à pobreza absoluta ou relativa. Por exemplo, acesso limitado aos alimentos e inflação com aumento rápido do preço dos alimentos pode ser uma causa de migração para o ser humano. Paradoxalmente, enquanto bilhões sofrem de insegurança alimentar por falta de alimentos, mais de 2 bilhões de pessoas, ou 30% da população mundial, sofrem de sobrepeso ou obesidade e esta porcentagem continua a crescer (WHO, 2015). Isto é frequentemente associado à pobreza e é uma consequência do consumo exagerado de calorias, falta de acesso à nutrição apropriada, assim como falta de atividade física. Ainda, o excesso no consumo de calorias progressivamente aumenta os custos pessoas, de saúde pública e ambientais e portanto aumenta a pressão não apenas sobre o suprimento mundial de alimentos, mas também nos sistemas nacionais de saúde. Em resumo, segurança alimentar e nutricional é uma preocupação para todas as sociedades. É importante ressaltar que a FAO estima que exista alimentos suficientes para prover a cada indivíduo diariamente aproximadamente 2.770 kcal (FAO, 2012; Fatos e Estatísticas da Fome e Pobreza Mundiais, 2015).

Historicamente, a produção global de alimentos suplantou o crescimento do consumo como evidenciado pela queda real dos preços dos alimentos. Entretanto, este “descompasso” vem diminuindo por causa de restrições no abastecimento acompanhado por crescimento constante da demanda (Comissão Europeia, 2011). Por exemplo, mais pessoas demandam mais alimento que necessita de mais recursos para ser produzido, como a carne. Adicionalmente,

na maioria dos lugares existe um considerável desperdício de alimentos. Do lado da oferta, o crescimento histórico da produção diminuiu e mesmo atingiu um platô nos últimos anos, o que é o caso do Reino Unido. A aceitabilidade das soluções tecnológicas para aumentar a produção é muitas vezes rechaçada e aconteceu na EU (Comissão europeia, 2011). Adicionalmente, existe um aumento da competição por terras, água e outros recursos naturais, que pode impactar a produção global de alimentos e as mudanças climáticas e também ameaça o crescimento da produção em muitas áreas. Uma preocupação adicional é diminuir o impacto da agricultura, aquicultura e indústria de pescados sobre o meio ambiente, inclusive a emissão de gases de efeito-estufa; enquanto objetivarmos manter a produção, provavelmente muitas mudanças serão necessárias na forma como produzir alimentos.

Como as modificações de hábitos alimentares, incluindo-se o tipo, combinação e quantidade de alimentos consumidos pode contribuir para um futuro alimentar sustentável? Como discutido, a população mundial está projetada para alcançar 10 milhões de pessoas em 2050, sendo que dois terços destas pessoas ocuparão as cidades. Adicionalmente, ao menos 3 bilhões de pessoas devem alcançar a classe média global em 2030. Como as nações se urbanizam e as pessoas se tornam mais saudáveis, as dietas mudam e geralmente as pessoas passam a consumir mais calorias e dividir os recursos para aquisição dos alimentos mais calóricos, como carne e derivados do leite, em suas dietas. Nos últimos 40 anos, o consumo mundial per capita de leite dobrou e o consumo de carne mais do que triplicou (Kearney, 2010).

Ao mesmo tempo a globalização, os avanços tecnológicos, as mudanças econômicas e as políticas governamentais tem transformado cadeias produtivas inteiras. Cadeias multinacionais tem influenciado crescentemente o que se planta e o que as pessoas comem. Juntos, estas são tendências em direção às dietas ocidentalizadas, ricas em calorias, proteína e produtos de origem animal. De fato, na China, o consumo de carne aumentou em nove vezes (Kearney, 2010). Apesar desta mudança ser um reflexo de saúde e bem-estar para muitas pessoas, inclusive aumento da longevidade, a escala desta mudança de hábitos alimentares em andamento vai tornar o alcance de alguns objetivos das nações unidas para o desenvolvimento sustentável mais difícil, como reduzir a fome, melhorar as condições de vida, melhorar o uso da água, combater as mudanças climáticas e proteger os ecossistemas terrestres (Ranganathan *et al.*, 2016). Em resumo de acordo com tendências recentes, a demanda deve aumentar mais do que a oferta em meados do século 21 aumentando a pressão para se converter mais terras em plantações e pastagens. A combinação destes fatores sinaliza que o setor agropecuário continuará a crescer. Mudanças de algumas práticas poderiam compensar os aumentos, mas alcançar estas mudanças será um desafio que requer pesquisa colaborativa e desenvolvimento entre os continentes.

### Mudanças climáticas

O impacto negativo das mudanças climáticas com

aumento de temperatura que pode chegar a mais de 2°C (Panel Intergovernamental de Mudanças Climáticas- IPCC, 2012, 2013; Clima e produção Global – relatórios de choque, 2015), na produção global das maiores colheitas será distribuído pelo globo de maneira desigual. Está projetado que a produção de grãos em baixas latitudes receberá um impacto negativo, enquanto nas latitudes norte o impacto pode variar. As áreas nas quais as mudanças climáticas estão previstas para colocar em perigo as colheitas (Wheeler e von Braun, 2013) incluem países da África e sul da Ásia, que são o lar de mais de 800 milhões de pessoas desnutridas no mundo (FAO, 2014). A produção de alimentos a partir das culturas de commodities mais importantes, milho, soja, trigo e arroz vem de um número relativamente pequeno de países produtores. A exposição de uma grande proporção da produção global das maiores culturas está, portanto concentrada em áreas específicas do globo. Este relatório enfatiza que eventos climáticos extremos, nestas regiões, terão o maior impacto na produção global de alimentos. Adicionalmente, eventos climáticos extremos simultâneos em duas ou mais destas regiões, levando a uma falha séria que representaria um choque de produção considerável. Entretanto, entender as causas de base dos eventos climáticos extremos em diferentes regiões produtoras ainda é pouco estudado.

Existe uma necessidade urgente de se compreender as dinâmicas dos eventos meteorológicos, como o El Niño, que pode se tornar ainda mais extremo, para se prever a probabilidade de choques de produção em regiões produtoras de alimentos. De fato está previsto que uma catástrofe esteja se desenvolvendo atualmente na África em virtude da falta de produção gerada pelo impacto do El Niño. Foi estimado que 50 milhões de pessoas, distribuídas em vários países, poderiam necessitar de auxílio alimentar nos próximos 12 meses. Uma modelagem inicial feita pela força-tarefa de USA-UK (Relatório Clima extremo e resiliência do sistema de produção global de alimentos, 2015) sugere que o que foi chamado de choque extremo na produção de alimentos no final do século XX vai se tornar mais comum no futuro. Estes dados sugerem que um evento climático a cada 200 anos no final do século XX equivale a uma perda de aproximadamente 8.5% da produção, e ao longo das próximas décadas (2011 to 2040), um evento a cada 200 anos será 15% maior e equivalerá a uma perda de 9.8% da produção de calorias. Ainda, de acordo com a modelagem, um eventos que teriam acontecido na proporção de 1 a cada 100 anos no período entre 1951 e 2010 podem se tornar tão frequentes como 1 a cada 30 anos até a metade do presente século.

A agricultura e a produção de alimentos são emissores significativos de gases de efeito-estufa, causando a emissão de CO<sub>2</sub> pela maquinaria agrícola e o transporte das produções e dos animais, óxido nítrico pelo uso de fertilizantes e (sintéticos e naturais), e metano a partir dos animais e plantações de arroz inundadas (Smith *et al.*, 2014). Ademais, a demanda por alimentos levou a uma expansão das terras cultiváveis em uma taxa de 10 milhões de hectares por ano na última década. Uma parte desta terra era originalmente floresta tropical, adicionando mais emissões e reduzindo a capacidade da terra de absorver e estocar

carbono. Houve uma série de estimativas das emissões de gases efeito-estufa a partir da agricultura e produção de alimentos que varia de acordo com a metodologia utilizada. Por exemplo, a estimativa de 30% de Bajželj *et al.* (2013) inclui a manufatura, preparação e cozimento dos alimentos. Um estudo mais recente calculou que a agricultura, silvicultura e outras partes do setor agrícola é responsável por um pouco menos de um quarto (aproximadamente 10 a 12 GtCO<sub>2</sub>eq por ano) da emissão de gases de efeito-estufa antropogênicos, principalmente do desmatamento e emissão de gases pela pecuária, pelo solo e pelo manejo dos alimentos (Smith *et al.*, 2014). Ademais, de acordo com a FAO das Nações Unidas (FAO, 2014), a produção agrícola e silvícola são responsáveis por aproximadamente 20% de toda emissão de gases efeito-estufa do mundo (25% na América, 12% na Europa, 15% na África, 4% na Oceania e 44% na Ásia). Ao todo, entretanto, produzir e cozinhar o alimento que consumimos resulta em aproximadamente a mesma quantidade de emissão do que as resultantes de viagens, iluminação, aquecimento, climatização e os eletrodomésticos combinados.

### Pecuária

O setor da pecuária compreende 1,3 bilhões de produtores e retalhistas em todo mundo, e contribui com 40 a 50% do produto interno bruto da agropecuária (Herrero *et al.* 2016). Estes autores estimaram que entre 1995 e 2005, o setor pecuário foi responsável por 5,6 a 7,5GtCO<sub>2</sub>eq por ano, o que significa aproximadamente 50% das emissões agropecuárias. Entretanto, a criação animal conta com até a metade do potencial de mitigação técnica da agricultura, silvicultura e outros setores de uso da terra. Isto se dará pela aplicação de opções de manejo sustentáveis que possam intensificar a produção animal, promover o sequestro de carbono nas pastagens, reduzir as emissões dos dejetos orgânicos por meio da redução da demanda por produtos pecuários. Apesar da mitigação da redução do consumo de produtos agropecuários ser grande, seu potencial econômico é desconhecido até o momento (Herrero *et al.*, 2016).

Os animais de produção, particularmente ruminantes, podem se alimentar de uma gama maior de biomassa do que os seres humanos, apesar de que na criação intensiva estes passaram a concorrer com os seres humanos por grãos de alta energia, como os cereais. Em um estudo, Wilkinson (2011) analisou os alimentos consumidos pelos animais em termos de quantidade ingerida e eficiência de conversão de matéria seca (grãos consumidos por seres humanos e subprodutos de grãos) em leite, carne e ovos, utilizando o Reino Unido como exemplo de indústria agropecuária desenvolvida. Concluiu-se que de acordo com a proporção de grãos comestíveis e não comestíveis pelos humanos, utilizados nos típicos sistemas de produção animal, uma estimativa mais realista poderia ser feita comparando-se os sistemas. Entretanto, aumentar a eficiência da produção animal e reduzir a distribuição de produtos de origem animal na alimentação humana são duas possíveis estratégias para dobrar os impactos ambientais adversos no setor agropecuário. Em um estudo recente, Schrader *et al.* (2016) exploraram a oportunidade para criação animal sustentável modelando os

impactos e restrições de uma Terceira estratégia na qual os alimentos para os animais, que competem diretamente com a alimentação humana, sejam reduzidos. Portanto, os animais seriam nutridos apenas com pastagens e subprodutos da indústria de alimentos. Eles mostraram que uma estratégia focada em nos componentes alimentares, que não compitam diretamente com aqueles consumidos por seres humanos, oferece um complemento viável às estratégias de aumento da eficiência da produção e/ou redução da distribuição de produtos de origem animal para consumo humano (Schrader *et al.*, 2016).

Em conclusão, um dos desafios-chave no setor pecuário será o desenvolvimento de avanços tecnológicos na intensificação sustentável. Entretanto esta abordagem será apenas uma via de mitigação junto com diminuição no desperdício de alimentos e melhorias na dieta humana (Bajželj *et al.*, 2014).

### Estratégias Tecnológicas na Agropecuária

Ciência e tecnologia voltada à agricultura é um dos setores que mais crescem e também mais empolgantes no mercado global. Como discutido, este mercado será dirigido por mudanças globais incluindo-se o aumento da população, o rápido desenvolvimento das economias emergentes que aspiram estilos de vida do modo ocidental e aumento da instabilidade geopolítica em virtude de diminuição da disponibilidade de terras, água e energia. Em paralelo acontece uma revolução tecnológica com avanços em nutrição, genética, informática, imagem por satélite. In parallel a technological revolution is also taking place, including breakthroughs in nutrition, genetics, informatics, satellite imaging, sensoriamento remoto, meteorologia, meteorology, agricultura de precisão e baixo impacto. Estas mudanças vão continuar a direcionar grande parte dos investimentos globais em tecnologia agrícola. É de importância vital que os países ao redor do mundo reconheçam as oportunidades e desafios e forneçam uma rede de suporte e investimentos. Reconhecendo estes desafios, inclusive a redução contínua da auto-suficiência alimentar do Reino Unido, o Governo lançou “Estratégia do Reino Unido para tecnologias agrícolas” (Governo do Reino Unido, 2013). Em 2016 a estratégia era expandir para incorporar o setor de produção alimentar e varejo, assim como a produção agrícola primária sob supervisão do Conselho Tecnológico da Agropecuária. Esta estratégia objetiva aumentar a integração da ciência e agribusiness no Reino Unido com o suporte governamental para o comércio, investimento e desenvolvimento internacional. O objetivo é ajudar a abrir uma nova fase de liderança global em inovação agrícola. A visão estratégica seria o Reino Unido se transformar em líder mundial em tecnologia agrícola, inovação e sustentabilidade; explorar oportunidades para desenvolver e incorporar tecnologias existentes e novas, produtos e serviços para aumentar a produtividade; e assim contribuir para a segurança alimentar global e o desenvolvimento internacional.

A missão das estratégias inclui (1) investimento adicional do governo e da indústria na pesquisa e inovação agrícola, e também o lançamento de quatro novos centros de

pesquisa e inovação (Agrimensura, Proteção e Saúde das produções, Pecuária, Engenharia agrônoma de precisão) e investimento em um número significativo de projetos de pesquisa aplicada, fomentando a transferência mais rápida da pesquisa em práticas, ou seja, da fazenda ao garfo via cadeias de abastecimento agropecuárias; (2) promover a expertise do Reino Unido no setor agrotecnológico para estimular investimento, criando uma nova geração de negócios spin-outs e start-up, aumentando a exportação de oportunidades e novas colaborações com economias em desenvolvimento; (3) assumir a liderança global em informática agrícola e em estabelecer a métrica e as técnicas pelas quais o progresso em direção à intensificação sustentável possa ser alcançado; (4) encorajar o investimento em mudanças inclusive aprimorar habilidades e transferência de conhecimento, exploração de dados compartilhados e difusão abrangente de melhores práticas. Ainda, o governo do Reino Unido anunciou um fundo de pesquisa no montante de £1,5 bilhões para os desafios globais, por meio dos conselhos de pesquisa, para apoiar pesquisa de ponta que se ocupem dos desafios enfrentados por países em desenvolvimento. Houve também um grande foco nas habilidades que serão essenciais para acompanhar e tirar proveito do rápido progresso tecnológico, não apenas dentro do setor agropecuário, mas também em outros, como informática e engenharia.

O Brasil também lançou programas para mitigar as ameaças ambientais associadas com os desafios globais, como discutido, e reduzir a escassez de alimentos dentro de suas fronteiras. A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) e o Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento lançaram uma série de programas para redução da pobreza e fome e também para estimular tecnologias agrícolas para apoiar a produção de alimentos de forma saudável para o meio ambiente. O programa “Brasil sem Miséria”, que objetiva aumentar a produção agrícola familiar e aumentar/criar mercados para estes produtos, e o Plano ABC (plano de baixa emissão de carbono na agricultura) são talvez as ações mais relevantes e emblemáticas do governo Brasileiro dentro do contexto os desafios globais. Uma programa relevante, com o Plano ABC diretamente ligado à produção animal, é a política nacional integrada de colheita-pecuária- silvicultura, que objetiva a reabilitação de pastagens degradadas e florestas pleo desenvolvimento de sistemas integrados.

Em conclusão, é essencial que o setor pecuário possa se beneficiar das iniciativas de foment lançadas pelo mundo e continue a desenvolver novas tecnologias reprodutivas para se posicionar e responder melhor aos desafios globais.

### **Tecnologias reprodutivas no século XXI**

Em 2012 Murphy fez uma apresentação para a Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões (SBTE) sobre ‘O futuro da reprodução animal’. O manuscrito de revisão discutiu uma série de tecnologias atuais, inclusive inseminação artificial e abordsagens clássicas de seleção genética (Murphy, 2012). Este manuscrito também ressaltou as maiores limitações do uso destas tecnologias em sistemas de produção extensiva, em conjunto com a utilização de

tecnologias adicionais como prostaglandinas para regredir o corpo lúteo, progestágenos para mimetizar a função luteínica, regulação do desenvolvimento folicular com o uso de estrógenos ou GnRH, e sincronização da ovulação com GnRH e/ou estrógenos (Bó *et al.*, 2007; Lamb *et al.*, 2010; Baruselli *et al.*, 2011). Apesar destas tecnologias apresentarem uma série de benefícios, ainda existe um potencial substancial para melhorias nas taxas de gestação, apesar destes compostos estarem disponíveis no mercado há 50 anos.

Outra tecnologia corrente inclui o uso de semen sexado e a transferência de embriões se tornou mais difundida, particularmente na América do Sul que lidera o mundo (mais de 70%) no número de embriões produzidos *in vitro* (Blondin, 2015). Entretanto, o sucesso desta tecnologia é ainda limitado pela eficácia dos protocolos de superovulação e também pela variabilidade das reservas foliculares (Mapletoft and Bó, 2011; Ireland *et al.*, 2011) e a variação entre raças *Bos taurus* e *Bos indicus* (Morotti *et al.*, 2015; Sartori *et al.*, 2016a), e protocolos de embriogênese *in vitro* (Baruselli *et al.*, 2015). O artigo de revisão de Sartori *et al.* (2016b), publicado nestes anais, descreve o desenvolvimento e a magnitude das tecnologias emu so no Brasil, e também discute os gargalos técnicos que limitam o impacto na eficiência da produção animal. Entre as limitações correntes, um foco especial foi dado aos protocolos sub-otimizados para maturação oocitária e cultivo de embriões levando a baixas taxas de desenvolvimento de blastocisto (em média 25 a 50%), que compromete as taxas de concepção e o sucesso das taxas de parição. Adicionalmente, o desenvolvimento da competência embrionária é comprometido por protocolos de congelamento ineficientes. Uma vez que estes gargalos sejam minimizados, o impacto da produção *in vitro* de embriões na produtividade agropecuária pode aumentar significativamente, particularmente quando utilizados em combinação com estratégias desenvolvidas com base no DNA para a seleção de doadoras como indicado abaixo.

A continuidade e mesmo um aumento na pesquisa e desenvolvimento da pecuária serão essenciais para combater a escassez de alimentos e os desafios ambientais, e é uma mensagem que cientistas animais ao redor do mundo devem fazer a seus governos e agências de fomento. Entretanto a mensagem também deve ser de otimismo, dado o potencial inexplorado de nossas espécies de produção. O rendimento potencial das espécies de plantações e animais de criação, inclusive restrições e oportunidades no século XXI, foram revisadas e analisadas extensivamente (Sylvester-Bradley e Wiseman, 2005). Para animais de produção as oportunidades incluem (i) aumento da proporção de gestação gemelares em bovinos, (ii) controle mais preciso da sazonalidade, tamanho dap role, sobrevivência dos cordeiros e puberdade em ovinos, (iii) aumentar a fecundidade em suínos, (iv) aumentar o rendimento da produção de leite em vacas e ovelhas, (v) melhorar a eficiência da conversão alimentar, qualidade da carne e crescimento em vacas e ovelhas de corte. Entretanto, para obter estes benefícios, precisaremos melhorar o manejo dos animais, estratégias de bem-estar e de alimentação serão requeridas (Sinclair e Webb 2005; Webb *et al.*, 2005; Garnsworthy e Thomas 2005). Em todas

as espécies, as tendências previstas para aumentar o rendimento, acompanhadas por aumento na eficiência, estão projetadas para reduzir o impacto da produção animal no meio ambiente, principalmente por meio da redução do número de animais requeridos para uma certa produção de carne e leite (Garnsworthy, 2004). Entretanto, é importante ter em mente que mais abordagens baseadas em sistemas serão necessárias, em conjunto com a incorporação de mais tecnologias fisiológicas e genéticas. Ainda, apesar dos grandes avanços genéticos nos traços quantitativos de crescimento, produção e eficiência de animais de produção nas últimas décadas, as evidências sugerem que pouca variação foi perdida e que as melhorias deverão ser sustentadas no futuro (Hill, 2016).

A seleção tradicional orientada pelo mercado não resulta em disseminação do uso da informação do DNA na reprodução animal (Meuwissen *et al.*, 2016). A principal razão para isto é que os traços de interesse para a produção animal são muito mais complexos do que esperado e são determinados por milhares de genes com pouco efeito no fenótipo (Haley *et al.*, 1993). Entretanto, avanços em genotipagem e sequenciamento na última década resultaram no desenvolvimento e aplicação da seleção genética, que é indiscutivelmente o avanço mais importante na reprodução animal desde o desenvolvimento da melhor predição linear imparcial nos idos de 1940 (ver Hickey *et al.*, 2016).

A seleção genômica assume que todos os marcadores possam estar ligados a um gene afetando o traço e se concentra em estimar seu efeito, mais do que testar sua significância. Três avanços tecnológicos resultaram na corrente disseminação do uso da informação do DNA na reprodução animal: (i) o desenvolvimento da tecnologia de seleção genética, (ii) a descoberta de números massivos de marcadores genéticos (single nucleotide polymorphisms, SNPs), e (iii) tecnologia de alta capacidade para genotipar animais para centenas e mesmo milhares SNPs de uma maneira economicamente viável. A utilização dos dados do completos do sequenciamento do genoma poderá exercer um impacto significativo na reprodução de vacas de corte e de leite, suínos e aves (Meuwissen *et al.*, 2016). Por exemplo, na reprodução de ovinos e caprinos, a redução rápida do custo da genotipagem associada com a melhor compreensão de como maximizar os benefícios da seleção genética deve resultar em um aumento dramático da adoção destas abordagens (Rupp *et al.*, 2016). Em gado de corte, o desenvolvimento de avaliações genéticas acuradas é mais difícil do que em gado de leite, em razão da presença de muitas raças, a pouca abrangência da fenotipagem e a falta de uso da inseminação artificial (Berry *et al.*, 2016), e os sistemas de produção de carne ovina e bovina são negócios de baixa margem de lucros e tem a tendência de adotar novas tecnologias mais lentamente. Entretanto, o desenvolvimento de sensores de baixo custo, como a tecnologia de ultra banda larga para detecção de estro (Homer *et al.*, 2013), e associado à tecnologia da informação para geração e captura de fenótipos devem exercer um impacto positivo. Estas tecnologias, associadas a iniciativas internacionais, sugerem que a rede necessária para maior desenvolvimento de predições genéticas está instalada, e beneficiará certamente a produção de bovinos e ovinos de corte (Berry *et al.*, 2016).

Ainda, a edição significativa do genoma em populações de animais de produção (bovinos, ovinos e suínos) já resultou em zigotos e animais viáveis. A ideia da edição do genoma aparece como muito avançada, na medida em que bases específicas do genoma podem ser deletadas, modificadas ou adicionadas (Hickey *et al.* 2016). Importante ressaltar que estas modificações são permanentes e, se realizadas em linhagens de células tronco, são herdáveis e avanços desta tecnologia estão acontecendo regularmente. Da perspectiva da reprodução animal, o papel da edição do genoma inclui (i) fixar alelos favoráveis para traços monogênicos (p.ex. resistência a doenças, miostatina), (ii) remoção dos alelos recessivos que causam impacto na fertilidade e (iii) aumentar a frequência de alelos favoráveis para traços poligênicos (Hickey *et al.*, 2016). Estes avanços, somados ao aumento da compreensão dos efeitos epigenéticos (Sinclair *et al.*, 2007), trarão conhecimento mas também oportunidades e desafios, que poderão potencialmente ser incluídos nos programas de reprodução animal. Estes incluem a necessidade de uma tecnologia para sequenciamento do epigenoma em larga escala relativamente barata, e em grande número de indivíduos, para se estimar acuradamente a variação epigenética em nível de rebanhos. Métodos de análises estatísticas também precisam ser desenvolvidos para incorporar informações de metiloma completo em conjunto com mega dados sobre ambiente e sequenciamento de DNA. Implementação trática deve ser cuidadosamente avaliada para incorporar a informação epigenética com sucesso na reprodução animal, inclusive cruzamentos selecionados para se obter genótipos que favoreçam um certo epigenótipo (González-Reco *et al.*, 2015). Em resumo, práticas multidisciplinares de manejo/nutrição poderiam resultar na incorporação de epigenótipos favoráveis nas populações, adicionalmente às tecnologias de edição do genoma.

## Conclusões

Os desafios da segurança alimentar, mudanças climáticas e de população são evidentes. Segurança alimentar para a maioria da população mundial diz respeito à nutrição para uma vida saudável, não apenas calorias para sobrevivência. Mais de 50% da população mundial é mal nutrida, apresentando tanto sobrepeso como subpeso, e o fardo econômico global das doenças não notificáveis (Alleyne *et al.*, 2013) está crescendo rapidamente. De fato, isto é considerado um dos maiores desafios para o desenvolvimento sustentável do século XXI. Por exemplo, em muitos países, a pobreza e a obesidade são correlacionadas, e dietas inadequadas para a população urbana é uma grande preocupação, associada à deficiência calórica e de micronutrientes para países em desenvolvimento.

Como discutido, o desafio da IPCC é limitar as mudanças climáticas a variações inferiores a 2°C, o que requer um consumo mais sustentável. Como as emissões da agropecuária correspondem a aproximadamente 30% das emissões globais, e crescem continuamente ao invest de diminuir, o argumento de que a demanda está crescendo e precisamos crescer ainda mais para atender a estas

demandas, se reconhece como sendo insustentável. Isto resultará numa atenção mais focada em medidas para a demanda, como mudança da dieta e redução do desperdício.

Houve muito debate em mudanças alimentares e produção animal. Por exemplo, existem discussões em andamento que os seres humanos devem consumir menos carne, particularmente porque mais de 90% dos países e territórios no mundo consomem mais do que sua necessidade diária (Ranganathan *et al.*, 2016). Alternativamente, os seres humanos ingerir mais carne de vaca e ovelha alimentadas a pasto, além de consumir menos carne, e/ou mais frango do que carne vermelha. O relatório recente da WRI indica que não existe atualmente uma crise protéica, pois em média todas as regiões do globo consomem mais proteína do que é requerido, apesar de estar previsto que a demanda gerada por desejos para consumo de proteína de origem animal vai crescer. Está claro que um consumo mais sustentável, ou mesmo a diminuição de produtos cárneos e lácteos, será indispensável para atingir o objetivo de 2°C, a menos que avanços tecnológicos sem precedentes, como a revolução verde que aconteceu 50 anos atrás (Borlaug, 2000), se repita (Hedenus *et al.*, 2014).

Existem três caminhos possíveis que poderíamos seguir para responder a esta conclusão sóbria: (i) continuamos como estamos e desrespeitamos os objetivos da IPCC estabelecidos em Paris, e portanto talvez alcancemos um aquecimento global de 4 a 5°C ao final deste século. (ii) Nós nos apoiamos em pesquisa e inovação para encontrar caminhos de aumentar significativamente a produção e reduzir a taxa de conversão de solo para desenvolver a captura e estocagem de carbono. (iii) Nós reconhecemos que a demanda por alimento está direcionando emissões e trabalhos para induzir mudanças que atinjam melhorias a meio caminho do lado da oferta (T. Benton, 2016; Universidade de Leeds).

A primeira opção não é uma estratégia viável a longo prazo. A segunda apresenta possibilidades, mas existem poucas evidências de orçamentos na escala necessária para atender a pesquisa que está por vir, e o fato é que recursos para pesquisa têm diminuído em alguns países. Adicionalmente, existe uma lacuna significativa entre potencial de mitigação e viabilidade econômica. Portanto, a terceira opção parece, ao menos no momento, o melhor caminho a seguir.

Está claro que nossos hábitos globais, com poucas exceções, mudaram rapidamente nas últimas décadas. Mais alimento é consumido per capita, geralmente o alimento é barato em relação aos salários, existe uma maior escolha e disponibilidade, e o que também é importante, existe um desperdício significativo. Entretanto, não existe razão para que os hábitos não se modifiquem novamente para alcançarmos um estilo de vida mais sustentável? Um começo positivo seria a diminuição do desperdício. Por exemplo, em nível global, aproximadamente um terço dos alimentos é perdido nos campos ou durante a estocagem, ou desperdiçado nas cadeias produtivas e em nossos lares. Desperdício de alimentos não é apenas um desperdício de recursos valiosos, mas também causa emissões adicionais quando é encaminhado para aterros. Por exemplo, o desperdício de alimentos custa em média para uma família

no Reino Unido aproximadamente 1000,00 dólares por ano.

Uma opção seria reduzir o consumo de carne e leite produzidos de forma intensiva. Criação animal é uma forma menos efetiva de produzir alimentos do que plantar grãos. Atualmente, um terço das plantações são destinadas a alimentação animal para produção de carne, e aproximadamente metade das emissões da agropecuária estão relacionadas à produção de carne, mais do que todo o setor de transportes. Se utilizássemos as terras que atualmente são destinadas a alimentação animal para cultivar alimentos para os seres humanos, e consumíssemos apenas leite e carne de animais alimentados a pasto ou com subprodutos da alimentação humana, teríamos a possibilidade de reduzir as emissões de maneira significativa. Se continuarmos a consumir quantidades crescentes de animais alimentados de maneira intensiva, então a escolha da carne se torna muito importante pois o gado produz mais do que cinco vezes a quantidade de gases do que aves e suínos, apesar de, como discutido anteriormente, uma avaliação robusta da eficiência de conversão alimentar seja premente (Wilkinson *et al.*, 2011) no contexto de se obter estimativas mais realistas das emissões.

De maneira crescente, as pessoas no mundo ingerem mais calorias do que é recomendado, como afirmado anteriormente, aproximadamente 2 bilhões de pessoas apresentam sobrepeso ou obesidade e este número continua a crescer. Na Europa, por exemplo, a população consome duas vezes mais carne do que é preconizado para uma alimentação saudável, enquanto que nos EUA este número é de 3 vezes. Portanto, uma mudança global em direção a dietas baseada em vegetais reduziria a mortalidade global em até 10% e a emissão de gases de efeito estufa em até 70% em 2050 (Springman *et al.*, 2016). Isto significa que o ajuste nas dietas e combater o desperdício faz com que os objetivos de Paris sejam mais alcançáveis. Em um estudo recente de modelagem, Herrero *et al.* (2016) concluíram que o potencial de mitigação das reduções no consumo de produtos de origem animal é grande, mas seu potencial econômico ainda é desconhecido.

Finalmente, outro desafio global que terá um grande impacto no século XXI, e não foi discutido em detalhes nesta revisão, é a ligação entre a saúde animal e a saúde humana, zoonoses e a crescente resistência aos antibióticos (ver Wegener, 2012). A epidemiologia da resistência dos microorganismos na interface ser humano-animal é complexa, apesar de ser calculado que o volume de antimicrobianos utilizados em nutrição animal exceda sua utilização em humanos em todo mundo. A agenda One Health (Saúde Única) (Gibbs, 2014) está ganhando projeção significativa ao redor do mundo quando aborda transmissão de agentes zoonóticos que são resistentes aos antimicrobianos. Haverá uma necessidade crescente de engajar um amplo espectro de pessoas interessadas, não apenas pesquisadores, mas também fazendeiros, veterinários, profissionais da cadeia de alimentos, médicos, assim como experts em meio ambiente e vida selvagem para controlar e monitorar as atividades e coordenar as respostas a este desafio global, que acontecerá inevitavelmente.

É evidente que mais pesquisa e investimento são necessárias para aumentar a acessibilidade e captação das

práticas de mitigação, para moderar o consumo de produtos de origem animal onde for apropriado, e evitar os impactos negativos nos meios de subsistência, atividades econômicas e o meio ambiente. Importante, entretanto, seria entender que a limitação da incorporação de novos métodos agropecuários, em conjunto com altos custos significa que uma proporção relativamente pequena do que é tecnicamente possível também é economicamente viável. Avanços contínuos no uso de tecnologias reprodutivas, aliados ao desenvolvimento de novas tecnologias reprodutivas, serão essenciais.

Em conclusão, o foco futuro deveria ser no desenvolvimento de abordagens baseadas em sistemas (Randolph *et al.*, 2007), junto com o uso de novas tecnologias e práticas agropecuárias de maneira custo-efetiva e preocupadas com o bem-estar. Esta estratégia deve assegurar que a aplicação de novas tecnologias que certamente se tornarão disponíveis durante o século XXI, deveria auxiliar a maximizar a eficiência e sustentabilidade da produção animal e reduzir o impacto ambiental. Neste contexto, vale a pena se lembrar o comentário “Não é a espécie mais forte que sobrevive, nem a mais inteligente; mas principalmente aquelas mais adaptáveis às mudanças” (atribuída a L. C. Megginson quando interpretou Charles Darwin em *Origem das Espécies*, 1963).

### Agradecimentos

Professor Tim Benton, Campeão do Reino Unido para segurança alimentar e ecologia de populações, Universidade de Leeds, e Professor Geoff Simm, Conselho Técnico de Agropecuária e SRUC, Edinburgo, pelas informações e ideias para discussão.

### Referências

- Alleyne G, Binagwaho A, Haines A, Jahan S, Nugent R, Rojhani A, Stuckler D. 2013. Non-communicable diseases 1. Embedding non-communicable diseases in the post-2015 development agenda. *Lancet*, 381:566-574.
- Bajželj B, Allwood JM, Cullen JM. 2013. Designing climate change mitigation plans that add up. *Environ Sci Technol*, 47:8062-8069.
- Bajželj B, Richards KS, Allwood JM, Smith P, Dennis JS, Curmi E, Gilligan CA. 2014. Importance of food-demand management for climate mitigation. *Nat Clim Change*, 4:924-929.
- Baruselli PS, Ferreira RM, Sales JN, Gimenes LU, Sá Filho MF, Martins CM, Rodrigues CA, Bo GA. 2011. Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. *Theriogenology*, 76:1583-1593.
- Baruselli PS, Vieira LM, Batista EOS, Ferreira RM, Sales JNS, Gimenes LU, Torres-Junior JRS, Martins CM, Sá Filho MF, Bó GA. 2016. Updates on embryo production strategies. *Anim Reprod*, 12:375-382.
- Benton T, Bajželj B. 2016. Where was food in the COP21 Paris agreement. Available on: <http://www.foodsecurity.ac.uk/blog/2016/04/where-was-food-in-the-cop21-paris-agreement>.
- Berry DP, Garcia JF, Garrick DJ. 2016. Development and implementation of genomic predictions in beef cattle. *Anim Front*, 6:32-38.
- Blondin P. 2015. Status of embryo production in the world. *Anim Reprod*, 12:356-358.
- Bó GA, Cutaia L, Peres LC, Pincinato D, Marana D, Baruselli PS. 2007. Technologies for fixed-time artificial insemination and their influence on reproductive performance of *Bos indicus* cattle. *Soc Reprod Fertil Suppl*, 64:223-236.
- Borlaug NE. 2000. Ending world hunger. The promise of biotechnology and the threat of antiscience zealotry. *Plant Physiol*, 124: 487-490.
- Climate and Global Crop Production Shocks Report. 2015. Resilience taskforce sub-report. Available on: [www.foodsecurity.ac.uk/assets/pdfs/climate-and-global-crop-production-shocks.pdf](http://www.foodsecurity.ac.uk/assets/pdfs/climate-and-global-crop-production-shocks.pdf). 28 pp.
- European Commission. Standing Committee on Agricultural Research. 2011. Sustainable food consumption and production in a resource-constrained world. 147 pp. Available on: [https://ec.europa.eu/research/agriculture/scar/pdf/scar\\_feg\\_ultimate\\_version.pdf](https://ec.europa.eu/research/agriculture/scar/pdf/scar_feg_ultimate_version.pdf).
- European Commission. Joint Research Centre. 2015. New ways of providing knowledge to tackle food nutrition security. What should the EU do? Expo 2015: EU Scientific Steering Committee: Recommendations. 64 pp. doi: 10.2788/877760.
- Extreme weather and resilience of the global food system. 2015. Final Project Report from the UK-US Taskforce on Extreme Weather and Global Food System Resilience, The Global Food Security Programme, UK. Available on: [www.foodsecurity.ac.uk/assets/pdfs/extreme-weather-resilience-of-global-food-system.pdf](http://www.foodsecurity.ac.uk/assets/pdfs/extreme-weather-resilience-of-global-food-system.pdf).
- Foley JA. 2011. Can we feed the world; sustain the planet? *Sci Am*, 305:60-65.
- Food and Agriculture Organization. 2012. World agriculture towards 2030/2050: The 2012 Revision. ESA Working Paper No. 12-03, Rome. Available on: [http://www.fao.org/fileadmin/templates/esa/Global\\_persepectives/world\\_ag\\_2030\\_50\\_2012\\_rev.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/esa/Global_persepectives/world_ag_2030_50_2012_rev.pdf).
- Food and Agriculture Organization. 2014. Climate change. Available on: <http://www.fao.org/resources/infographics/infographics-details/en/c/218650>.
- Food and Agriculture Organization, International Fund for Agricultural Development, World Food Programme. 2014. The state of food insecurity in the world, 2014. Strengthening the enabling environment for food security and nutrition. Rome. Available on: <http://www.fao.org/3/a-i4030e.pdf>.
- Garnsworthy PC. 2004. The environmental impact of fertility in dairy cows: a modelling approach to predict methane and ammonia emissions. *Anim Feed Sci Technol*, 112:211-223.
- Garnsworthy PC, Thomas PC. 2005. Yield trends in UK dairy and beef cattle. In: Sylvester-Bradley R, Wiseman J. *Yields of Farmed Species*. Cambridge: Nottingham University Press. pp. 435-462.
- Gerland P, Raftery AE, Ševčíková H, Li N, Gu D, Spoorenberg T, Alkema L, Fosdick BK, Chunn J, Lalic

- N, Bay G, Buettner T, Heilig GK, Wilmoth J. 2014. World population stabilization unlikely this century. *Science*, 346:234-237.
- Gibbs EPJ. 2014. The evolution of one health: a decade of progress and challenges for the future. *Vet Rec*, 174:85-91.
- González-Recio O, Miguel AT, Bach A. 2015. Past, present, and future of epigenetics applied to livestock breeding. *Front Genet*, 6:305-313.
- Haley CS, Lee GJ, Webb R, Knott SA. 1993. Evidence on the genetic control of LH release in response to GnRH from crosses between selected lines of sheep. *Livest Prod Sci*, 37:153-167.
- Hedenus F, Wirsén S, Johansson DJA. 2014. The importance of reduced meat and dairy consumption for meeting stringent climate change targets. *Climatic Change* 124:79-91.
- Herrero M, Henderson B, Havlík P, Thornton PK, Conant RT, Smith P, Wirsén S, Hristov AN, Gerber P, Gill M, Butterbach-Bahl K, Valin H, Garnett T, Stehfest E. 2016. Greenhouse gas mitigation potentials in the livestock sector. *Nat Climate Change*, 6:452-461.
- Hickey JM, Whitelaw BC, Gorjanc G. 2016. Promotion of alleles by genome editing in livestock breeding programmes. *J Anim Breed Genet*, 133:83-84.
- Hill WG. 2016. Is continued genetic improvement of livestock sustainable? *Genetics*, 202:877-881.
- Homer EM, Y. Gao Y, Meng X, Dodson A, Webb R, Garnsworthy PC. 2013. Technical note: a novel approach to the detection of estrus in dairy cows using ultra-wideband technology. *J Dairy Sci*, 96:6529-6534.
- Intergovernmental Panel on Climate Change. 2012. Managing the risks of extreme events and disasters to advance climate change adaptation. A Special Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Edited by CB Field, V Barros, TF Stocker, D Qin, DJ Dokken, KL Ebi, MD Mastrandrea, KJ Mach, G-K Plattner, SK Allen, M Tignor, PM Midgley. Cambridge, UK; Cambridge University Press. 582 pp.
- Intergovernmental Panel on Climate Change. 2013. Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Edited by TF Stocker, D Qin, G-K Plattner, M Tignor, SK Allen, J Boschung, A Nauels, Y Xia, V Bex, PM Midgley. Cambridge, UK: Cambridge University Press. pp 1-1535.
- Ireland JJ, Smith GW, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Folger JK, Ireland JL, Mossa F, Lonergan P, Evans AC. 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 Fertil Dev*, 23:1-14.
- Kearney J. 2010. Food consumption trends and drivers. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 365:2793-2807.
- Lamb GC, Dahlen CR, Larson JE, Marquezini G, Stevenson JS. 2010. Control of the estrous cycle to improve fertility for fixed-time artificial insemination in beef cattle: a review. *J Anim Sci*, 88:E181-E192.
- Mapletoft RJ, Bó GA. 2011. The evolution of improved and simplified superovulation protocols in cattle. *Reprod Fertil Dev*, 24:278-283.
- Meuwissen T, Ben Hayes B, Goddard M. 2016. Genomic selection: a paradigm shift in animal breeding. *Anim Frontiers*, 6:6-14.
- Morotti F, Barreiros TRR, Machado FZ, S.M. González SM, Marinho LSR, Seneda MM. 2015. Is the number of antral follicles an interesting selection criterion for fertility in cattle? *Anim Reprod*, 12:479-486.
- Murphy BD. 2012. Research in animal reproduction: Quo vadimus? *Anim Reprod*, 9:217-222.
- Randolph TF, Schelling E, Grace D, Nicholson CF, Leroy JL, Cole DC, Demment MW, Omere A, Zinsstag J, Ruel M. 2007. Invited review: role of livestock in human nutrition and health for poverty reduction in developing countries. *J Anim Sci*, 85:2788-2800.
- Ranganathan J, Vennard D, Waite R, Dumas P, Lipinski B, Searchinger T. 2016. GLOBAGRI-WRR Model Authors. Shifting diets for a sustainable future. Installment 11 of "Creating a Sustainable Future". World Resources Institute. 90 pp. Available from: <http://www.wri.org/publication/shifting-diets>.
- Rupp R, Mucha S, Larroque H, McEwan J, Conington J. 2016. Genomic application in sheep and goat breeding. *Anim Frontiers*, 6:39-44.
- Sartori R, Gimenes LU, Monteiro Jr PLJ, Melo LF, Baruselli PS, Bastos MR. 2016a. Metabolic and endocrine differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* females that impact the interaction of nutrition with reproduction. *Theriogenology*, 86:32-40.
- Sartori R, Prata AB, Monteiro Jr PLJ, Viana JHM, Vilela ER, Pereira MH, Vasconcelos JLM, Pontes G, Sanches BV, Figueiredo ACS, Baruselli PS. 2016b. Update and overview on assisted reproductive technologies (ARTs) in Brazil. *Anim Reprod*, 13:xxx-xx
- Sinclair KD, Webb R. 2005. Reproductive rate in farm animals: strategies to overcome biological constraints through the use of advanced reproductive technologies. In: Sylvester-Bradley R, Wiseman J. Yields of farmed species. Cambridge, UK: Nottingham University Press. pp. 51-88.
- 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 offspring determined by maternal periconceptional B vitamin and methionine status. *Proc Nat Acad Sci*, 104:19351-19356.
- Smith P, Bustamante M, Ahammad H, Clark H, Dong H, Elsiddig EA, Haberl H, Harper R, House J, Jafari M, Masera O, Mbaw C, Ravindranath NH, Rice CW, Robledo Abad C, Romanovskaya A, Sperling F, Tubiello F. 2014. Agriculture, Forestry and Other Land Use (AFOLU). In: Edenhofer O, Pichs-Madruga R, Sokona Y, Farahani E, Kadner S, Seyboth K, Adler A, Baum I, Brunner S, Eickemeier P, Kriemann B, Savolainen J, Schlömer S, von Stechow C, Zwickel T Minx JC. (Ed.). *Climate Change 2014: Mitigation of Climate Change*. Contribution of Working Group III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge,



UK: Cambridge University Press. Available on: [https://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar5/wg3/ipcc\\_wg3\\_ar5\\_chapter11.pdf](https://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar5/wg3/ipcc_wg3_ar5_chapter11.pdf).

**Springmann M, Mason-D'Croz D, Robinson S, Garnett T, Godfray HCJ, Gollin D, Rayner M, Ballon P, Scarborough P.** 2016. Global and regional health effects of future food production under climate change: a modelling study. *Lancet*, 387:1937-1946.

**Sylvester-Bradley R, Wiseman J.** 2005. *Yields of Farmed Species*. Cambridge, UK: Nottingham University Press. 1-651 pp.

**United Nations Framework Convention on Climate Change.** Conference of the Parties 21st Session, Paris 30 November to 11 December 2015. Adoption of the Paris Agreement. Available on: <http://unfccc.int/resource/docs/2015/cop21/eng/109r01.pdf>.

**Schader C, Muller A, El-Hage Scialabba N, Hecht J, Isensee A, Erb K-H, Smith P, Makkar HPS, Klocke P, Leiber F, Schwegler P, Stolze M, Niggli U.** 2016. Impacts of feeding less food-competing feedstuffs to livestock on global food system sustainability *J R Soc Interface*, 12:20150891. <http://dx.doi.org/10.1098/rsif.2015.0891>.

**UK strategy for agricultural technologies.** 2013. 52 pp. Available on: [www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/227259/9643-BIS-UK\\_Agri\\_Tech\\_Strategy\\_Accessible.pdf](http://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/227259/9643-BIS-UK_Agri_Tech_Strategy_Accessible.pdf).

**UK Government.** 2013. A UK Strategy for Agricultural Technologies. 56 pp. Available on: <https://www.gov.uk/government/publications/uk-agricultural-technologies-strategy>.

**Webb R, Stubbings L, Gregson K, Robinson JJ.** 2005. Yields of sheep: physiological and technological limitations. Pages 463-494. In: Sylvester-Bradley R, Wiseman J. *Yields of Farmed Species*. Cambridge, UK: Nottingham University Press.

**Wegener HC.** 2012. A15: Antibiotic resistance - linking human and animal health. National Academy Press. Available on: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK114485>.

**Wheeler T, von Braun J.** 2013. Climate change impacts on global food security. *Science*, 341:508-513.

**Wilkinson JM.** 2011. Re-defining efficiency of feed use by livestock. *Animal*, 5:1014-1022.

**World Health Organisation.** 2012. Micronutrient deficiencies. Available on: [www.who.int/nutrition/topics/ida/en](http://www.who.int/nutrition/topics/ida/en).

**World Health Organisation.** 2015. Obesity and overweight. Fact sheet Number 311. Available on: [www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en).

**World Hunger and Poverty Facts and Food Statistics.** 2015. Available on: [www.worldhunger.org/2015-world-hunger-and-poverty-facts-and-statistics/#micronutrients1](http://www.worldhunger.org/2015-world-hunger-and-poverty-facts-and-statistics/#micronutrients1).

**Zalasiewicz J, Waters CN, Williams M, Barnosky AD, Cearreta A, Crutzen P, Ellis E, Ellis MA, Fairchild IJ, Grinevald J, Leinfelder R, McNeill J, Poirier C, Richter D, Steffen W, Vidas D, Waple M, Wolfe AP, Zhisheng A.** 2015. When did the Anthropocene begin? A mid-twentieth century boundary level is stratigraphically optimal. *Quat Int*, 383:204-207.

## A importância da progesterona e de fatores derivados do conceito para a sobrevivência e desenvolvimento do conceito

P. Lonergan<sup>1\*</sup>, N. Forde<sup>2</sup>, T.E. Spencer<sup>3</sup>

<sup>1</sup>School of Agriculture and Food Science, Belfield, Dublin 4, Ireland

<sup>2</sup>Division of Reproduction and Early Development, Leeds Institute of Cardiovascular and Molecular Medicine, University of Leeds, Clarendon Way, Leeds, LS2 9JT, UK

<sup>3</sup>Division of Animal Sciences, University of Missouri, Columbia, Missouri 65211 USA

Título curto: progesterona e desenvolvimento do conceito.

\*Autor para correspondência: [pat.lonergan@ucd.ie](mailto:pat.lonergan@ucd.ie); Tel: +353 1 6012147

### Resumo

A progesterona (P4) proveniente do corpo lúteo (CL) é fundamental para o estabelecimento e manutenção da prenhez e desempenha um papel importante na regulação das secreções endometriais essenciais para estimular e mediar as mudanças no desenvolvimento e na diferenciação do conceito durante o início da prenhez em ruminantes. Numerosos estudos têm demonstrado uma associação entre a P4 elevada e a aceleração no alongamento do conceito. Uma combinação de experimentos *in vivo* e *in vitro* encontraram que os efeitos da P4 no alongamento do conceito são indiretos e mediados pelos efeitos induzidos pela P4 no endométrio. Apesar dos efeitos sobre o alongamento, os dados sobre o impacto da suplementação de P4 após a inseminação nas taxas de prenhez são conflitantes e normalmente só resultam em uma melhora modesta, se houver, na fertilidade. As diferenças no comprimento do conceito, no mesmo dia de gestação, sugerem que fatores intrínsecos aos blastocistos transferidos regulam o desenvolvimento, ao menos em parte, e seria consistente com a hipótese de que a qualidade do oócito regula a competência de desenvolvimento. Este artigo revisará o conhecimento recente do efeito da P4 no desenvolvimento do conceito em bovinos e resumirá as estratégias que foram desenvolvidas para manipular as concentrações de P4 após a fecundação para aumentar a fertilidade.

**Palavras-chave:** gado, prenhez, embrião, progesterona, conceito.

### Introdução

A maioria da perda embrionária em bovinos ocorre nas primeiras semanas depois da concepção. O sucesso da fecundação é tipicamente alto (~90%), mas uma proporção significativa dos embriões resultantes não consegue desenvolver a termo. A maioria desses embriões é perdida entre a fecundação e o reconhecimento materno da prenhez, que em bovinos ocorre ao redor do Dia 16 após o acasalamento (Diskin and Morris, 2008; Wiltbank et al., 2016). Wiltbank et al. (2016) descreveram quatro períodos cruciais para a perda da prenhez durante o primeiro trimestre de gestação e sugeriram possíveis causas para a perda gestacional durante esses períodos. Apesar de uma taxa de fecundação relativamente alta (>85%), 20%-50% das vacas de alta

produção leiteira experimentam a perda gestacional durante a primeira semana da gestação. Do Dia 8 ao 27, concomitante com o alongamento embrionário e o reconhecimento materno da prenhez, as perdas médias são de aproximadamente 30%. Do Dia 28 ao 60, as perdas são de aproximadamente 12%, enquanto que no quarto período, durante o terceiro mês de gestação, as perdas gestacionais são reduzidas (aproximadamente 2%), mas podem ser elevadas em algumas vacas, particularmente naquelas que carregam gêmeos no mesmo corno uterino (Wiltbank et al., 2016).

Um ótimo diálogo entre o embrião em desenvolvimento e sua mãe é essencial para o sucesso do reconhecimento gestacional e a manutenção da prenhez durante o período crítico de peri-implantação, quando o período é definido para a implantação e placentação que precede o desenvolvimento fetal (Guillomot, 1995; Hue et al., 2012; Spencer et al., 2015). Entretanto, este diálogo somente torna-se absolutamente essencial quando o momento do reconhecimento gestacional se aproxima como evidenciado pelo fato que os embriões são rotineiramente transferidos para um útero sincrônico até aproximadamente Dia 8 do desenvolvimento em transferência de embrião comercial bem sucedida. Com efeito, as prenhez foram atingidas após a transferência de embrião até mais tarde, como no Dia 16 (Betteridge et al., 1980), embora, devido à natureza filamentosa do embrião nesse momento, seja pouco prático fazer isso.

As células epiteliais uterinas secretam e/ou transportam uma variedade de moléculas, incluindo nutrientes, coletivamente chamados de histotrofo que são transportados dentro do sistema vascular fetal-placentário para suportar o crescimento e o desenvolvimento do conceito (embrião/feto e membranas associadas). Por sua vez, as moléculas secretadas pelo conceito, em particular o interferon tau (IFNT), que é o sinal para o reconhecimento materno da prenhez em ruminantes, mas também as prostaglandinas (PGs) (Dorniak et al., 2011; Dorniak et al., 2012; Spencer et al., 2013), induzem mudanças no endométrio uterino que são essenciais se a prenhez será mantida.

Há uma forte associação positiva entre o aumento nas concentrações de progesterona (P4) e o desenvolvimento embrionário em ovinos e bovinos (Satterfield et al., 2006; Carter et al., 2008). Muito tem se escrito sobre o papel da P4 no estabelecimento e na manutenção da prenhez. Muitos pesquisadores têm tentado manipular as concentrações de P4

durante as duas primeiras semanas após o acasalamento em uma tentativa de atingir taxas maiores de prenhez. Ao invés de repetir em detalhe o que já foi escrito, o leitor será direcionado para várias outras revisões recentes e compreensíveis sobre o assunto (Lonergan, 2011; Wiltbank et al., 2014; Lonergan, 2015; Spencer et al., 2015).

### **Estabelecimento da prenhez em gado**

Após a fecundação no oviduto, o embrião inicial sofre as primeiras divisões de clivagem mitóticas antes de entrar no útero, em que estará no estágio de aproximadamente 16 células, ao redor do Dia 4 após a ovulação. Em breve forma a mórula e, pelo Dia 7, um blastocisto contendo uma massa celular interna e uma única camada de trofotoderma ao redor da cavidade de blastocelo preenchida com líquido. Depois de romper e sair da zona pelúcida ao redor dos Dias 8 e 9, o blastocisto esférico cresce e muda sua morfologia da forma esférica para ovoide durante uma fase transitória que precede o alongamento do trofotoderma a uma forma filamentosa que geralmente começa entre os Dias 12 e 14. O conceito continua a crescer e secretar INFT, no qual previne a luteólise induzida pela prostaglandina e mantém a prenhez. Diferente dos embriões dos primatas e dos roedores, que invadem o endométrio logo após a eclosão, os conceitos de ruminantes não invadem o endométrio durante a implantação, que começa aproximadamente no Dia 19 em bovinos (Guillomot, 1995), mas em vez disso, sofrem um extenso período de desenvolvimento com flutuação livre, no qual eles exibem rápido alargamento dos tecidos extra-embriônicos.

Os estudos de fertilização *in vitro* demonstraram que o contato com o trato reprodutivo feminino não é necessário para que o embrião atinja o estágio de blastocisto eclodido. Entretanto, o alongamento característico do conceito antes da implantação é dependente das secreções do útero. Este alongamento não ocorre *in vitro* (Flechon et al., 1986) e não ocorre *vivo* na ausência das glândulas uterinas (Gray et al., 2002; Spencer and Gray, 2006). Vários autores têm tentado induzir o alongamento *in vitro* pelo crescimento de blastocistos em espaços confinados (Brandao et al., 2004; Alexopoulos et al., 2005; Zhao et al., 2015), mas à medida que a expansão lateral ocorre, os eventos da forma como ocorrem *in vivo* não são reproduzidos.

Portanto, a exposição ao ambiente uterino é necessária para o alongamento do conceito. O líquido luminal uterino (UFL) contém substâncias embriotróficas, coletivamente chamadas histotrofo, que norteiam o alongamento do conceito via efeitos na proliferação e migração do trofotoderma, bem como, adesão e ligação ao epitélio luminal (LE) endometrial (Gray et al., 2001; Spencer et al., 2008; Bazer et al., 2010; Forde et al., 2014a). O UFL é derivado principalmente de substâncias transportadas e/ou sintetizadas e secretadas do LE e epitélio glandular (GE), mas também são derivadas do conceito (Forde et al., 2015), e é uma mistura complexa e um tanto indefinida de proteínas, lipídeos, aminoácidos e açúcares (glicose, frutose), íons e exossomas/microvesículas (Bazer, 1975; Gray et al., 2001; Bazer et al., 2012; Burns et al., 2014; Forde et al., 2014b). A P4 induz a expressão de vários genes no epitélio endometrial que são então ainda mais estimulados por fatores do conceito (como IFNT e PGs) e pelo

próprio endométrio (Dorniak et al., 2013; Brooks et al., 2014; Lonergan and Forde, 2014). Por sua vez, os genes e funções reguladas por esses hormônios e fatores no epitélio endometrial causam mudanças específicas no histotrofo uterino que governam a sobrevivência e o alongamento do conceito (Faulkner et al., 2013; Forde et al., 2014a; Forde et al., 2015).

### **A progesterona e o endométrio**

Um pré-requisito para estabelecer a receptividade uterina à implantação em todas as espécies estudadas até agora é a perda da expressão dos receptores de P4 (PGR) do LE e do GE uterinos (Bazer et al., 2010). Paradoxalmente, é a exposição contínua do endométrio às concentrações de P4 circulantes que leva a essa retroalimentação negativa de PGR conforme a fase luteínica no ciclo estral progride. As concentrações de P4 na circulação causam a perda da expressão de PGR no endométrio de tal modo que, em animais que a P4 é alta, há uma perda precoce de PGR (Okumu et al., 2010), isto é, a receptividade uterina para a implantação é estabelecida mais cedo. Por outro lado, as concentrações de P4 baixas ou abaixo do ideal, atrasam a perda de PGR e então atrasam o estabelecimento da receptividade uterina à implantação (Forde et al., 2011a). Portanto, em termos simples, parece que elevada P4 imediatamente após o estro ou acasalamento simplesmente adianta as mudanças na expressão gênica endometrial que normalmente ocorrem (Forde et al., 2009).

O transcriptoma do endométrio bovino tem sido descrito sob uma variedade de condições experimentais e fisiológicas (Forde et al., 2009; Forde et al., 2011a; Forde et al., 2011b; Sandra et al., 2011; Bauersachs et al., 2012; Binelli et al., 2015). Mudanças temporais na expressão gênica do útero ocorrem independentemente da vaca estar prenhe ou não e, somente, no momento do reconhecimento materno-fetal, ao redor do Dia 16, que as maiores mudanças na expressão gênica entre o endométrio prenhe e o não-prenhe são detectadas (Forde et al., 2011b; Bauersachs et al., 2012). Forde et al. (2009) descreveram o transcriptoma global do endométrio do Dia 5 ao Dia 16 de vacas prenhes e cíclicas sob condições de P4 normal ou elevada e revelaram como as concentrações de P4 circulantes regulam os genes endometriais. Esse estudo demonstrou que a suplementação de P4 adianta as mudanças temporais normais na expressão gênica endometrial, particularmente para genes associados com fontes de energia ou contribuintes para o histotrofo, que podem contribuir para o desenvolvimento adiantado do conceito no Dia 13 e no Dia 16.

### **A progesterona e o alongamento do conceito**

O alongamento do conceito é essencial para o reconhecimento e implantação normal da prenhez. Mamo et al. (2011) descreveram o perfil de transcriptoma global do conceito bovino como cinco etapas principais do crescimento pré e peri-implantação (Dias 7, 10, 13, 16, e 19). As análises de genes reguladores diferencialmente expressos organizadas em nove agrupamentos de genes que formando uma dinâmica de transcritos sequenciais através dessas fases de

desenvolvimento. Esses dados foram ampliados por mais recentes estudos (Valour et al., 2014; Barnwell et al., 2015, 2016; Ribeiro et al., 2016a,b).

Flechon et al. (1986) cortaram em pedaços blastocistos ovinos do Dia 12 e os cultivaram *in vitro* por 24 h, para produzirem estruturas chamadas de vesículas trofoblásticas (TVs, blastocistos sem o disco embrionário). Essas TVs sobreviveram *in vitro* por até 10 dias, mas falharam em alongar. Em contraste, as TVs alongaram *in vivo* depois da transferência para receptoras demonstrando que o alongamento do trofoblasto não depende necessariamente da presença do embrião propriamente dito, mas pode ocorrer em TV composta somente de trofotoderma e o endoderma extraembrionário.

Estudos mais recentes em ovinos (Wilmut and Sales, 1981; Lawson and Cahill, 1983) e bovinos (Garrett et al., 1988b) sugerem que a P4 materna regula o desenvolvimento e o crescimento inicial do conceito. Mais estudos recentes têm confirmado esses achados e começaram a desvendar a biologia subjacente. Em particular, progresso significativo foi feito em esclarecer a função da P4 no sucesso do estabelecimento da prenhez em ovinos e bovinos, com particular ênfase e como a P4 afeta a expressão gênica endometrial e o alongamento do conceito.

O efeito estimulatório de P4 no alongamento do trofoblasto é inequívoco. Mas como mencionado anteriormente, no entanto, esse efeito é provavelmente o resultado de efeitos derivados das mudanças induzidas por P4 na expressão gênica de células do endométrio (Satterfield et al., 2006; Forde et al., 2009; Forde et al., 2011a) resultando em mudanças na composição do ULF ou histotrofo, aos quais o embrião em desenvolvimento é exposto (Faulkner et al., 2013). Para testar se qualquer um dos efeitos de P4 é diretamente sobre o embrião, tem-se realizado experimentos em que a P4 é diretamente adicionada ao meio durante o cultivo de embriões *in vitro*. Os resultados desses estudos têm sido variados e contraditórios, com alguns autores relatando efeitos positivos da P4 (Ferguson et al., 2005; Merlo et al., 2007; Ferguson et al., 2011) enquanto outros tem relatado não haver efeito (Reggio et al., 1997; Goff and Smith, 1998). De modo geral, no entanto, apesar da presença de RNAm para PGR nos embriões (Clemente et al., 2009), existe pouca evidência convincente de que a P4 tem um efeito direto no embrião inicial. Em nosso laboratório, o cultivo de embriões *in vitro* na presença de P4 não afetou a taxa de desenvolvimento ao estágio de blastocisto na presença ou ausência de células epiteliais de oviduto (Clemente et al., 2009). Esse achado é consistente com as observações de Larson et al. (2011) que falharam em observar um efeito direto da P4 do Dia 1 ao 3 ou do Dia 4 ao 7 depois da fecundação. Além do mais, a adição de P4 no meio de cultivo não tem efeito no alongamento do conceito depois da transferência para uma receptora sincronizada (Clemente et al., 2009). Em dois outros estudos *in vivo*, nós não conseguimos demonstrar um efeito da P4 elevada no desenvolvimento embrionário. No estudo de Carter et al. (2008), nenhuma diferença no desenvolvimento embrionário no Dia 5 ou Dia 7 foi observado quando as novilhas de corte foram suplementadas com P4 exógeno no Dia 3, apesar dos efeitos dramáticos sobre o alongamento após a eclosão entre os Dias 13 e 16 da prenhez. Dando

continuidade em outro estudo, múltiplos embriões produzidos *in vitro* foram transferidos para o oviduto de novilhas de corte que receberam ou não um implante de P4 no Dia 3 após o início do estro. Não houve efeito da P4 na proporção de embriões que desenvolveram ao estágio de blastocisto no Dia 7 (Carter et al., 2010).

Os efeitos da P4 elevada logo após a concepção no avanço do alongamento do conceito foram convincentemente demonstrados em bovinos e ovinos. Garrett et al. (1988b) administrou 100 mg P4 nos Dias 1, 2, 3 e 4 de prenhez com aumento das concentrações de P4 no plasma periférico do Dia 2 ao 5 e significativamente proporcionou conceitos maiores no Dia 14. Usando um implante de P4 no Dia 3 da prenhez, Carter et al. (2008) significativamente aumentou as concentrações de P4 plasmáticas até o Dia 8 e isto foi associado com conceitos maiores recuperados ao abate no Dia 16. Similarmente, quando ovelhas receberam injeções diárias de 25 mg P4 as 36 h pós-cobertura, o diâmetro do blastocisto aumentou em 220% no Dia 9 e o momento do início do alongamento do blastocisto ao conceito filamentosos foi adiantado, no Dia 12 (Satterfield et al., 2006); esses efeitos do tratamento da P4 no desenvolvimento do blastocisto foram bloqueados pela administração de RU486, um antagonista do PGR.

Como mencionado acima, usando uma combinação de produção de embriões *in vitro* e técnica de transferência de embriões *in vivo*, nós demonstramos que o efeito da P4 no desenvolvimento do conceito é mediado exclusivamente via endométrio (Clemente et al., 2009). Interessantemente, o embrião não necessita estar presente no útero durante o período da elevação de P4 para se beneficiar disso (Clemente et al., 2009), sugerindo fortemente que o efeito da P4 é via adiantamento das mudanças temporais normais que ocorrem no transcriptoma endometrial (Forde et al., 2009) resultando no alongamento do conceito. Em adição, a redução da liberação de P4 do CL, por exemplo, com o tratamento com prostaglandina F<sub>2α</sub> (Beltman et al., 2009b; Forde et al., 2011a; Forde et al., 2012) ou pela aspiração do conteúdo do folículo pré-ovulatório pouco antes do momento previsto para ovular (O'Hara et al., 2012) resulta em um atraso nas mudanças temporais no transcriptoma endometrial resultando em um atraso no alongamento do conceito *in vivo*.

Barnwell et al. (2015) examinaram o efeito da origem dos embriões (*in vitro* vs *in vivo* derivado) e a concentração de P4 no momento da transferência de embrião no desenvolvimento do conceito no Dia 17. Eles relataram que não há relação entre a concentração de P4 no Dia 7 (momento da transferência do embrião) e o comprimento do conceito no Dia 17. Estranhamente, quando somente conceitos maiores foram considerados, as novilhas com embriões produzidos *in vitro* tiveram menores concentrações de P4 que aquelas com embriões produzidos *in vivo*. Em contraste, Frade et al. (2014) relataram que maiores concentrações de P4 plasmáticas no momento da transferência de embrião foram associadas com aumento na taxa de prenhez em receptoras de embriões produzidos *in vitro*.

### Transferência de embrião assíncrona

O efeito regulador do útero no desenvolvimento do conceito bovino, e o papel desempenhado pela P4, têm sido belamente ilustrados em estudos comparando a consequência da transferência de embrião síncrona e assíncrona. Tal sincronia entre as necessidades do embrião em desenvolvimento e as secreções uterinas tem sido reconhecida como crítica para o sucesso no estabelecimento da prenhez (Pope, 1988). De fato, estudos de transferência de embrião em ovinos e bovinos demonstram claramente uma necessidade de estreita sincronia entre o embrião e o ambiente uterino da receptora. Estudos prévios estabeleceram que as taxas de prenhez são reduzidas quando os embriões tem 48 h à mais da sincronia com o ambiente uterino da receptora (Moore and Shelton, 1964; Rowson and Moor, 1966; Rowson et al., 1972).

A transferência assíncrona de blastocistos bovinos do Dia 7 para o útero da receptora do Dia 5 ou do Dia 9 resulta em conceitos no Dia 14 atrasados ( $5,4 \pm 0,4$  mm) ou avançados ( $50,4 \pm 5,2$  mm), respectivamente, comparados aos controles síncronos (Dia 7 ao Dia 7:  $15,7 \pm 1,5$  mm) ou conceitos derivados de inseminação artificial ( $12,0 \pm 3,3$  mm) (Ledgard et al., 2012). Consistente com essas observações, Geisert et al. (1991) relataram que somente 1 dos 21 (4,8%) blastocistos bovinos do Dia 8 transferidos para útero do Dia 5 estabeleceram prenhez, comparados aos 50% dos controles síncronos.

A administração de P4 no início do ciclo estral das receptoras tem sido eficaz para adiantar a receptividade uterina em alguns casos de transferência assíncrona com embriões mais velhos. Em ovelhas, as receptoras do Dia 6 após exposição precoce com P4 exógena suportaram o desenvolvimento de blastocistos do Dia 10 transferidos (Lawson and Cahill, 1983). Em vacas, a transferência de embrião para receptoras tratadas com P4 (100 mg/dia do Dia 1 ao Dia 4) que demonstraram estro 72 h depois das vacas doadoras (ou seja, blastocistos do Dia 8 transferidos para útero do Dia 5) resultaram em taxas de prenhez no Dia 35 similares àquelas transferências para receptoras síncronas ( $\pm 12$  h), 42,1 vs. 50%. Enquanto, como mencionado acima, somente ao redor de 5% das receptoras assíncronas do Dia 5 tornam-se prenhes (Geisert et al., 1991).

Dados similares foram descritos recentemente por Randi et al. (2015) que transferiram múltiplos blastocistos bovinos do Dia 7 para receptoras (n=10) síncronas (Dia 7) ou assíncronas (Dia 5 ou Dia 9). A transferência de blastocistos do Dia 7 para úteros do Dia 5 resultou em menor sobrevivência dos conceitos (20%) e atraso no alongamento daqueles que foram recuperados. Em contraste, a transferência para um ambiente uterino adiantado do Dia 9 resultou no mesmo nível de sobrevivência dos controles síncronos (~50%), mas o alongamento do conceito foi marcadamente adiantado, de acordo com as observações de Ledgard et al. (2012). A suplementação de receptoras do Dia 5 com P4 no Dia 3 aumentou as concentrações de P4 circulantes e aumentou o tamanho do conceito comparado aos controles do Dia 5; entretanto, a suplementação com P4 reduziu o comprimento dos ciclos estrais em aproximadamente 50% das novilhas.

Juntos, esses estudos indicam que a P4 estimula mudanças no ambiente uterino que regulam a receptividade e

promovem a sobrevivência do embrião e o alongamento do conceito. A manipulação de P4 pode ser um dos caminhos para estrategicamente regular as mudanças temporais que normalmente ocorrem no ambiente uterino para permitir flexibilidade no momento da transferência de embrião. Tendo em conta o exposto acima, os resultados indicam que a transferência para um útero adiantado (isto é, útero à frente do embrião), que tem sido exposto por mais tempo à P4, resulta em um alongamento adiantado do conceito e que o conceito adiantado produz mais IFNT (Kerbler et al., 1997; Rizos et al., 2012), sendo assim, seria razoável supor que a transferência para um útero adiantado resultaria em maiores taxas de prenhez. Contudo, a investigação em dados de operações de transferência de embriões comerciais não suporta esta hipótese (Wright, 1981; Donaldson, 1985; Hasler et al., 1987; Heyman, 1988; Hasler, 2001; Rodrigues et al., 2003; Randi et al., 2015). Por exemplo, no estudo de Randi et al. (2015), 4749 receptoras receberam um único blastocisto fresco produzido *in vitro* e a taxa global de prenhez foi de 43,5%, que é aproximadamente a taxa tida como normal em operações comerciais de FIV. A transferência de um blastocisto do Dia 7 para um útero síncrono do Dia 7 resulta em taxa de prenhez de 47,3%. A transferência para um útero de um dia a menos (Dia 6: 46,6%) não afeta a taxa de prenhez. Entretanto, a transferência para um útero do Dia 5 (40,8%) ou um do Dia 8 (41,3%) impacta moderadamente a taxa de prenhez, enquanto a transferência para um útero adiantado em dois dias (Dia 9: 24,4%) ou 3 dias atrasado (Day 4: 27,0%) dramaticamente reduziu as taxas de prenhez comparado aos resultados dos blastocistos transferidos de forma síncrona. Tomando os resultados de todos esses estudos juntos, está claro que a aceleração do alongamento do conceito associada com a transferência de um blastocisto a um útero adiantado não traduz necessariamente em um aumento na taxa de prenhez; ao invés disso, uma vez que a sincronia é excedida por 48 h, as taxas de prenhez declinam apreciavelmente.

### Suplementação de progesterona e taxa de prenhez

Os resultados de vários estudos retrospectivos indicam uma relação positiva entre as concentrações de P4 circulantes na semana depois da fecundação e a subsequente taxa de prenhez (Stronge et al., 2005; Diskin et al., 2006; Parr et al., 2012). Interessantemente, há um componente quadrático e um linear para essa relação; que é, muita P4 pode levar a um declínio na taxa de prenhez. Então, concentrações de P4 acima ou abaixo do ideal do Dia 4 ao 7 após a IA ou um aumento nas concentrações de P4 abaixo do ideal durante este intervalo são negativamente associados com a sobrevivência embrionária. Cummins et al. (2012) relataram que as concentrações de P4 foram 34% maiores em vacas com mérito genético similar para a característica de produção de leite, mas com extremos de mérito genético de bom (Fert+) e pobre (Fert-) para características de fertilidade. Em estudo subsequente, Moore et al. (2014) investigaram os fatores que afetam as concentrações circulantes de P4 naquelas vacas. As concentrações de P4 foram mensuradas do Dia 1 ao 13. O volume do CL foi 41% maior e as concentrações médias circulantes de P4 foram 79% maior em vacas Fert+ comparadas com as Fert-. Os resultados indicam que maiores

concentrações circulantes de P4 foram primeiramente devido à maior capacidade do CL em secretar P4 ao invés de diferenças na taxa de depuração de P4 nesse modelo genético de fertilidade de vacas lactantes.

Em última análise, as concentrações de P4 são determinadas pelo equilíbrio entre a taxa de produção de P4 pelo CL e a taxa metabólica de P4, principalmente pelo fígado. A produção de P4 é principalmente regulada pelo número de células luteínicas grandes (LLC) e pela produção constitutiva de P4 por essas células, que, por sua vez, é dependente do fornecimento de substrato colesterol suficiente, principalmente sob a forma de lipoproteína de alta densidade (HDL). O aumento no número de células da granulosa e, assim, do número de LLC, pela ovulação de múltiplos folículos, resulta em um aumento da liberação de P4 pelo CL. O HDL circulante pode ser manipulado pela dieta e isto tem sido utilizado como estratégia para aumentar P4 (Cordeiro et al., 2015). O metabolismo de P4 é primeiramente relacionado com a taxa de fluxo sanguíneo para o fígado (Sangsritavong et al., 2002) e é afetada pela condição fisiológica da vaca. Portanto, estratégias práticas que visam modificar a capacidade inerente o CL por meio da seleção genética (Cummins et al., 2012; Butler, 2013; Moore et al., 2014) ou a manipulação de concentrações de P4 serão mais produtivas, concentrando-se em aumentar do volume do tecido luteínico para aumentar a produção de P4 e/ou limitar o seu metabolismo (Wiltbank et al., 2014).

Em um estudo no qual as amostras de sangue foram colhidas de vacas inseminadas na quinta semana da prenhez presumida, 50% das vacas com P4 <2,8 ng/ml abortaram antes da nona semana de gestação e 95% das vacas com P4 de 6,0 ng/ml na quinta semana, mantiveram a gestação (Starbuck et al., 2004). Kenyon et al. (2013) determinaram a concentração de P4 do dia 4 ao 28 (relativo ao estro presumido) necessária para a manutenção da prenhez em vacas holandesas lactantes. Um aumento inicial do Dia 0 ao 14 foi associado com o estabelecimento da prenhez depois da transferência da embrião. As vacas com concentração de P4 <5 ng/mL no Dia 14 foram as mais propensas à perda gestacional do Dia 28 ao Dia 63. Aumentos mais rápidos na concentração de P4 durante o metaestro e início do diestro estão associados com o estabelecimento da prenhez depois da transferência de embrião, que sugere que o aumento inicial na concentração de P4 tem um efeito indireto no desenvolvimento embrionário através da modulação do ambiente uterino e da secreção de histotrofo. Além disso, os efeitos positivos do aumento inicial na concentração de P4 parecem ultrapassar a fase de reconhecimento materno da prenhez até estádios de adesão e placentação.

Dada a importância da P4 para o estabelecimento da prenhez e os efeitos conhecidos na receptividade uterina e desenvolvimento do conceito, muitos pesquisadores tentaram manipular a P4 usando uma variedade de estratégias nos dias imediatamente pós-concepção a fim de melhorar as taxas de concepção. Claramente, o aumento nas concentrações de P4 depois da ovulação estimula o alongamento do conceito em novilhas de corte, vacas de leite e ovelhas. Entretanto, a suplementação do gado com P4 durante o início da prenhez tem levado a resultados variados em termos de sobrevivência embrionária (Beltman et al., 2009a; Parr et al., 2014).

Baseado na demonstração que P4 elevada acelera o desenvolvimento do conceito e que conceitos maiores produzem mais IFNT, seria razoável hipotetizar que o conceito adiantado seria mais provável em estabelecer a prenhez. Entretanto, os dados do impacto da suplementação de P4 pós-inseminação na taxa de prenhez são conflitantes e, na melhor das hipóteses, indicam uma resposta positiva modesta. Por exemplo, em um estudo grande e recente, Nascimento et al. (2013) relataram que os resultados de duas análises separadas avaliaram o efeito do tratamento de hCG após a IA na fertilidade de vacas leiteiras. O primeiro estudo foi uma meta-análise de 10 diferentes estudos publicados que usaram o tratamento de hCG nos Dias 4 a 9 após a IA em vacas de leite lactando. No geral, a administração de hCG aumentou as prenhez por IA em três pontos percentuais [34% (752/2.213) vs. 37% (808/2.184)]. Em um ensaio de campo subsequente, as vacas holandesas em lactação (n = 2.979), de seis rebanhos comerciais de leite, receberam ou não hCG no dia 5 após a IATF. A taxa de prenhez por IA foi maior nas vacas tratadas com hCG (40,8%) que nas vacas controle (37,3%). Curiosamente, o efeito positivo do hCG (em geral cerca de 3,5%) foi restrito às vacas de primeira lactação.

Uma variedade de estratégias pode ser usada para aumentar a P4 periférica, que vão desde aqueles que estimulam a produção endógena como: (i) a manipulação do desenvolvimento folicular para aumentar o tamanho do folículo pré-ovulatório e, portanto, o CL (Baruselli et al., 2012; Mesquita et al., 2014; Ramos et al., 2015); (ii) estimulação direta do desenvolvimento do CL com agentes luteotróficos (Maillo et al., 2014); (iii) indução de CL acessório usando apropriadamente a administração no tempo certo de GnRH ou hCG (Santos et al., 2001; Stevenson et al., 2007; De Rensis et al., 2010; Lonergan, 2011; Torres et al., 2013); ou (iv) a suplementação direta com P4 exógena por meio de injeções (Garrett et al., 1988b; Geisert et al., 1991; Pugliesi et al., 2014) ou dispositivos contendo P4 (Stevenson et al., 2007; Carter et al., 2008; O'Hara et al., 2014b; O'Hara et al., 2014c).

Paradoxalmente, dependendo do momento da administração, a P4 exógena pode ter um efeito negativo na meia vida do CL resultando em períodos curtos entre os estros devido à regressão prematura do CL (Ginther, 1970; Garrett et al., 1988a; Burke et al., 1994) enquanto ao mesmo tempo o adianta o desenvolvimento do conceito devido às mudanças provocadas no endométrio (O'Hara et al., 2014a). Esta situação claramente não é compatível com o sucesso na manutenção da prenhez. É possível que a combinação da P4 exógena, para induzir o requerido estímulo do endométrio e conceito, e suporte luteotrófico, como o que é providenciado pelo hCG, para evitar a regressão precoce do CL, proporcionaria um meio de otimizar o reconhecimento materno da prenhez. Na verdade, a administração de hCG no momento das injeções de P4 nos Dias 1 ao 4 superou os efeitos negativos na vida útil do CL (Ginther, 1970). Em apoio a isso, em um recente estudo (O'Hara et al., 2014b), a administração de eCG, uma glicoproteína secretada pelos cálices endometriais de éguas prenhes com uma meia vida relativamente longa, de 2-3 dias, com propriedades semelhantes ao LH e ao FSH em bovinos, administrada em novilhas de corte no Dia 3 após o estro em associação com um implante intravaginal de P4, reduz o número de ciclos curtos e aumenta o peso médio do tecido

luteínico e P4 circulante. Entretanto, o número de novilhas testadas foi pequeno.

Nós demonstramos recentemente que uma única injeção i.m. de hCG logo no Dia 2 ou Dia 3 depois do estro resulta em um CL maior e aumenta as concentrações de P4 circulantes comparado ao controle (Maillo et al., 2014). Porém, os resultados de De Souza et al. (2015) examinando o efeito da administração de P4 injetável de longa duração (LAP4) e/ou hCG na função luteínica e na taxa de concepção de vacas de leite de alta produção (n=982) sugerem que isto não se traduz em aumento das taxas de prenhez. As vacas foram distribuídas em quatro grupos: (i) controle; (ii) 900mg LAP4; (iii) 2000 IU hCG; (iv) uma combinação de LAP4 e hCG. Enquanto os tratamentos resultaram em P4 elevada, taxa de concepção depois de 30 dias foi maior no grupo LAP, mas não nos grupos hCG ou LAP4 + hCG. As taxas de concepção aos 60 dias, bem como a perda gestacional entre 30 e 60 dias depois da IATF não foram afetadas pelo tratamento.

### Considerações finais

Uma consistente observação dos estudos com múltiplos embriões transferidos que nós realizamos, envolvendo a transferência de 10-20 blastocistos do Dia 7 para o útero de receptoras sincronizadas e, depois, recuperados no Dia 14, foi a variação no tamanho do conceito do Dia 14, mesmo entre aqueles recuperados do mesmo útero. Essas diferenças no comprimento do conceito no mesmo dia da gestação podem ser relacionadas com uma inerente perda da competência de desenvolvimento ou pode simplesmente ser consequência de uma assincronia com o ambiente materno. Isso sugere que fatores intrínsecos do blastocisto transferido regulam o desenvolvimento, ao menos em parte, e seria consistente com a hipótese que a qualidade do oócito regula a competência de desenvolvimento (Rizos et al., 2002).

Nossos estudos atuais estão buscando entender os fatores subjacentes que regulam o alongamento do conceito e tentar separar os fatores intrínsecos do conceito daqueles intrínsecos do útero. A este respeito, Barnwell et al. (2016) recentemente caracterizou padrões diferenciais de expressão gênica entre conceitos bovinos curtos e longos recuperados no Dia 15 da gestação que podem ser indicativos da sobrevivência do conceito.

### Agradecimentos

O trabalho dos autores aqui descrito recebeu suporte, ao menos em parte, por doações da Science Foundation Ireland (07/SRC/B1156, 10/IN.1/B3011 and 13/IA/1983) e AFRI doações concorrentes 2009-01722 e 2012-67015-30173 da USDA National Institute of Food and Agriculture e R01 HD072898 de Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development.

### Referências

**Alexopoulos NI, Vajta G, Maddox-Hyttel P, French AJ, Trounson AO.** 2005. Stereomicroscopic and histological examination of bovine embryos following extended in vitro culture. *Reprod Fertil Dev*, 17: 799-808.

**Barnwell CV, Farin PW, Whisnant CS, Alexander JE, Farin CE.** 2015. Maternal serum progesterone concentration and early conceptus development of bovine embryos produced in vivo or in vitro. *Domest Anim Endocrinol*, 52:75-81.

**Barnwell CV, Farin PW, Ashwell CM, Farmer WT, Galphin SP Jr, Farin CE.** 2016.

Differences in mRNA populations of short and long bovine conceptuses on Day 15 of gestation. *Mol Reprod Dev*, 83:424-441.

**Baruselli PS, Sa Filho MF, Ferreira RM, Sales JN, Gimenes LU, Vieira LM, Mendanha MF, Bo GA.** 2012. Manipulation of follicle development to ensure optimal oocyte quality and conception rates in cattle. *Reprod Domest Anim*, 47 (Suppl 4):134-141.

**Bauersachs S, Ulbrich SE, Reichenbach HD, Reichenbach M, Buttner M, Meyer HH, Spencer TE, Minten M, Sax G, Winter G, Wolf E.** 2012. Comparison of the effects of early pregnancy with human interferon, alpha 2 (IFNA2), on gene expression in bovine endometrium. *Biol Reprod*, 86:46.

**Bazer FW.** 1975. Uterine protein secretions: Relationship to development of the conceptus. *J Anim Sci*, 41:1376-1382

**Bazer FW, Song G, Kim J, Erikson DW, Johnson GA, Burghardt RC, Gao H, Satterfield MC, Spencer TE, Wu G.** 2012. Mechanistic mammalian target of rapamycin (MTOR) cell signaling: effects of select nutrients and secreted phosphoprotein 1 on development of mammalian conceptuses. *Mol Cell Endocrinol*, 354:22-33.

**Bazer FW, Wu G, Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC, Bayless K.** 2010. Novel pathways for implantation and establishment and maintenance of pregnancy in mammals. *Mol Hum Reprod*, 16:135-152.

**Beltman ME, Lonergan P, Diskin MG, Roche JF, Crowe MA.** 2009a. Effect of progesterone supplementation in the first week post conception on embryo survival in beef heifers. *Theriogenology*, 71:1173-1179.

**Beltman ME, Roche JF, Lonergan P, Forde N, Crowe MA.** 2009b. Evaluation of models to induce low progesterone during the early luteal phase in cattle. *Theriogenology*, 72:986-992.

**Betteridge KJ, Eaglesome MD, Randall GC, Mitchell D.** 1980. Collection, description and transfer of embryos from cattle 10--16 days after oestrus. *J Reprod Fertil*, 59:205-216.

**Binelli M, Scolari SC, Pugliesi G, Van Hoeck V, Gonella-Diaza AM, Andrade SC, Gasparin GR, Coutinho LL.** 2015. The transcriptome signature of the receptive bovine uterus determined at early gestation. *PLoS One*, 10:e0122874.

**Brandao DO, Maddox-Hyttel P, Lovendahl P, Rumpf R, Stringfellow D, Callesen H.** 2004. Post hatching development: a novel system for extended in vitro culture of bovine embryos. *Biol Reprod*, 71:2048-2055.

**Brooks K, Burns G, Spencer TE.** 2014. Conceptus elongation in ruminants: roles of progesterone, prostaglandin, interferon tau and cortisol. *J Anim Sci Biotechnol*, 5:53.

**Burke CR, Mihm M, Macmillan KL, Roche JF.** 1994. Some effects of prematurely elevated concentrations of

progesterone on luteal and follicular characteristics during the oestrous cycle in heifers. *Anim Reprod Sci*, 35:27-39.

**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:e90913.

**Butler ST.** 2013. Genetic control of reproduction in dairy cows. *Reprod Fertil Dev*, 26:1-11.

**Carter F, Forde N, Duffy P, Wade M, Fair T, Crowe MA, Evans AC, Kenny DA, Roche JF, Lonergan P.** 2008. Effect of increasing progesterone concentration from Day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. *Reprod Fertil Dev*, 20:368-375.

**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.

**Clemente M, de La Fuente J, Fair T, Al Naib A, Gutierrez-Adan A, Roche JF, Rizos D, Lonergan P.** 2009. Progesterone and conceptus elongation in cattle: a direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium? *Reproduction*, 138:507-517.

**Cordeiro MB, Peres MS, de Souza JM, Gaspar P, Barbieri F, Sa Filho MF, Filho MM, Dinardi RN, Nogueira GP, Mesquita FS, Pugliesi G, Martins T, Binelli M, Membrive CM.** 2015. Supplementation with sunflower seed increases circulating cholesterol concentrations and potentially impacts on the pregnancy rates in *Bos indicus* beef cattle. *Theriogenology* 83, 1461-1468.

**Cummins SB, Lonergan P, Evans AC, Butler ST.** 2012. Genetic merit for fertility traits in Holstein cows: II. Ovarian follicular and corpus luteum dynamics, reproductive hormones, and estrus behavior. *J Dairy Sci*, 95:3698-710.

**De Rensis F, Lopez-Gatius F, Garcia-Ispuerto I, Techakumpu M.** 2010. Clinical use of human chorionic gonadotropin in dairy cows: an update. *Theriogenology*, 73:1001-1008.

**de Souza EDF.** 2015. Effect of long-acting injectable progesterone in luteal function and conception rate of high producing Holstein cows submitted to timed artificial insemination. Masters Thesis, University of Sao Paulo, Brazil.

**Diskin MG, Morris DG.** 2008. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reprod Domest Anim*, 43(Suppl 2):260-267

**Diskin MG, Murphy JJ, Sreenan JM.** 2006. Embryo survival in dairy cows managed under pastoral conditions. *Anim Reprod Sci*, 96:297-311.

**Donaldson LE.** 1985. Matching of embryo stages and grades with recipient oestrous synchrony in bovine embryo transfer. *Vet Rec*, 117:489-91.

**Dorniak P, Bazer FW, Spencer TE.** 2011. Prostaglandins regulate conceptus elongation and mediate effects of interferon tau on the ovine uterine endometrium. *Biol Reprod*, 84:1119-1127.

**Dorniak P, Bazer FW, Spencer TE.** 2013. Physiology and Endocrinology Symposium: biological role of interferon tau in endometrial function and conceptus elongation. *J Anim Sci*, 91:1627-1638.

**Dorniak P, Bazer FW, Wu G, Spencer TE.** 2012. Conceptus-derived prostaglandins regulate endometrial function in sheep. *Biol Reprod*, 87:9, 1-7.

**Faulkner S, Elia G, O'Boyle P, Dunn M, Morris D.** 2013. Composition of the bovine uterine proteome is associated with stage of cycle and concentration of systemic progesterone. *Proteomics*, 13:3333-3353.

**Ferguson CE, Davidson TR, Mello MRB, Lima AS, Kesler DJ, Wheeler MB, Godke RA.** 2005. Evidence for a direct effect of P4 on IVF-derived bovine 8-cell embryos. *Reprod Fertil Dev*, 17:219.

**Ferguson CE, Kesler DJ, Godke RA.** 2011. Progesterone enhances in vitro development of bovine embryos. *Theriogenology*, 77:108-114.

**Flechon JE, Guillomot M, Charlier M, Flechon B, Martal J.** 1986. Experimental studies on the elongation of the ewe blastocyst. *Reprod Nutr Dev*, 26:1017-1024.

**Forde N, Bazer FW, Spencer TE, Lonergan P.** 2015. 'Conceptualizing' the Endometrium: Identification of Conceptus-Derived Proteins During Early Pregnancy in Cattle. *Biol Reprod* 92:156.

**Forde N, Beltman ME, Duffy GB, Duffy P, Mehta JP, O'Gaora P, Roche JF, Lonergan P, Crowe MA.** 2011a. Changes in the endometrial transcriptome during the bovine estrous cycle: effect of low circulating progesterone and consequences for conceptus elongation. *Biol Reprod*, 84:266-278.

**Forde N, Carter F, Fair T, Crowe MA, Evans AC, Spencer TE, Bazer FW, McBride R, Boland MP, O'Gaora P, Lonergan P, Roche JF.** 2009. Progesterone-regulated changes in endometrial gene expression contribute to advanced conceptus development in cattle. *Biol Reprod*, 81:784-794.

**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.** 2011b. Conceptus-induced changes in the endometrial transcriptome: how soon does the cow know she is pregnant? *Biol Reprod*, 85:144-156.

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

**Forde N, Mehta JP, Minten M, Crowe MA, Roche JF, Spencer TE, Lonergan P.** 2012. Effects of low progesterone on the endometrial transcriptome in cattle. *Biol Reprod*, 87:124.

**Forde N, Simintiras CA, Sturme R, Mamo S, Kelly AK, Spencer TE, Bazer FW, Lonergan P.** 2014b. Amino acids in the uterine luminal fluid reflects the temporal changes in transporter expression in the endometrium and conceptus during early pregnancy in cattle. *PLoS One*, 9:e100010.

**Frade MC, Frade C, Cordeiro MB, Sá Filho MF, Mesquita FS, Nogueira Gde P, Binelli M, Membrive CM.** 2014. Manifestation of estrous behavior and subsequent progesterone concentration at timed-embryo transfer in cattle are positively associated with pregnancy success of recipients. *Anim Reprod Sci*, 151:85-90.

**Garrett JE, Geisert RD, Zavy MT, Gries LK, Wettemann RP, Buchanan DS.** 1988a. Effect of exogenous



progesterone on prostaglandin F2 alpha release and the interestrus interval in the bovine. *Prostaglandins*, 36:85-96.

**Garrett JE, Geisert RD, Zavy MT, Morgan GL.** 1988b. Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. *J Reprod Fertil*, 84:437-446.

**Geisert RD, Fox TC, Morgan GL, Wells ME, Wettemann RP, Zavy MT.** 1991. Survival of bovine embryos transferred to progesterone-treated asynchronous recipients. *J Reprod Fertil*, 92:475-482.

**Ginther OJ.** 1970. Effect of progesterone on length of estrous cycle in cattle. *Am J Vet Res*, 31:493-496.

**Goff AK, Smith LC.** 1998. Effect of steroid treatment of endometrial cells on blastocyst development during co-culture. *Theriogenology* 49:1021-1030.

Gray CA, Bartol FF, Tarleton BJ, Wiley AA, Johnson GA, Bazer FW, Spencer TE. 2001. Developmental biology of uterine glands. *Biol Reprod*, 65:1311-1323.

**Gray CA, Burghardt RC, Johnson GA, Bazer FW, Spencer TE.** 2002. Evidence that absence of endometrial gland secretions in uterine gland knockout ewes compromises conceptus survival and elongation. *Reproduction*, 124:289-300.

**Guillemot M.** 1995. Cellular interactions during implantation in domestic ruminants. *J Reprod Fertil*, (Suppl) 49:39-51.

**Hasler JF.** 2001. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology*. 56:1401-1415.

**Hasler JF, Mccauley AD, Lathrop WF, Foote RH.** 1987. Effect of Donor-Embryo-Recipient Interactions on Pregnancy Rate in a Large-Scale Bovine Embryo Transfer Program. *Theriogenology*, 27:139-168.

**Heyman Y.** 1988. Moment de la transplantation et succes de la gestation chez les mammiferes. *Reprod Nutr Dev*, 28:1773-1780.

**Hue I, Degrelle SA, Turenne N.** 2012. Conceptus elongation in cattle: genes, models and questions. *Anim Reprod Sci*, 134:19-28.

**Kenyon AG, Mendonca LG, Lopes G, Jr, Lima JR, Santos JE, Chebel RC.** 2013. Minimal progesterone concentration required for embryo survival after embryo transfer in lactating Holstein cows. *Anim Reprod Sci*, 136:223-230.

**Kerbler TL, Buhr MM, Jordan LT, Leslie KE, Walton JS.** 1997. Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon-tau synthesis by the conceptus in cattle. *Theriogenology*, 47:703-714.

**Larson JE, Krisher RL, Lamb GC.** 2011. Effects of supplemental progesterone on the development, metabolism and blastocyst cell number of bovine embryos produced in vitro. *Reprod Fertil Dev*, 23:311-318.

**Lawson RA, Cahill LP.** 1983. Modification of the embryo-maternal relationship in ewes by progesterone treatment early in the oestrous cycle. *J Reprod Fertil*, 67:473-475.

**Ledgard AM, Berg MC, McMillan WH, Smolenski G, Peterson AJ.** 2012. Effect of asynchronous transfer on bovine embryonic development and relationship with early

cycle uterine proteome profiles. *Reprod Fertil Dev*, 24:962-972.

**Lonergan P.** 2011. Influence of progesterone on oocyte quality and embryo development in cows. *Theriogenology*, 76:1594-1601.

**Lonergan, P.** 2015. New insights into the function of progesterone in early pregnancy. *Animal Frontiers*, 5: 12-17.

**Lonergan P, Forde N.** 2014. Maternal-embryo interaction leading up to the initiation of implantation in cattle. *Animal*, 8 (Suppl 1):64-69.

**Maillo V, Duffy P, O'Hara L, de Frutos C, Kelly AK, Lonergan P, Rizos D.** 2014. Effect of hCG administration during corpus luteum establishment on subsequent corpus luteum development and circulating progesterone concentrations in beef heifers. *Reprod Fertil Dev*, 26:367-374.

**Mamo S, Mehta JP, McGettigan P, Fair T, Spencer TE, Bazer FW, Lonergan P.** 2011. RNA sequencing reveals gene clusters in bovine conceptuses associated with maternal recognition of pregnancy and implantation. *Biol Reprod*, 85:1143-1151.

**Merlo B, Iacono E, Mari G.** 2007. Effect of progesterone and epidermal growth factor on in vitro-produced eight-cell bovine embryos in a serum-free culture medium. *Reprod Fertil Dev*, 19:211.

**Mesquita FS, Pugliesi G, Scolari SC, França MR, Ramos RS, Oliveira M, Papa PC, Bressan FF, Meirelles FV, Silva LA, Nogueira GP, Membrive CM, Binelli M.** 2014. Manipulation of the periovulatory sex steroidal milieu affects endometrial but not luteal gene expression in early diestrus Nelore cows. *Theriogenology*, 81:861-869.

**Moore NW, Shelton JN.** 1964. Egg transfer in sheep. Effect of degree of synchronization between donor and recipient, age of egg, and site of transfer on the survival of transferred eggs. *J Reprod Fertil*, 7:145-152.

**Moore, SG, Scully S, Browne JA, Fair T, Butler ST.** 2014. Genetic merit for fertility traits in Holstein cows: V. Factors affecting circulating progesterone concentrations. *J Dairy Sci*, 97:5543-5557.

**Nascimento AB, Bender RW, Souza AH, Ayres H, Araujo RR, Guenther JN, Sartori R, Wiltbank MC.** 2013. Effect of treatment with human chorionic gonadotropin on day 5 after timed artificial insemination on fertility of lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, 96:2873-2882

**O'Hara L, Forde N, Carter F, Rizos D, Maillo V, Ealy AD, Kelly AK, Rodriguez P, Isaka N, Evans AC, Lonergan P.** 2014a. Paradoxical effect of supplementary progesterone between Day 3 and Day 7 on corpus luteum function and conceptus development in cattle. *Reprod Fertil Dev*, 26:328-336.

**O'Hara L, Forde N, Duffy P, Randi F, Kelly AK, Valenza A, Rodriguez P, Lonergan P.** 2014b. Effect of combined exogenous progesterone with luteotrophic support via equine chorionic gonadotrophin (eCG) on corpus luteum development, circulating progesterone concentrations and embryo development in cattle. *Reprod Fertil Dev*, 28:269-277.

**O'Hara L, Forde N, Kelly AK, Lonergan P.** 2014c. Effect of bovine blastocyst size at embryo transfer on day 7 on conceptus length on day 14: can supplementary progesterone rescue small embryos? *Theriogenology*, 81:1123-1128.

- O'Hara L, Scully S, Maillou V, Kelly AK, Duffy P, Carter F, Forde N, Rizos D, Lonergan P.** 2012. Effect of follicular aspiration just before ovulation on corpus luteum characteristics, circulating progesterone concentrations and uterine receptivity in single-ovulating and superstimulated heifers. *Reproduction*, 143:673-682.
- Okumu LA, Forde N, Fahey AG, Fitzpatrick E, Roche JF, Crowe MA, Lonergan P.** 2010. The effect of elevated progesterone and pregnancy status on mRNA expression and localisation of progesterone and oestrogen receptors in the bovine uterus. *Reproduction*, 140:143-153.
- Parr MH, Crowe MA, Lonergan P, Evans AC, Rizos D, Diskin MG.** 2014. Effect of exogenous progesterone supplementation in the early luteal phase post-insemination on pregnancy per artificial insemination in Holstein-Friesian cows. *Anim Reprod Sci*, 150:7-14.
- Parr MH, Mullen MP, Crowe MA, Roche JF, Lonergan P, Evans ACO, Diskin MG.** 2012. Relationship between pregnancy per artificial insemination and early luteal concentrations of progesterone and establishment of repeatability estimates for these traits in Holstein-Friesian heifers. *J Dairy Sci*, 95:2390-2396.
- Pope WF.** 1988. Uterine asynchrony: a cause of embryonic loss. *Biol Reprod*, 39:999-1003.
- Pugliesi G, Oliveria ML, Scolari SC, Lopes E, Pinaffi FV, Miagawa BT, Paiva YN, Maio JR, Nogueira GP, Binelli M.** 2014. Corpus luteum development and function after supplementation of long-acting progesterone during the early luteal phase in beef cattle. *Reprod Domest Anim*, 49: 85-91.
- Ramos RS, Oliveira ML, Izaguirry AP, Vargas LM, Soares MB, Mesquita FS, Santos FW, Binelli M.** 2015. The periovulatory endocrine milieu affects the uterine redox environment in beef cows. *Reprod Biol Endocrinol*, 13:39.
- Randi F, Fernandez-Fuertes B, McDonald M, Forde N, Kelly AK, Amorin HB, Lima EM, Morotti F, Seneda MM, Lonergan P.** 2015. Asynchronous embryo transfer as a tool to understand embryo uterine interaction in cattle: Is a large conceptus a good thing? *Reprod Fertil Dev*, in press, doi: 10.1071/RD15195
- Reggio BC, Lynn JW, Godke RA.** 1997. The effect of progesterone on the development of IVF-derived bovine embryos cultured in a semi-defined culture medium. *Theriogenology*, 47:284.
- Ribeiro ES, Monteiro AP, Bisinotto RS, Lima FS, Greco LF, Ealy AD, Thatcher WW, Santos JE.** 2016a. Conceptus development and transcriptome at preimplantation stages in lactating dairy cows of distinct genetic groups and estrous cyclic statuses. *J Dairy Sci*, 99:4761-4777.
- Ribeiro ES, Greco LF, Bisinotto RS, Lima FS, Thatcher WW, Santos JE.** 2016b. Biology of preimplantation conceptus at the onset of elongation in dairy cows. *Biol Reprod*, 94:97.
- Rizos D, Scully S, Kelly AK, Ealy AD, Moros R, Duffy P, Al Naib A, Forde N, Lonergan P.** 2012. Effects of human chorionic gonadotrophin administration on day 5 after oestrus on corpus luteum characteristics, circulating progesterone and conceptus elongation in cattle. *Reprod Fertil Dev*, 24:472-481.
- Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P.** 2002. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev*, 61:234-248.
- Rodrigues CA, Mancilha RF, Dalalio M, Reis EL, Nichi M, Madureira EH, Baruselli PS.** 2003. Aumento da taxa de concepção em receptoras de embriões FIV tratadas com GnRH no momento da inovulação. *Reuniao Anual Da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões*, Fortaleza 2003, *Acta Scientiae Veterinariae*, 550-551.
- Rowson LE, Lawson RA, Moor RM, Baker AA.** 1972. Egg transfer in the cow: synchronization requirements. *J Reprod Fertil*, 28:427-431.
- Rowson LE, Moor RM.** 1966. Embryo transfer in the sheep: the significance of synchronizing oestrus in the donor and recipient animal. *J Reprod Fertil*, 11:207-212.
- Sandra O, Mansouri-Attia N, Lea RG.** 2011. Novel aspects of endometrial function: a biological sensor of embryo quality and driver of pregnancy success. *Reprod Fertil Dev*, 24:68-79.
- Sangsitavong S, Combs DK, Sartori R, Armentano LE, Wiltbank MC.** 2002. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17beta in dairy cattle. *J Dairy Sci*, 85:2831-2842.
- Santos JE, Thatcher WW, Pool L, Overton MW.** 2001. Effect of human chorionic gonadotropin on luteal function and reproductive performance of high-producing lactating Holstein dairy cows. *J Anim Sci*, 79:2881-2894.
- Satterfield MC, Bazer FW, Spencer TE.** 2006. Progesterone regulation of preimplantation conceptus growth and galectin 15 (LGALS15) in the ovine uterus. *Biol Reprod*, 75:289-296.
- Spencer TE, Forde N, Dorniak P, Hansen TR, Romero JJ, Lonergan P.** 2013. Conceptus-derived prostaglandins regulate gene expression in the endometrium prior to pregnancy recognition in ruminants. *Reproduction*, 146:377-387.
- Spencer TE, Forde N, Lonergan P.** 2015. The role of progesterone and conceptus-derived factors in uterine biology during early pregnancy in ruminants. *J Dairy Sci*, 99:5941-5950.
- Spencer TE, Gray CA.** 2006. Sheep uterine gland knockout (UGKO) model. *Methods Mol Med*, 121:85-94.
- Spencer TE, Sandra O, Wolf E.** 2008. Genes involved in conceptus-endometrial interactions in ruminants: insights from reductionism and thoughts on holistic approaches. *Reproduction*, 135:165-179.
- Starbuck MJ, Dailey R, Inskeep EK.** 2004. Factors affecting retention of early pregnancy in dairy cattle. *Anim Reprod Sci*, 84:27-39.
- Stevenson JS, Portaluppi MA, Tenhouse DE, Lloyd A, Eborn DR, Kacuba S, DeJarnette JM.** 2007. Interventions after artificial insemination: conception rates, pregnancy survival, and ovarian responses to gonadotropin-releasing hormone, human chorionic gonadotropin, and progesterone. *J Dairy Sci*, 90:331-340.
- Stronge AJ, Sreenan JM, Diskin MG, Mee JF, Kenny DA, Morris DG.** 2005. Post-insemination milk

progesterone concentration and embryo survival in dairy cows. *Theriogenology*, 64:1212-1224.

**Torres A, Chagas e Silva J, Deloche MC, Humblot P, Horta AE, Lopes-da-Costa L.** 2013. Secondary corpora lutea induced by HCG treatment enhanced demi-embryo survival in lactating high-yielding dairy cows. *Reprod Domest Anim*, 48:643-650.

**Valour D, Degrelle SA, Ponter AA, Giraud-Delville C, Champion E, Guyader-Joly C, Richard C, Constant F, Humblot P, Ponsart C, Hue I, Grimard B.** 2014. Energy and lipid metabolism gene expression of D18 embryos in dairy cows is related to dam physiological status. *Physiol Genomics*, 46:39-56.

**Wilmot I, Sales DI.** 1981. Effect of an asynchronous environment on embryonic development in sheep. *J Reprod Fertil* 61:179-184.

**Wiltbank MC, Souza AH, Carvalho PD, Cunha AP, Giordano JO, Fricke PM, Baez GM, Diskin MG.**

2014. Physiological and practical effects of progesterone on reproduction in dairy cattle. *Animal*, 8(Suppl 1):70-81.

**Wiltbank MC, Baez GM, Garcia-Guerra A, Toledo MZ, Monteiro PL, Melo LF, Ochoa JC, Santos JE, Sartori R.** 2016. Pivotal periods for pregnancy loss during the first trimester of gestation in lactating dairy cows. *Theriogenology*, 86:239-253.

**Wright JM.** 1981. Non-surgical embryo transfer in cattle embryo-recipient interactions. *Theriogenology*, 15:43-56.

**Zhao S, Liu ZX, Gao H, Wu Y, Fang Y, Wu SS, Li MJ, Bai JH, Liu Y, Evans A, Zeng SM.** 2015. A three-dimensional culture system using alginate hydrogel prolongs hatched cattle embryo development in vitro. *Theriogenology*, 84:184-92.

## Estratégias para evitar afogamento na inundação de dados do sequenciamento de profundidade

S. Bauersachs\*

ETH Zúrique, Fisiologia Animal, Instituto de Ciências Agrárias, Zúrique, Suíça  
Tannenstrasse 1/TAN D 5.2  
8092 Zúrique, Suíça

Título curto: Estratégias para a análise de dados NGS

\*Autor para correspondência: [stefan.bauersachs@usys.ethz.ch](mailto:stefan.bauersachs@usys.ethz.ch); Telefone +41 44 632 26 31

### Resumo

O enorme progresso tecnológico no campo da genômica funcional durante os últimos 15 anos teve um impacto significativo na ciência animal. Com o desenvolvimento do sequenciamento de nova geração, tornou-se viável analisar genomas e transcriptomas em prazos curtos e custos acessíveis. Um grande desafio desse rápido desenvolvimento é gerenciar o dilúvio de dados e executar a análise de dados e integração de forma ideal. Esta revisão fornece algumas informações sobre um pipeline de análise típica para dados de sequenciamento de RNA (RNA-Seq) e uma estratégia para a análise de dados de pequenos RNA-Seq derivados de espécies com pobre anotação de genes de RNA não-codificante. Além disso, são discutidos problemas relacionados com anotação de genes de espécies animais e suas possíveis implicações para a análise e interpretação de dados. Apesar dos problemas ainda não resolvidos e desafios no que diz respeito à análise de dados e a integração das abordagens no campo da análise do genoma funcional, abriram-se novos caminhos para tentar compreender a complexa característica da fertilidade.

**Palavras-chave:** Sequenciamento profundo, ferramentas de bioinformática, projeto Galaxy, biologia da reprodução, criação de animais.

### O impacto da genômica funcional sobre a pesquisa da ciência da vida

Os enormes avanços tecnológicos no campo da genômica funcional durante as últimas décadas tiveram um forte impacto sobre a pesquisa em ciência animal. Isto se reflete, por exemplo, no aumento dramático do número de publicações com respectivas palavras-chave (Figura 1). A primeira onda começou com a ampla aplicação de microarranjos de DNA no final dos anos noventa, e um aumento similar observado em estudos utilizando sequenciamento de RNA (RNA-Seq). No que diz respeito aos animais, o aumento no número de publicações com estudos do transcriptoma mostrou uma mudança de dois a três anos. O desenvolvimento do Sequenciamento de Nova Geração (NGS) facilitou a análise dos genomas e transcriptomas em um tempo extremamente curto e de custos acessíveis (Goodwin et al., 2016). Com os novos instrumentos para a geração dos chamados "leitura curta"

(até 2x150 pb, IlluminaHiSeq 4000), é atualmente possível obter até 1,5 bases de Tera correspondentes a 5 bilhões de leituras por corrida ou 12 genomas ou 100 transcriptomes ou 180 exomas por instrumento de corrida que leva 3,5 dias. Além disso, os sequenciadores de Terceira Geração entregam a leitura extremamente longa e podem ser usados para sequenciar moléculas inteiras de RNA (mensageiro, bem como RNAs não-codificantes longos) ou sequências genômicas repetitivas para preencher as lacunas das versões atuais das montagens da sequência do genoma (Goodwin et al., 2016). Mas também no campo da análise proteômica, as técnicas têm avançado particularmente nos métodos de espectrometria de massa. A melhoria foi alcançada principalmente no que diz respeito à sensibilidade e quantificação (Zhang et al., 2014a; Zhang et al., 2014b). Além disso, as técnicas de NGS foram refinadas para analisar quantidades muito pequenas de RNA ou DNA. Considerando que nos protocolos iniciais para a preparação da biblioteca de RNA-Seq são necessários materiais (RNA total) em microgramas, a partir de modernos protocolos padrão de 100 ng de RNA total. Protocolos especiais foram desenvolvidos para executar o RNA-Seq mesmo que com poucas ou únicas células, tais como oócitos e embriões, mas também com partes de células neuronais (Liu et al., 2014; Hrdlickova et al., 2016; Marr et al., 2016).

Com este rápido desenvolvimento, particularmente para NGS, um grande desafio surgiu com relação à análise, interpretação e integração dos dados (Rajasundaram e Selbig, 2016; Sun e Hu, 2016; Suravajhala et al., 2016). Mais e mais conjuntos de dados são gerados para a análise da expressão do gene ao nível de RNA e proteínas, bem como para a identificação do genoma de variantes de sequência, correlacionando-se com características de fertilidade (Bauersachs, 2014; Bauersachs e Wolf, 2015). A combinação de dados de estudos de associação ampla do genoma (GWAS) ou locus de característica quantitativa (QTL) e estudos com os dados correspondentes obtidos a partir de análises de expressão de genes tem um grande potencial para melhorar a compreensão da característica de fertilidade com relação aos efeitos das variações de sequência em regulação da expressão gênica. Certo número de tentativas para integrar estes dados tem sido realizado para animais (Pimentel et al., 2011; Minten et al., 2013; Moore et al., 2016).

Além da clássica produção de mRNA do gene e de moléculas de proteína do RNA não-codificante, também são

investigadas se apresentam um papel na regulação da expressão gênica (Bidarimath et al., 2014; Kotaja, 2014). Particularmente, microRNAs (miARNs), curtos RNAs regulatórios não-codificantes, desempenham um papel importante na regulação da expressão do gene, principalmente ao nível de repressão da tradução de mRNAs

alvo específicos, bem como a degradação de mRNA (Krol et al., 2010). A expressão de miARN no endométrio e no embrião/conceito já foi investigada em vários estudos (Ponsuksili et al., 2014; Krawczynski et al., 2015a; Krawczynski et al., 2015b).

Figure 1

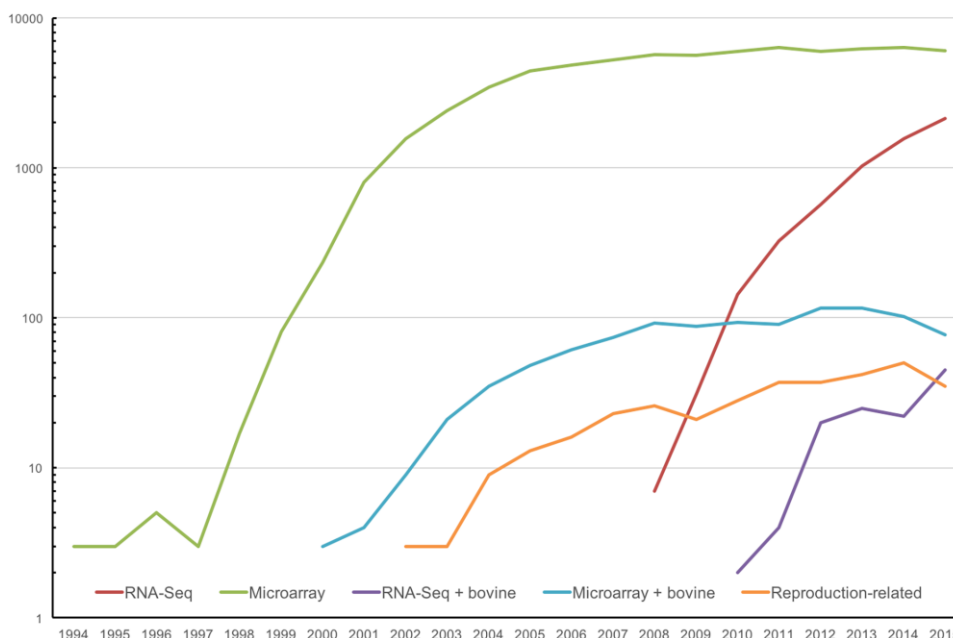


Figura 1: Busca no Pubmed de resumos contendo palavras-chave relacionadas a análises de transcriptoma. RNA-Seq: palavra-chave "RNA-Seq"; Microarray: palavra-chave "microarray"; Microarray + bovino: palavras-chave "microarray", "bovinos", "Bos taurus", "gado"; RNA-Seq + bovino: palavras-chave "RNA-Seq", "bovinos", "Bos taurus", "gado"; relacionados com a reprodução: usando uma combinação de palavras-chave para análise de transcriptoma, espécies animais e órgãos reprodutivos.

Por várias razões, tais como pipelines de análise de dados não bem padronizada, montagens incompletas de sequências do genoma de espécies animais, anotação incompleta da análise do gene e a comparabilidade dos diferentes conjuntos de dados são complicadas. Isto é ainda mais complicado se os dados omics foram gerados em diferentes laboratórios usando várias plataformas tecnológicas (Bauersachs, 2014). Para resolver estes problemas, será uma das principais tarefas futuras da pesquisa se a comunidade científica se interessar na exploração potencial dos estudos genômico sem um progresso real no campo, isto é, a compreensão da fertilidade como uma característica complexa.

#### Pipeline de análise de dados típicos e análise estatística

Um pipeline de análise de dados típicos para dados de RNA-Seq envolve vários passos a partir da sequência obtida da leitura (arquivos Fastq). Normalmente, as sequências de leituras são primeiramente aparadas com base em índices de qualidade (por exemplo, com Trimmomatic), isto é, bases com baixa qualidade nas extremidades (encontrado principalmente na extremidade 3') são

removidas. Uma vez que as bibliotecas de RNA-Seq contêm muitas vezes certa porcentagem nas inserções de cDNA mais curtos do que o comprimento de leitura, algumas leituras correm para a sequência adaptadora, que tem de ser removida usando uma respectiva ferramenta. Para obter informações de qualidade dos dados da sequência, os arquivos Fastq são verificados antes e depois das etapas de processamento (por exemplo, FastQC) para garantir que todos os arquivos tenham uma qualidade comparável e que identifiquem possíveis artefatos de sequenciamento. Após estas etapas de processamento de dados, nas leituras são geralmente mapeados um genoma de referência ou um transcriptoma. O primeiro é normalmente realizado pelo uso de um mapeador lido longitudinalmente, por exemplo, Tophat2 (Kim et al., 2013) ou HISAT (Kim et al., 2015). Depois de atribuir a sequência de leituras para um local específico no genoma, as leituras são contadas para cada Éxon, transcrição ou de cada gene. Isto pode ser realizado com base no gene da anotação disponível a partir do NCBI ou Ensembl. Em alternativa, os dados em si podem ser usados para complementar a anotação do gene existente usando ferramentas como Cufflinks ou StringTie (Trapnell et al., 2012; Pertea et al., 2015). Nos primeiros anos da análise de dados do RNA-Seq, as maiorias das ferramentas estavam disponíveis apenas no modo de linha de comando

de execução em sistemas Linux. Com a integração na plataforma Galaxy, uma ferramenta de análise do genoma baseado em navegador web (Blankenberg et al., 2010), complexas análises em larga escala podem ser realizadas sem o uso da informática ou de conhecimentos de programação (Giardine et al., 2005). Finalmente, estes passos resultam numa tabela de contagem de leitura que é usada para a análise da expressão gênica diferencial. Ferramentas amplamente utilizadas para a análise de dados da leitura e identificação de genes diferencialmente expressos (DEG) são o BioConductor R pacotes EdgeR (Robinson et al., 2010) e DESeq2 (Love et al., 2014). Uma vez que a instalação local do Galaxy em um servidor Linux é necessária para análise dos conjuntos de dados maiores, como os dados de RNA-Seq, uma forma alternativa é fazer a análise completa dos dados do RNA-Seq pelo uso de R e BioConductor em um computador desktop (Anders et al., 2013).

### **Análise de pequenos conjuntos de dados de RNA-Seq com adaptação especial às espécies pobremente (insuficiente) anotadas**

Para a análise dos conjuntos de dados de pequenos RNA-Seq uma análise modificada de pipeline é necessária, comparada a pipeline de análise básica dos dados do RNA-Seq, representando o resultado da leitura, pelo menos em teoria, toda a sequência de um pequeno ncRNA. As etapas de processamento típicas dos arquivos FastQ começando com o controle de qualidade até o encaixe do adaptador são semelhantes. No entanto, o uso de mapeadores de junções como TopHat2 (Kim et al., 2013) ou HISAT (Kim et al.,

2015) para a análise dos conjuntos de dados do pequeno RNA-seq não é adequado porque pequenos RNAs geralmente não emendam, nem são encontrados em regiões anotadas de genes codificantes. Isto conduz à necessidade de uma estratégia diferente de anotação do mapeamento e sequência. Por exemplo, o mapeamento do genoma de referência usando a ferramenta de Alinhamento Burrows-Wheeler (BWA) (Li e Durbin, 2009) para o mapa de encontro a um genoma de referência ou NCBI BLAST (Altschul et al., 1997) para sequências curtas, que também está disponível no Galaxy (Blankenberg et al., 2010) são opções adequadas. O alinhador BWA funciona melhor para genomas bem anotados onde são conhecidos ncRNAs quase todos curtos. Assim, as sequências obtidas são apenas mapeadas para os genes correspondentes e sequências de miRNA (canônicos e isomiRs) podem ser facilmente analisadas, com ferramentas como miRDeep2 (Friedlander et al., 2012).

Uma vez que o algoritmo BLAST é lento para a análise de elevado número de comparações de sequências, o número de sequências únicas encontradas em pequenas bibliotecas de RNA-Seq tem que ser apropriadamente filtrada, por exemplo, com base em contagens por milhão (CPM) de limite de corte, para reduzir o número de sequências de centenas de milhares ou mesmo milhões para vários mil. Esta filtragem remove as mesmas sequências de tempo sem relevância ou sequências biológicas que são muito provável que seja o resultado de artefatos do sequenciamento. Um exemplo desta estratégia de análise de dados é mostrado na Figura 2.

Figure 2

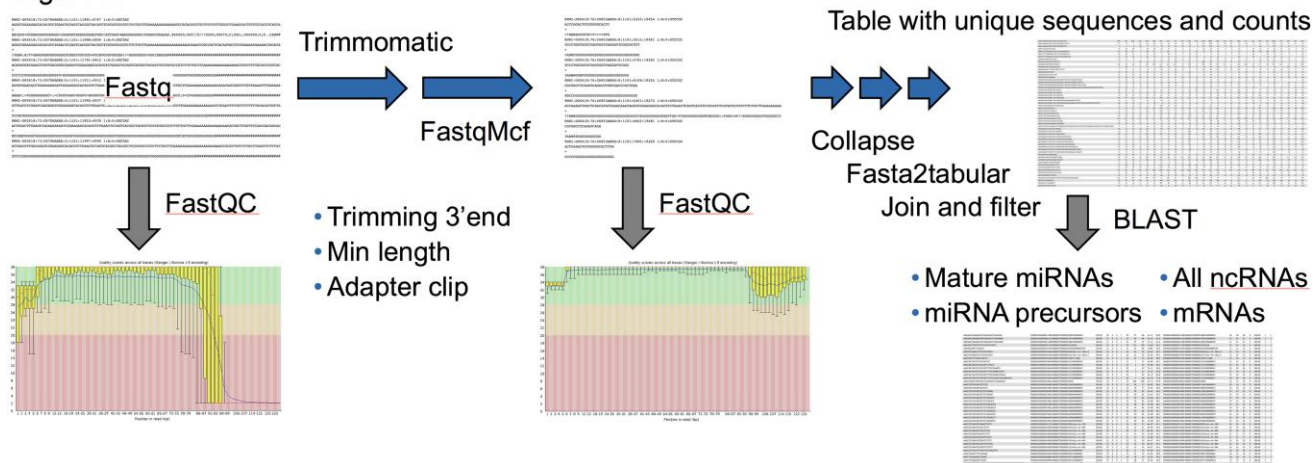


Figura 2: fluxo de trabalho para a análise de dados pequenos de RNA-Seq realizados através da utilização de ferramentas galáxias. O fluxo de trabalho passa da esquerda para a direita e inclui o processamento dos ficheiros de sequência, a geração de uma tabela de contagem de leitura, e a anotação das sequências obtidas. Arquivos da sequência derivada do sequenciador Illumina; FastqFastQC: ferramenta para controle de qualidade do arquivo fastq; Trimmomatic e FastqMcf: ferramentas para processamento dos arquivos fastq; BLAST: ferramenta de busca de alinhamento local básico.

Um problema desafiador para espécies animais, incluindo suínos e bovinos é o baixo número de pequenos ncRNAs anotados, o que complica o uso de BWA para mapeamento e miRDeep2 para identificação de miRNAs.

Além disso, pequenas bibliotecas de RNA normalmente contêm também muitos outros pequenos RNAs além de miRNA, tais como fragmentos de RNA ribossomal (rRNA), RNA de transferência (tRNA), RNA de pequenos nucléolos



(snoRNA), pequenos RNAs nucleares (snRNA), e RNAs associados à proteína PiWi (piRNAs) em caso de células germinativas (Cole et al., 2009). Embora a previsão de novos miRNA possa ser realizada através da utilização de miRDeep2 (Friedlander et al., 2012), a anotação de fragmentos de sequências derivadas de outras moléculas de RNA é mais difícil. Em contraste, em seres humanos, uma grande variedade de ncRNAs é conhecida em relação a outras espécies de mamíferos. Esta informação pode ser usada para melhorar a anotação dos dados de pequenos RNA de outras espécies, uma vez que muitos destes RNAs são altamente conservados. O uso de BLASTn-short (instalação local no Galaxy) para comparação de toda sequência disponível de moléculas de RNA da espécie-alvo e a inclusão de informações ortólogas, derivadas da anotação da espécie de diferentes fontes de anotação, melhorando significativamente a anotação das sequências identificadas em 80-90% no pequeno RNA-Seq, dependendo da espécie e do tipo de amostra (JochenBick 2016, comunicação pessoal). A ocorrência frequente de sequências que representam isoformas de miRNAs (isomiRs) (Krawczynski et al., 2015a; Zhang et al., 2016) pode melhorar ainda mais a anotação da sequência. IsomiRs resultam de clivagem imprecisa e alternativa durante o processamento de pré-miRNA e modificação pós-transcricional. Os isomiRs mostram diferente estabilidade miRNA, localização sub-celular e seleção de alvos (Zhang et al., 2016). Uma vez que a modificação pós-transcricional durante o processamento de miARN também conduz à adição de nucleótidos não correspondentes à sequência do genoma dessas isomiRs não pode ser facilmente mapeada usando BWA e / ou miRDeep2. Usando a estratégia de anotação com base em pesquisas blastn dados seguintes de análises estatísticas pode ser realizada, incluindo vários tipos de apenas pequenas ncRNAs ou miARNs. Além disso, com base na tentativa de anotar, tanto quanto possível das sequências obtidas, as porcentagens das contagens de leitura em relação ao número total de contagens de leitura pode ser calculada para os tipos individuais de ncRNAs. Isso também pode ajudar a identificar valores atípicos ou biológicos em um conjunto de dados.

### Anotação de genes de animais

Os esforços para sequenciar o genoma humano (Lander et al., 2001) foram extremamente elevados e custou sozinho ao contribuinte norte-americano quase três bilhões de dólares. Para além da sequência do genoma foram realizadas em si grandes projetos para sequenciar cDNAs de comprimento total a partir de mRNA derivado de quase todos os tecidos humanos (Wiemann et al., 2001) para se obter informação sobre as regiões transcritas no genoma, estruturas de genes, e as isoformas de transcrição. Enquanto isso, os genomas foram sequenciados também para espécies animais (Elsik et al., 2009; Wade et al., 2009; Groenen et al., 2012). No entanto, anotação de genes para estas espécies ainda é baseado em grande parte na comparação com genes ortólogos de ratos ou humanos. Além disso, diferentes pipelines de anotação, por exemplo, NCBI e Ensembl, proporcionam modelos de genes com diferenças

substanciais a se fazer a atribuição correta de genes anotados com diferentes pipelines no mesmo locus genômico. As informações correspondentes para a atribuição de genes em Gene Entrez de genes em Ensembl é incompleta (NCBI->Ensembl) ou incorreta (Ensembl->Entrez Gene). Este é um problema grave se informações úteis, como anotação ortóloga encontrado em um banco de dados deve ser atribuído a IDs de genes de outro banco de dados.

Para a análise de anotação e bioinformática funcional do uso de IDs de genes de espécie animal não é o ideal e leva à perda de informação. A razão para isso é a anotação incompleta, ou seja, muitos genes ainda não têm o símbolo oficial do gene e não são atribuídos a bancos de dados de anotações funcionais, tais como Gene Ontologies (Ashburner et al., 2000) e banco de dados via KEGG (Kanehisa e Goto, 2000). Para evitar esta perda de informação, a informação do ortólogo humano putativo pode ser usada. Uma fonte de informação ortóloga é, por exemplo EnsemblCompara (Vilella et al., 2009; Pignatelli et al., 2016). A fim de combinar informações derivadas de diferentes bancos de dados fornecidos pelo NCBI e Ensembl estamos desenvolvendo um banco de dados de Ortólogos de mamíferos e de anotação (MOA - Db) integrado na plataforma Galaxy em nosso grupo (JochenBick 2016, resultados não publicados). Uma visão geral esquemática do MOA - Db é mostrado na Figura 3.

### Conclusões

O desenvolvimento em abordagens da genômica funcional abriu novas formas de melhorar a nossa compreensão da complexa característica da fertilidade. Após a primeira onda de entusiasmo, é cada vez mais evidente que existe um número de grandes desafios no contexto de análise e integração dos dados. Os principais problemas são inerentes normas em falta para condutas de análise de dados, integração de diferentes tipos de conjuntos de dados, viés de conjuntos de dados relacionados a diferentes laboratórios, protocolos e o uso de diferentes plataformas. Além disso, um desafio particular é a integração dos resultados de diferentes abordagens omics, como genoma, transcriptoma, proteoma e análise metaboloma. Um dos principais obstáculos para a integração de conjuntos de dados genômicos é a existência de uma infinidade de diferentes bases de dados e identificadores correspondentes, bem como anotações de genes incompletos, inconsistentes e não coordenados, por exemplo, quando se compara anotação do genoma no NCBI e Ensembl. Além disso, uma insuficiente e / ou errônea anotação do gene ou proteína conduz a uma perda significativa de informação e, no pior caso, a interpretação errada de dados. Apesar de todos esses problemas e desafios, o desenvolvimento das novas tecnologias de sequenciamento no que diz respeito às tecnologias de genômica funcional promete uma nova era de pesquisa na ciência animal.

Figure 3

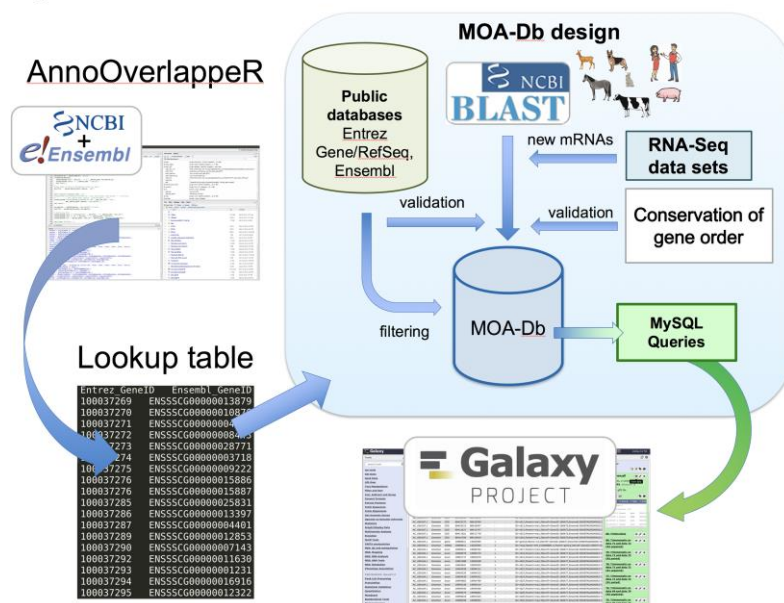


Figura 3: Desenvolvimento de um banco de dados de Mamíferos Ortólogos e de anotação de banco de dados (MOA-Db). Com base em informações derivadas de bases de dados públicas e conjuntos de dados de RNA-Seq disponíveis, um banco de dados de anotação é construído para um número de espécies de mamíferos incluindo anotação de gene de NCBI e Ensembl, bem como informações de ortólogos. As relações ortólogas são baseadas em informações extraídas de bases de dados tais como EnsemblCompara, bem como sobre as comparações de explosão globais transversais de todos os transcritos anotados no NCBI para cada espécie.

### Referências

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25, 3389-3402.

Anders, S., McCarthy, D.J., Chen, Y., Okoniewski, M., Smyth, G.K., Huber, W., Robinson, M.D. 2013. Count-based differential expression analysis of RNA sequencing data using R and Bioconductor. *Nat Protoc* 8, 1765-1786.

Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., Davis, A.P., Dolinski, K., Dwight, S.S., Eppig, J.T., Harris, M.A., Hill, D.P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J.C., Richardson, J.E., Ringwald, M., Rubin, G.M., Sherlock, G. 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. *The Gene Ontology Consortium. Nat Genet* 25, 25-29.

Bauersachs, S. 2014. Combined analysis of transcriptome studies of bovine endometrium during the preimplantation phase and comparison to results from ovine and porcine preimplantation endometrium. In: Juengel, J.L., Miyamoto, A., Price, C., Reynolds, L.P., Smith, M.F., Webb, R. (Eds.), *Reproduction in Domestic Ruminants VIII, Proceedings of the Ninth International Symposium on Reproduction in Domestic Ruminants*, Context Products Ltd, Leicestershire, UK, Leicestershire, pp. 167-177.

Bauersachs, S., Wolf, E. 2015. Uterine responses to the preattachment embryo in domestic ungulates:

recognition of pregnancy and preparation for implantation. *Annual review of animal biosciences* 3, 489-511.

Bidarimath, M., Khalaj, K., Wessels, J.M., Tayade, C. 2014. MicroRNAs, immune cells and pregnancy. *Cell. Mol. Immunol.* 11, 538-547.

Blankenberg, D., Von Kuster, G., Coraor, N., Ananda, G., Lazarus, R., Mangan, M., Nekrutenko, A., Taylor, J. 2010. Galaxy: a web-based genome analysis tool for experimentalists. *Current protocols in molecular biology* / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.] Chapter 19, Unit 19 10 11-21.

Cole, C., Sobala, A., Lu, C., Thatcher, S.R., Bowman, A., Brown, J.W., Green, P.J., Barton, G.J., Hutvagner, G. 2009. Filtering of deep sequencing data reveals the existence of abundant Dicer-dependent small RNAs derived from tRNAs. *RNA* 15, 2147-2160.

Elsik, C.G., Tellam, R.L., Worley, K.C., Gibbs, R.A., Muzny, D.M., Weinstock, G.M., Adelson, D.L., Eichler, E.E., Elnitski, L., Guigo, R., Hamernik, D.L., Kappes, S.M., Lewin, H.A., Lynn, D.J., Nicholas, F.W., Raymond, A., Rijnkels, M., Skow, L.C., Zdobnov, E.M., Schook, L., Womack, J., Alioto, T., Antonarakis, S.E., Astashyn, A., Chapple, C.E., Chen, H.C., Chrast, J., Camara, F., Ermolaeva, O., Henriksen, C.N., Hlavina, W., Kapustin, Y., Kiryutin, B., Kitts, P., Kokocinski, F., Landrum, M., Maglott, D., Pruitt, K., Sapojnikov, V., Searle, S.M., Solovyev, V., Souvorov, A., Ucla, C., Wyss, C., Anzola, J.M., Gerlach, D., Elhaik, E., Graur, D.,



- Reese, J.T., Edgar, R.C., McEwan, J.C., Payne, G.M., Raison, J.M., Junier, T., Kriventseva, E.V., Eyra, E., Plass, M., Donthu, R., Larkin, D.M., Reecy, J., Yang, M.Q., Chen, L., Cheng, Z., Chitko-McKown, C.G., Liu, G.E., Matukumalli, L.K., Song, J., Zhu, B., Bradley, D.G., Brinkman, F.S., Lau, L.P., Whiteside, M.D., Walker, A., Wheeler, T.T., Casey, T., German, J.B., Lemay, D.G., Maqbool, N.J., Molenaar, A.J., Seo, S., Stothard, P., Baldwin, C.L., Baxter, R., Brinkmeyer-Langford, C.L., Brown, W.C., Childers, C.P., Connelley, T., Ellis, S.A., Fritz, K., Glass, E.J., Herzig, C.T., Iivanainen, A., Lahmers, K.K., Bennett, A.K., Dickens, C.M., Gilbert, J.G., Hagen, D.E., Salih, H., Aerts, J., Caetano, A.R., Dalrymple, B., Garcia, J.F., Gill, C.A., Hiendleder, S.G., Memili, E., Spurlock, D., Williams, J.L., Alexander, L., Brownstein, M.J., Guan, L., Holt, R.A., Jones, S.J., Marra, M.A., Moore, R., Moore, S.S., Roberts, A., Taniguchi, M., Waterman, R.C., Chacko, J., Chandrabose, M.M., Cree, A., Dao, M.D., Dinh, H.H., Gabisi, R.A., Hines, S., Hume, J., Jhangiani, S.N., Joshi, V., Kovar, C.L., Lewis, L.R., Liu, Y.S., Lopez, J., Morgan, M.B., Nguyen, N.B., Okwuonu, G.O., Ruiz, S.J., Santibanez, J., Wright, R.A., Buhay, C., Ding, Y., Dugan-Rocha, S., Herdandez, J., Holder, M., Sabo, A., Egan, A., Goodell, J., Wilczek-Boney, K., Fowler, G.R., Hitchens, M.E., Lozado, R.J., Moen, C., Steffen, D., Warren, J.T., Zhang, J., Chiu, R., Schein, J.E., Durbin, K.J., Havlak, P., Jiang, H., Liu, Y., Qin, X., Ren, Y., Shen, Y., Song, H., Bell, S.N., Davis, C., Johnson, A.J., Lee, S., Nazareth, L.V., Patel, B.M., Pu, L.L., Vattathil, S., Williams, R.L., Jr., Curry, S., Hamilton, C., Sodergren, E., Wheeler, D.A., Barris, W., Bennett, G.L., Eggen, A., Green, R.D., Harhay, G.P., Hobbs, M., Jann, O., Keele, J.W., Kent, M.P., Lien, S., McKay, S.D., McWilliam, S., Ratnakumar, A., Schnabel, R.D., Smith, T., Snelling, W.M., Sonstegard, T.S., Stone, R.T., Sugimoto, Y., Takasuga, A., Taylor, J.F., Van Tassell, C.P., Macneil, M.D., Abatepaulo, A.R., Abbey, C.A., Ahola, V., Almeida, I.G., Amadio, A.F., Anatriello, E., Bahadue, S.M., Biase, F.H., Boldt, C.R., Carroll, J.A., Carvalho, W.A., Cervellati, E.P., Chacko, E., Chapin, J.E., Cheng, Y., Choi, J., Colley, A.J., de Campos, T.A., De Donato, M., Santos, I.K., de Oliveira, C.J., Deobald, H., Devinoy, E., Donohue, K.E., Dovc, P., Eberlein, A., Fitzsimmons, C.J., Franzin, A.M., Garcia, G.R., Genini, S., Gladney, C.J., Grant, J.R., Greaser, M.L., Green, J.A., Hadsell, D.L., Hakimov, H.A., Halgren, R., Harrow, J.L., Hart, E.A., Hastings, N., Hernandez, M., Hu, Z.L., Ingham, A., Iso-Touru, T., Jamis, C., Jensen, K., Kapetis, D., Kerr, T., Khalil, S.S., Khatib, H., Kolbehdari, D., Kumar, C.G., Kumar, D., Leach, R., Lee, J.C., Li, C., Logan, K.M., Malinvern, R., Marques, E., Martin, W.F., Martins, N.F., Maruyama, S.R., Mazza, R., McLean, K.L., Medrano, J.F., Moreno, B.T., More, D.D., Muntean, C.T., Nandakumar, H.P., Nogueira, M.F., Olsaker, I., Pant, S.D., Panzitta, F., Pastor, R.C., Poli, M.A., Poslusny, N., Rachagani, S., Ranganathan, S., Razpet, A., Riggs, P.K., Rincon, G., Rodriguez-Orsorio, N., Rodriguez-Zas, S.L., Romero, N.E., Rosenwald, A., Sando, L., Schmutz, S.M., Shen, L., Sherman, L., Southey, B.R., Lutzow, Y.S., Sweedler, J.V., Tammen, I., Telugu, B.P., Urbanski, J.M., Utsunomiya, Y.T., Verschoor, C.P., Waardenberg, A.J., Wang, Z., Ward, R., Weikard, R., Welsh, T.H., Jr., White, S.N., Wilming, L.G., Wunderlich, K.R., Yang, J., Zhao, F.Q. 2009. The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. *Science* 324, 522-528.
- Friedlander, M.R., Mackowiak, S.D., Li, N., Chen, W., Rajewsky, N. 2012. miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. *Nucleic Acids Res* 40, 37-52.
- Giardine, B., Riemer, C., Hardison, R.C., Burhans, R., Elnitski, L., Shah, P., Zhang, Y., Blankenberg, D., Albert, I., Taylor, J., Miller, W., Kent, W.J., Nekrutenko, A. 2005. Galaxy: a platform for interactive large-scale genome analysis. *Genome Res* 15, 1451-1455.
- Goodwin, S., McPherson, J.D., McCombie, W.R. 2016. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet* 17, 333-351.
- Groenen, M.A., Archibald, A.L., Uenishi, H., Tuggle, C.K., Takeuchi, Y., Rothschild, M.F., Rogel-Gaillard, C., Park, C., Milan, D., Megens, H.J., Li, S., Larkin, D.M., Kim, H., Frantz, L.A., Caccamo, M., Ahn, H., Aken, B.L., Anselmo, A., Anthon, C., Auvil, L., Badaoui, B., Beattie, C.W., Bendixen, C., Berman, D., Blecha, F., Blomberg, J., Bolund, L., Bosse, M., Botti, S., Bujie, Z., Bystrom, M., Capitanu, B., Carvalho-Silva, D., Chardon, P., Chen, C., Cheng, R., Choi, S.H., Chow, W., Clark, R.C., Clee, C., Crooijmans, R.P., Dawson, H.D., Dehais, P., De Sapia, F., Dibbits, B., Drou, N., Du, Z.Q., Eversole, K., Fadista, J., Fairley, S., Faraut, T., Faulkner, G.J., Fowler, K.E., Fredholm, M., Fritz, E., Gilbert, J.G., Giuffra, E., Gorodkin, J., Griffin, D.K., Harrow, J.L., Hayward, A., Howe, K., Hu, Z.L., Humphray, S.J., Hunt, T., Hornshoj, H., Jeon, J.T., Jern, P., Jones, M., Jurka, J., Kanamori, H., Kapetanovic, R., Kim, J., Kim, J.H., Kim, K.W., Kim, T.H., Larson, G., Lee, K., Lee, K.T., Leggett, R., Lewin, H.A., Li, Y., Liu, W., Loveland, J.E., Lu, Y., Lunney, J.K., Ma, J., Madsen, O., Mann, K., Matthews, L., McLaren, S., Morozumi, T., Murtaugh, M.P., Narayan, J., Nguyen, D.T., Ni, P., Oh, S.J., Onteru, S., Panitz, F., Park, E.W., Park, H.S., Pascal, G., Paudel, Y., Perez-Enciso, M., Ramirez-Gonzalez, R., Reecy, J.M., Rodriguez-Zas, S., Rohrer, G.A., Rund, L., Sang, Y., Schachtschneider, K., Schraiber, J.G., Schwartz, J., Scobie, L., Scott, C., Searle, S., Servin, B., Southey, B.R., Sperber, G., Stadler, P., Sweedler, J.V., Tafer, H., Thomsen, B., Wali, R., Wang, J., Wang, J., White, S., Xu, X., Yerle, M., Zhang, G., Zhang, J., Zhang, J., Zhao, S., Rogers, J., Churcher, C., Schook, L.B. 2012. Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution. *Nature* 491, 393-398.
- Hrdlickova, R., Toloue, M., Tian, B. 2016. RNA-Seq methods for transcriptome analysis. Wiley interdisciplinary reviews. *RNA*.
- Kanehisa, M., Goto, S. 2000. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* 28, 27-30.

- Kim, D., Langmead, B., Salzberg, S.L., 2015. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods* 12, 357-360.
- Kim, D., Pertea, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R., Salzberg, S.L. 2013. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol* 14, R36.
- Kotaja, N., 2014. MicroRNAs and spermatogenesis. *Fertil Steril* 101, 1552-1562.
- Krawczynski, K., Bauersachs, S., Reliszko, Z.P., Graf, A., Kaczmarek, M.M. 2015a. Expression of microRNAs and isomiRs in the porcine endometrium: implications for gene regulation at the maternal-conceptus interface. *BMC Genomics* 16, 906.
- Krawczynski, K., Najmula, J., Bauersachs, S., Kaczmarek, M.M. 2015b. MicroRNAome of porcine conceptuses and trophoblasts: expression profile of micrornas and their potential to regulate genes crucial for establishment of pregnancy. *Biol Reprod* 92, 21.
- Krol, J., Loedige, I., Filipowicz, W. 2010. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* 11, 597-610.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczy, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J.P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, Y., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J.C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R.H., Wilson, R.K., Hillier, L.W., McPherson, J.D., Marra, M.A., Mardis, E.R., Fulton, L.A., Chinwalla, A.T., Pepin, K.H., Gish, W.R., Chissole, S.L., Wendl, M.C., Delehaunty, K.D., Miner, T.L., Delehaunty, A., Kramer, J.B., Cook, L.L., Fulton, R.S., Johnson, D.L., Minx, P.J., Clifton, S.W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J.F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., Gibbs, R.A., Muzny, D.M., Scherer, S.E., Bouck, J.B., Sodergren, E.J., Worley, K.C., Rives, C.M., Gorrell, J.H., Metzker, M.L., Naylor, S.L., Kucherlapati, R.S., Nelson, D.L., Weinstock, G.M., Sakaki, Y., Fujiyama, A., Hattori, M., Yada, T., Toyoda, A., Itoh, T., Kawagoe, C., Watanabe, H., Totoki, Y., Taylor, T., Weissenbach, J., Heilig, R., Saurin, W., Artiguenave, F., Brottier, P., Bruls, T., Pelletier, E., Robert, C., Wincker, P., Smith, D.R., Doucette-Stamm, L., Rubenfield, M., Weinstock, K., Lee, H.M., Dubois, J., Rosenthal, A., Platzer, M., Nyakatura, G., Taudien, S., Rump, A., Yang, H., Yu, J., Wang, J., Huang, G., Gu, J., Hood, L., Rowen, L., Madan, A., Qin, S., Davis, R.W., Federspiel, N.A., Abola, A.P., Proctor, M.J., Myers, R.M., Schmutz, J., Dickson, M., Grimwood, J., Cox, D.R., Olson, M.V., Kaul, R., Raymond, C., Shimizu, N., Kawasaki, K., Minoshima, S., Evans, G.A., Athanasiou, M., Schultz, R., Roe, B.A., Chen, F., Pan, H., Ramser, J., Lehrach, H., Reinhardt, R., McCombie, W.R., de la Bastide, M., Dedhia, N., Blocker, H., Hornischer, K., Nordsiek, G., Agarwala, R., Aravind, L., Bailey, J.A., Bateman, A., Batzoglou, S., Birney, E., Bork, P., Brown, D.G., Burge, C.B., Cerutti, L., Chen, H.C., Church, D., Clamp, M., Copley, R.R., Doerks, T., Eddy, S.R., Eichler, E.E., Furey, T.S., Galagan, J., Gilbert, J.G., Harmon, C., Hayashizaki, Y., Haussler, D., Hermjakob, H., Hokamp, K., Jang, W., Johnson, L.S., Jones, T.A., Kasif, S., Kasprzyk, A., Kennedy, S., Kent, W.J., Kitts, P., Koonin, E.V., Korf, I., Kulp, D., Lancet, D., Lowe, T.M., McLysaght, A., Mikkelsen, T., Moran, J.V., Mulder, N., Pollara, V.J., Ponting, C.P., Schuler, G., Schultz, J., Slater, G., Smit, A.F., Stupka, E., Szustakowski, J., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Wagner, L., Wallis, J., Wheeler, R., Williams, A., Wolf, Y.I., Wolfe, K.H., Yang, S.P., Yeh, R.F., Collins, F., Guyer, M.S., Peterson, J., Felsenfeld, A., Wetterstrand, K.A., Patrinos, A., Morgan, M.J., de Jong, P., Catanese, J.J., Osoegawa, K., Shizuya, H., Choi, S., Chen, Y.J., Szustakowski, J. International Human Genome Sequencing, C., 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921.
- Li, H., Durbin, R. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25, 1754-1760.
- Liu, N., Liu, L., Pan, X. 2014. Single-cell analysis of the transcriptome and its application in the characterization of stem cells and early embryos. *Cell Mol Life Sci* 71, 2707-2715.
- Love, M.I., Huber, W., Anders, S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15, 550.
- Marr, C., Zhou, J.X., Huang, S. 2016. Single-cell gene expression profiling and cell state dynamics: collecting data, correlating data points and connecting the dots. *Current opinion in biotechnology* 39, 207-214.
- Minten, M.A., Bilby, T.R., Bruno, R.G., Allen, C.C., Madsen, C.A., Wang, Z., Sawyer, J.E., Tibary, A., Neibergs, H.L., Geary, T.W., Bauersachs, S., Spencer, T.E. 2013. Effects of fertility on gene expression and function of the bovine endometrium. *PLoS One* 8, e69444.
- Moore, S.G., Pryce, J.E., Hayes, B.J., Chamberlain, A.J., Kemper, K.E., Berry, D.P., McCabe, M., Cormican, P., Lonergan, P., Fair, T., Butler, S.T. 2016. Differentially Expressed Genes in Endometrium and Corpus Luteum of Holstein Cows Selected for High and Low Fertility Are Enriched for Sequence Variants Associated with Fertility. *Biol Reprod* 94, 19.
- Pertea, M., Pertea, G.M., Antonescu, C.M., Chang, T.C., Mendell, J.T., Salzberg, S.L. 2015. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nat Biotechnol* 33, 290-295.
- Pignatelli, M., Vilella, A.J., Muffato, M., Gordon, L., White, S., Flicek, P., Herrero, J. 2016. ncRNA

orthologies in the vertebrate lineage. Database (Oxford) 2016.

**Pimentel, E.C., Bauersachs, S., Tietze, M., Simianer, H., Tetens, J., Thaller, G., Reinhardt, F., Wolf, E., Konig, S.** 2011. Exploration of relationships between production and fertility traits in dairy cattle via association studies of SNPs within candidate genes derived by expression profiling. *Anim Genet* 42, 251-262.

**Ponsuksili, S., Tesfaye, D., Schellander, K., Hoelker, M., Hadlich, F., Schwerin, M., Wimmers, K.** 2014. Differential expression of miRNAs and their target mRNAs in endometria prior to maternal recognition of pregnancy associates with endometrial receptivity for in vivo- and in vitro-produced bovine embryos. *Biol Reprod* 91, 135.

**Rajasundaram, D., Selbig, J.** 2016. More effort - more results: recent advances in integrative 'omics' data analysis. *Current opinion in plant biology* 30, 57-61.

**Robinson, M.D., McCarthy, D.J., Smyth, G.K.** 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26, 139-140.

**Sun, Y.V., Hu, Y.J.** 2016. Integrative Analysis of Multi-omics Data for Discovery and Functional Studies of Complex Human Diseases. *Advances in genetics* 93, 147-190.

**Suravajhala, P., Kogelman, L.J., Kadarmideen, H.N.** 2016. Multi-omic data integration and analysis using systems genomics approaches: methods and applications in animal production, health and welfare. *Genetics, selection, evolution : GSE* 48, 38.

**Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D.R., Pimentel, H., Salzberg, S.L., Rinn, J.L., Pachter, L.** 2012. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat Protoc* 7, 562-578.

**Vilella, A.J., Severin, J., Ureta-Vidal, A., Heng, L., Durbin, R., Birney, E.** 2009. EnsemblCompara GeneTrees: Complete, duplication-aware phylogenetic trees in vertebrates. *Genome Res* 19, 327-335.

**Wade, C.M., Giulotto, E., Sigurdsson, S., Zoli, M., Gnerre, S., Imsland, F., Lear, T.L., Adelson, D.L., Bailey, E., Bellone, R.R., Blocker, H., Distl, O., Edgar, R.C., Garber, M., Leeb, T., Mauceli, E., MacLeod, J.N., Penedo, M.C., Raison, J.M., Sharpe, T., Vogel, J., Andersson, L., Antczak, D.F., Biagi, T., Binns, M.M., Chowdhary, B.P., Coleman, S.J., Della Valle, G., Fryc, S., Guerin, G., Hasegawa, T., Hill, E.W., Jurka, J., Kiialainen, A., Lindgren, G., Liu, J., Magnani, E., Mickelson, J.R., Murray, J., Nergadze, S.G., Onofrio, R., Pedroni, S., Piras, M.F., Raudsepp, T., Rocchi, M., Roed, K.H., Ryder, O.A., Searle, S., Skow, L., Swinburne, J.E., Syvanen, A.C., Tozaki, T., Valberg, S.J., Vaudin, M., White, J.R., Zody, M.C., Broad Institute Genome Sequencing, P., Broad Institute Whole Genome Assembly, T., Lander, E.S., Lindblad-Toh, K.** 2009. Genome sequence, comparative analysis, and population genetics of the domestic horse. *Science* 326, 865-867.

**Wiemann, S., Weil, B., Wellenreuther, R., Gassenhuber, J., Glassl, S., Ansorge, W., Bocher, M.,**

**Blocker, H., Bauersachs, S., Blum, H., Lauber, J., Dusterhoft, A., Beyer, A., Kohrer, K., Strack, N., Mewes, H.W., Ottenwalder, B., Obermaier, B., Tampe, J., Heubner, D., Wambutt, R., Korn, B., Klein, M., Poustka, A.** 2001. Toward a catalog of human genes and proteins: sequencing and analysis of 500 novel complete protein coding human cDNAs. *Genome Res* 11, 422-435.

**Zhang, G., Annan, R.S., Carr, S.A., Neubert, T.A.** 2014a. Overview of peptide and protein analysis by mass spectrometry. *Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.]* 108, 10.21.11-30.

**Zhang, Y., Zang, Q., Xu, B., Zheng, W., Ban, R., Zhang, H., Yang, Y., Hao, Q., Iqbal, F., Li, A., Shi, Q.** 2016. IsomiR Bank: a research resource for tracking IsomiRs. *Bioinformatics*.

**Zhang, Z., Wu, S., Stenoien, D.L., Pasa-Tolic, L.** 2014b. High-throughput proteomics. *Annual review of analytical chemistry* 7, 427-454.

## Diferenças endócrinas e metabólicas entre vacas *Bos taurus* e *Bos indicus* e implicações para o manejo reprodutivo

Roberto Sartori<sup>1,\*</sup>, Pedro Leopoldo Jeronimo Monteiro Jr.<sup>1</sup>, Milo Charles Wiltbank<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciência Animal, ESALQ, Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, SP 13418-900, Brasil

<sup>2</sup>Dairy Science Department, Universidade de Wisconsin, Madison, WI 53706, USA

Título curto: Diferenças reprodutivas entre *B. taurus* e *B. indicus*

\*Autor para correspondência: robertosartori@usp.br

### Resumo

Com base nas consideráveis diferenças morfológicas e funcionais ovarianas, assim como nas concentrações circulantes de hormônios e de metabólitos entre *Bos indicus* (*B. indicus*) e *Bos taurus* (*B. taurus*), pesquisadores tem usado esse conhecimento para otimizar os protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF), e a produção *in vivo* de embriões oriundos de ovulações múltiplas ou produção *in vitro* de embriões (PIV). Em *B. indicus*, no momento do desvio folicular, o folículo dominante é menor e adquire capacidade ovulatória com diâmetro menor do que em *B. taurus*. Além disso, apesar de *B. indicus* ovular folículos de menores diâmetros e possuir corpos lúteos (CL) também menores, as concentrações circulantes de estradiol (E2) e progesterona (P4) são mais elevadas do que em *B. taurus*. Estas diferenças fisiológicas podem estar relacionadas à maior concentração de colesterol, insulina e IGF1 circulantes em *B. indicus* do que em *B. taurus*. Entretanto, para ambos grupos genéticos existe uma relação negativa entre a P4 circulante e a resposta ovulatória ao tratamento com GnRH no protocolo de IATF. Apesar da metabolização de hormônios esteróides ser mais lenta em *B. indicus*, a dose de 2 mg de benzoato de estradiol parece ser ideal tanto para vacas *B. indicus* (aptidão para produção de carne, raça Nelore), quanto para *B. taurus* (aptidão para produção de carne, da raça Angus, e para produção de leite, da raça Holandês) no início do protocolo de IATF baseado em E2/P4. Vários estudos com *B. indicus* e *B. taurus* mostraram que uma única dose de PGF2 $\alpha$  pode ser insuficiente para induzir luteólise. Quando submetidas a ovulações múltiplas e transferência de embrião, as vacas e novilhas *B. indicus* são mais sensíveis a FSH necessitando assim de uma menor dose do que as fêmeas *B. taurus*. Além disso, a PIV tem obtido maior sucesso em fêmeas *B. indicus* do que *B. taurus* devido à maior contagem de folículos antrais e hormônio anti-muleriano, e melhor qualidade oocitária.

**Palavras-chave:** Nelore, Holstein, Hormônio, Metabolismo, Inseminação artificial, transferência de embrião

### Introdução

Estudos recentes tem incrementado o conhecimento sobre a fisiologia reprodutiva de vacas e novilhas *Bos*

*indicus* (*B. indicus*) especialmente por meio de comparações diretas com *Bos taurus* (*B. taurus*) sob as mesmas condições de ambiente, nutricionais e de manejo. Estes estudos identificaram diferenças consideráveis na morfologia e função ovarianas, assim como de hormônios e metabólitos circulantes entre estes dois grupos genéticos.

Atualmente, os pesquisadores estão utilizando este conhecimento adquirido para otimizar protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e a produção *in vivo* de embriões por meio de ovulações múltiplas (MOET) ou produção *in vitro* (PIV). Este manuscrito está dividido em sessões que descrevem: 1) Diferenças na fisiologia reprodutiva entre *B. indicus* e *B. taurus*, 2) Implicações práticas das diferenças fisiológicas entre *B. indicus* e *B. taurus* para protocolos de IATF, e 3) Implicações práticas das diferenças fisiológicas entre *B. indicus* e *B. taurus* para a produção de embriões.

Devido Nelore (*B. indicus*) e Holandês (*B. taurus*) constituírem as principais raças utilizadas no Brasil para carne e leite, respectivamente, elas são mais representativas dos estudos discutidos neste artigo.

### Diferenças na fisiologia reprodutiva entre *B. indicus* e *B. taurus*

Durante a última década, houve um incremento substancial em estudos que comparam fisiologia reprodutiva entre *B. indicus* e *B. taurus*. Apesar de apresentarmos abaixo um resumo destes resultados e uma compilação de dados na Figura 1 e Tabela 1, o objetivo deste manuscrito não é descrever estes dados extensivamente. Por esta razão, para informações detalhadas, sugerimos que o leitor consulte as publicações mencionadas nesta revisão.

A média de contagem de folículos antrais (CFA) em *B. indicus* é o dobro da observada em *B. taurus* (Figura 1; Tabela 1). Por exemplo, na emergência da onda, o número de folículos medindo entre 2 e 5 mm presente nos ovários foi 42,7 (variando de 25 a 100) em vacas Nelores e 19,7 (variando de 5 a 40) em Holandesas (Bastos *et al.*, 2010). Maior CFA tem sido associada a maiores concentrações de hormônio anti-muleriano (AMH) em *B. indicus* comparado a *B. taurus* (Baldighi *et al.*, 2014; Batista *et al.*, 2014). Outra diferença observada entre *B. taurus* e *B. indicus* é o tamanho do folículo dominante no momento do desvio. Em vacas Holandesas, o diâmetro do futuro folículo ovulatório no momento do desvio variou entre 8,3 e 9,8 mm (Ginther *et*

*al.*, 1996; Sartori *et al.*, 2004; Bastos *et al.*, 2010). Contudo, em novilhas Nelores, o desvio acontece quando o folículo dominante atinge entre 5,4 e 6,2 mm (Sartorelli *et al.*, 2005; Gimenes *et al.*, 2008), e em vacas não lactantes entre 7,0 e 7,4 mm de diâmetro (Bastos *et al.*, 2010; Sartori *et al.*, 2016). Entretanto, o tempo após ovulação ou após a emergência da onda até o desvio folicular foi similar entre *B. taurus* e *B.*

*indicus* (Sartori *et al.*, 2010a; Sartori *et al.*, 2016; Figura 1) devido a uma taxa de crescimento mais lenta em Neloze (0,8 a 1,2 mm/dia; Gimenes *et al.*, 2008; Sartori and Barros, 2011) do que em Holandês (1,2 to 1,6 mm/d; Sartori *et al.*, 2001).

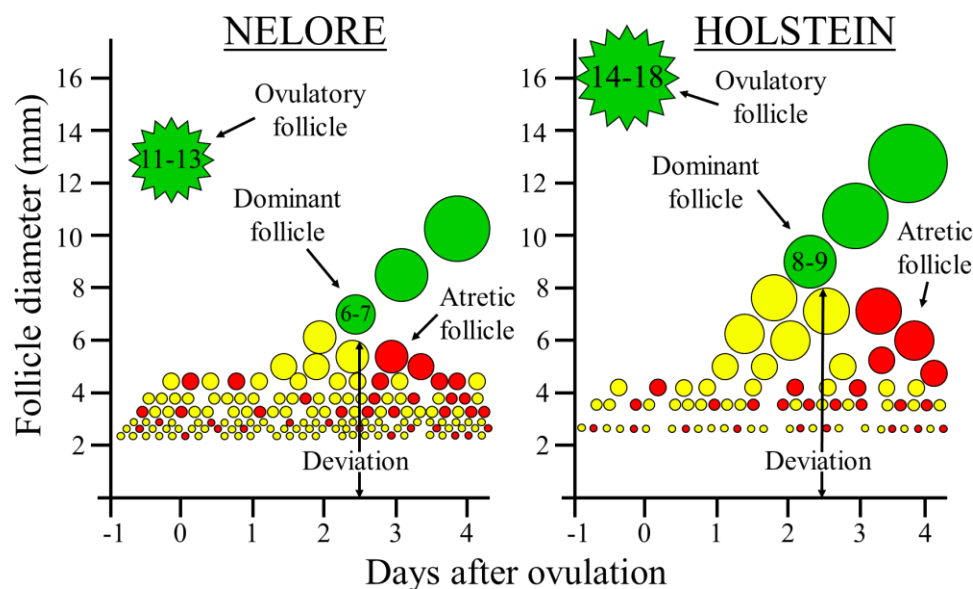


Figura 1. Representação esquemática do desenvolvimento folicular em vacas Neloze (*Bos indicus*) e Holandesa (*B. taurus*) com base em dados da literatura e dados não publicados. Fêmeas Neloze apresentam maior população de folículos menores (2 a 5 mm) nos ovários durante todo o ciclo do que fêmeas Holandesas. Apesar das duas raças apresentarem o desvio folicular entre 2 e 3 dias após a ovulação, o diâmetro do futuro folículo dominante no desvio é maior em fêmeas Holandesas. O diâmetro do folículo ovulatório também é maior em fêmeas Holandesas quando comparadas às Neloze (de Sartori *et al.*, 2010a).

Apesar do desvio folicular acontecer em *B. indicus* quando o folículo dominante alcança entre 5,0 e 7,5 mm de diâmetro e entre 8,0 a 10,0 mm em *B. taurus*, é possível que seja necessário um crescimento adicional para que o folículo dominante adquira capacidade ovulatória em ambas as raças. Sartori *et al.* (2001) observaram que vacas Holandesas com folículos com 7,0 ou 8,5 mm de diâmetro não ovulam, mesmo após administração de uma alta dose de pLH (40 mg). Entretanto, 80% das vacas com folículos  $\geq 10$  mm ovularam após administração de pLH. Em contraste, Gimenes *et al.* (2008) descreveram que a administração de 25 mg de pLH em novilhas *B. indicus* induziu a ovulação em 33,3, 80,0 e 90,0% dos animais com folículos entre 7,0 e 8,4, 8,5 e 10,0 e  $> 10$  mm de diâmetro, respectivamente.

O diâmetro do maior folículo ovulatório e do corpo lúteo (CL) também difere entre *B. taurus* e *B. indicus*. *B. taurus* apresentam maior diâmetro do folículo ovulatório (Figura 1) e maior volume de CL do que *B. indicus*. Entretanto, as concentrações circulantes de hormônios esteroides em *B. taurus* são menores do que em *B. indicus* (Sartori and Barros, 2011; Sartori *et al.*, 2016). Em estudos com vacas Neloze, o diâmetro do folículo ovulatório foi entre 11 e 14 mm (Figueiredo *et al.*, 1997; Sartorelli *et al.*, 2005; Sartori *et al.*, 2016), e os diâmetros dos folículos

ovulatórios em Holandesas foi entre 13 e 19 mm (Ginther *et al.*, 1989; Sartori *et al.*, 2002a; Sartori *et al.*, 2004). Similarmente, o diâmetro do CL em *B. indicus* variou entre 17 e 21 mm ou  $\sim 2,5$  a  $5,0$  cm<sup>3</sup> (Segerson *et al.*, 1984; Rhodes *et al.*, 1995; Figueiredo *et al.*, 1997; Bó *et al.*, 2003; Sartori *et al.*, 2016), enquanto que o diâmetro do CL de *B. taurus* variou entre 20 e 30 mm ou  $\sim 4,0$  a  $14,0$  cm<sup>3</sup> (Ginther *et al.*, 1989; Bó *et al.*, 2003; Sartori *et al.*, 2004; Sartori *et al.*, 2016).

Apesar de apresentar folículos e CL maiores, *B. taurus* tem menores concentrações de hormônios esteroides. Por exemplo, em estudo desenvolvido pelo nosso grupo foi demonstrado que vacas Holandesas não-lactantes apresentavam maior diâmetro de folículo ovulatório (14,2 vs. 12,9 mm) e maior volume luteal (5,2 vs. 3,9 cm<sup>3</sup>) do que vacas da raça Neloze não lactantes (Sartori *et al.*, 2016); entretanto, vacas da raça Holandês apresentaram um menor pico pré-ovulatório de estradiol circulante (E2; 12,5 vs. 16,2 pg/mL) e uma menor concentração de progesterona (P4) circulante (1,9 vs. 2,7 ng/mL) no dia 7 do ciclo estral quando comparadas a vacas da raça Neloze.

Esta relação inversa entre tamanho de estruturas ovarianas e hormônios esteroides circulantes pode estar relacionada às diferenças nas concentrações circulantes de

insulina, IGF1 e colesterol entre as duas raças. A maioria dos estudos descreveu maiores concentrações circulantes de insulina e IGF1 em *B. indicus* do que em *B. taurus* (Alvarez *et al.*, 2000; Sartori *et al.*, 2010b; Sartori *et al.*, 2013). Além disso, também foi descrito que, sob mesma condição de manejo nutricional, novilhas Nelores apresentam ~60% a mais de colesterol circulante (precursor da biossíntese dos

hormônios esteroides) do que novilhas Holandesas (196,8 vs. 123,5 mg/dL; Gandra *et al.*, 2011). Os efeitos potenciais dos hormônios metabólicos ou de outras substâncias sobre a metabolização dos hormônios esteroides e a produção de E2 e P4 pelas estruturas ovarianas são discutidos em Sartori *et al.* (2016).

Tabela 1. Comparação de variáveis reprodutivas entre *B. indicus* e *B. taurus*\*.

	<i>B. indicus</i> vs. <i>B. taurus</i>
Duração do ciclo estral	=
Dias de luteólise	≤
Número de ondas por ciclo	>
Contagem de folículos antrais	>
Concentração de AMH circulante	>
Tamanho do folículo dominante no desvio	<
Dia do desvio após a ovulação	=
Taxa de crescimento do folículo dominante/ovulatório	<
Tamanho máximo do folículo dominante/ovulatório	<
Pico de estradiol pré-ovulatório	>
Duração do estro	≤
Volume do tecido luteínico	<
Progesterona circulante	>
Taxa de clearance de hormônios esteróides	<
Insulina circulante	>
IGF1 circulante	>
FSH circulante	≤
Colesterol circulante	>

\*De Segerson *et al.* (1984); Alvarez *et al.* (2000); Bó *et al.* (2003); Carvalho *et al.* (2008); Gimenes *et al.* (2008); Sartori *et al.* (2010a); Sartori e Barros (2011); Sartori *et al.* (2013); Baldrighi *et al.* (2014); Batista *et al.* (2014); Sartori *et al.* (2016).

### Implicações práticas das diferenças fisiológicas entre *Bos indicus* e *Bos taurus* para protocolos de IATF

A inseminação artificial (IA) é uma ferramenta importante para o melhoramento genético. Entretanto, taxas de detecção de estro subótimas em vacas cíclicas (Pinheiro *et al.*, 1998; Lopez *et al.*, 2004; Sartori and Barros, 2011; Fricke *et al.*, 2014) e uma porcentagem substancial de vacas no pós-parto que não ciclam (Wiltbank *et al.*, 2002; Meneghetti *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2009) originam o problema de baixas taxas de serviço (TS) em *B. indicus* e *B. taurus*. Portanto, programas de IA baseados em detecção de estro apresentam menor eficiência reprodutiva e custo-benefício do que programas de IATF (Ribeiro *et al.*, 2012).

Os programas de IATF permitem que um número maior de vacas seja inseminado no mesmo dia, com alta eficiência reprodutiva e custo relativamente baixo. Entretanto, o sucesso de protocolos de IATF depende de vários fatores, como sincronização da onda de emergência

folicular para otimizar o período de dominância folicular impedindo assim a ocorrência de uma ovulação de um folículo envelhecido (Cerri *et al.*, 2009) ou novo demais (Vasconcelos *et al.*, 2001); a sincronização da função do CL e da P4 circulante; luteólise completa ao final do protocolo; e sincronização da ovulação final com a IA sendo realizada no momento ideal.

### Sincronização da onda de emergência folicular

Existem dois métodos principais para sincronização da onda de emergência folicular utilizados em vacas de leite e de corte: protocolos baseados em GnRH, nos quais sob a presença de um folículo dominante o GnRH induz ovulação e uma nova onda folicular se inicia (Pursley *et al.*, 1995); ou protocolos baseados em E2/P4, que induzem regressão dos folículos antrais médios e/ou grandes presentes no ovário e uma nova onda folicular se inicia dentro de alguns dias, a depender do éster de E2 usado (Bó *et al.*, 2003). Em

protocolos baseados em GnRH em vacas leiteiras, aproximadamente 50% e 70% das vacas apresentam uma nova onda adequadamente sincronizada através do Ovsynch ou Ovsynch-duplo, respectivamente (Giordano *et al.*, 2012). Em protocolos baseados em E2/P4 em vacas leiteiras, aproximadamente 70% das vacas tem sua onda folicular sincronizada adequadamente (Monteiro Jr *et al.*, 2015a).

#### **Efetividade dos protocolos baseados em GnRH para a emergência da onda em *B. taurus* e *B. indicus***

Existem vários fatores que influenciam a proporção de vacas que ovulam após um pico de GnRH/LH no início do protocolo de IATF, como o dia do ciclo estral (Vasconcelos *et al.*, 1999) e o diâmetro folicular (Sartori *et al.*, 2001; Gimenes *et al.*, 2008). Apesar dos protocolos baseados em GnRH terem apresentado sucesso em vacas *B. taurus* (Pursley *et al.*, 1995; Pursley *et al.*, 1997; Bridges *et al.*, 2008), mas não necessariamente em novilhas *B. taurus* (Pursley *et al.*, 1995; Pursley *et al.*, 1997), existem dados conflitantes em relação à sua efetividade em vacas *B. indicus* (Fernandes *et al.*, 2001; Bó *et al.*, 2003; Baruselli *et al.*, 2004; Ferraz Jr *et al.*, 2016). Abaixo descrevemos os dados de experimentos que podem explicar porque protocolos baseados em GnRH podem ter apresentado resultados subótimos nos estudos citados acima.

Mesmo na presença de um folículo dominante > 10 mm em diâmetro, tem sido demonstrado que vacas *B. taurus* não apresentam consistentes resultados de ovulação ao serem submetidas a tratamento com GnRH (Martinez *et al.*, 1999; Perry e Perry, 2009; Sartori e Wiltbank, dados não publicados). Entretanto, a concentração circulante de P4 pode afetar a ovulação induzida pelo GnRH. Por exemplo, um estudo (Biehl *et al.*, 2013) comparou a resposta ovulatória ao primeiro tratamento com GnRH (100 µg gonadorelina) do protocolo de 5d CO-Synch+CIDR em novilhas Nelores. Os tratamentos foram: AltaP4 (n = 62; GnRH em novilhas com presença de CL no momento da inserção do implante de P4); BaixaP4 (n = 35; GnRH em novilhas sem CL no momento da inserção do implante de P4); PGF-BaixaP4 (n = 65; GnRH em novilhas que apresentavam CL mas foram tratadas com 25 mg de dinoprost [PGF] 2 d antes do tratamento com GnRH e inserção do dispositivo de P4). A taxa de ovulação ao GnRH foi maior para os grupos BaixaP4 (85,7%) e PGF-BaixaP4 (95,4%) do que para o AltaP4 (25,8%). Melo *et al.* (2016) também demonstraram uma correlação negativa entre concentração circulante de P4 e resposta ovulatória ao GnRH. Falha de ovulação ao GnRH é devido, provavelmente, à relação negativa entre concentração de P4 circulante e magnitude do pico de LH induzido pela aplicação GnRH, como foi demonstrado em novilhas e vacas *B. taurus* (Colazo *et al.*, 2008; Perry e Perry, 2009; Giordano *et al.*, 2012). Tratamentos com 100 µg de GnRH na presença de alta vs. baixa concentração circulante de P4 resultou em um pico de LH muito menor (3,3 vs. 15,7 ng/mL). Entretanto, doses maiores de GnRH, mesmo na presença de elevadas concentrações circulantes de P4, podem resultar em uma maior magnitude do pico de LH e maior ovulação (Giordano *et al.*, 2013). Além disso, é possível que

diferentes análogos de GnRH produzam resultados diferentes, pois a gonadorelina induz um pico de LH menor quando comparada a outros análogos de GnRH, como lecorelina, fertirelina, ou buserelina (Chenault *et al.*, 1990; Picard-Hagen *et al.*, 2015). Apesar da magnitude do pico de LH induzido pelo GnRH na presença de baixa vs. alta P4 ainda não ter sido testada em *B. indicus*, parece muito provável que este problema possa ser uma explicação para a falha de ovulação observada diante do tratamento com GnRH neste grupo genético.

Portanto, protocolos baseados em GnRH apresentam menor sincronização da emergência da onda folicular quando têm início na presença de um CL, devido à falha de ovulação de um folículo dominante no início do protocolo. Este fato está claramente relacionado à magnitude reduzida do pico de LH induzido pelo GnRH na presença de alta concentração circulante de P4. Adicionalmente, devido ao crescimento natural das ondas foliculares durante a fase luteínica, existem muitos casos em que um folículo dominante responsivo ao LH não está presente, e portanto a ovulação não ocorreria mesmo sob um pico suficiente de LH. A presença de elevadas concentrações circulantes de P4 pode reduzir a expressão do receptor de LH no folículo dominante, o que poderia reduzir a responsividade ao pico de LH nos folículos dominantes (Dias *et al.*, 2014). Apesar de reduzida taxa de ovulação em resposta ao GnRH na presença de elevada P4, e portanto, reduzida sincronização da onda folicular, a fertilidade pode ser considerada relativamente alta em vacas que recebem o primeiro GnRH de um protocolo Ovsynch na presença de P4 elevada.

Em contraste, em uma condição de baixa concentração circulante de P4, o GnRH induz ovulação de uma grande proporção das vacas lactantes (Gumen *et al.*, 2003). Condição como esta seria esperada em vacas anovulares ou vacas na fase de pró-estro do ciclo estral. Nestas vacas a ovulação em resposta ao tratamento com GnRH é essencial para otimização da fertilidade, uma vez que vacas com baixa P4 no início do protocolo que não ovularam após receberem GnRH apresentaram fertilidade reduzida (Bisinotto *et al.*, 2015). Comparação do uso de 2 mg de benzoato de estradiol (BE) e GnRH no início do protocolo de IATF apresentou resultados variáveis. Por exemplo, Pereira *et al.* (2013a) compararam o protocolo de 5-d Cosynch, um protocolo baseado em GnRH, com um protocolo E2/P4 em vacas Holandesas (n = 1190) durante o verão. Eles observaram taxas de sincronização menores para o protocolo a base de GnRH comparado ao baseado em E2 (78,2 vs. 70,7%; P = 0,02). Entretanto, considerando apenas vacas sincronizadas, a P/IA aos 32 d não foi diferente, no entanto aos 60 d foi menor (17,7 vs. 25,6%; P = 0,03) para o GnRH quando comparado ao E2. Neste mesmo estudo foi observado uma maior perda gestacional entre o d 32 e 60 para vacas tratadas com GnRH do que E2 (21,7 vs. 6,7%; P = 0,01). Em contraste, ao realizarem estudos com vacas leiteiras de alta produção (n = 1035), Melo *et al.* (2016) relataram que, mesmo com uma baixa taxa de ovulação ao GnRH (gonadorelina; ~ 35%) no início do protocolo, vacas que receberam GnRH tenderam a apresentar maior P/IA do que as que receberam BE no início do protocolo (38,2 vs. 33,7; P = 0,07).

Muitos protocolos de IATF usando GnRH em *B. taurus* tem usado estratégias de pré-sincronização para assegurar que as vacas se encontrem em um estágio do ciclo estral que aumente a reposta ovulatória ao GnRH. Por exemplo, o Ovsynch-duplo consiste em um protocolo Ovsynch para pré-sincronizar e um segundo para fazer a IATF. O primeiro Ovsynch é para assegurar que as vacas estejam no d 6 ou 7 do ciclo estral (~94%; Herlihy *et al.*, 2012) no início do segundo Ovsynch. Esta estratégia aumenta a taxa de ovulação ao GnRH e, consequentemente também aumenta a fertilidade. Protocolos de pré-sincronização ainda não foram testados em *B. indicus*, mas, podem se mostrar muito complicados diante da maioria dos sistemas de manejo em rebanhos *B. indicus*. Infelizmente, ainda não foram realizados estudos que compararam respostas ovarianas e fertilidade em *B. taurus* vs. *B. indicus* a protocolos baseados em GnRH.

#### **Efetividade dos protocolos baseados em E2/P4 para a emergência da onda folicular em *B. taurus* e *B. indicus***

Os primeiros estudos que estabeleceram as bases fisiológicas para estes protocolos utilizaram novilhas de corte e relataram que o tratamento com diferentes ésteres de E2 simultaneamente ao tratamento com P4 leva à supressão das gonadotrofinas, regressão dos folículos em crescimento e emergência de uma nova onda folicular em 4 d após o tratamento com E2 (Bo *et al.*, 1993; Bo *et al.*, 1994; Bo *et al.*, 1995). Apesar dos protocolos de IATF baseados em E2/P4 serem largamente utilizados em *B. taurus* e *B. indicus* (Martinez *et al.*, 2000; Ayres *et al.*, 2008; Meneghetti *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2009; Sá Filho *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2013b; Monteiro Jr *et al.*, 2015b), o metabolismo de E2 é diferente entre *B. taurus* e *B. indicus* (Sartori *et al.*, 2016). Bastos *et al.* (2011) realizaram um estudo com delineamento quadrado latino 3 x 2 (2011), onde foi avaliado o efeito de diferentes doses de BE (1, 2 ou 4 mg) associado a um dispositivo intravaginal de P4, sobre a sincronização da emergência da onda folicular em vacas Nelores (n = 13) e Holandesas (n = 11) não lactantes que recebiam uma dieta de manutenção. O escore de condição corporal e o peso corporal foram mantidos em  $3,5 \pm 0,1$  e  $3,0 \pm 0,2$  (escala de 1 a 5), e  $535 \pm 14$  e  $600 \pm 23$  kg para vacas Nelores e Holandesas, respectivamente. Duas doses de prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ) foram administradas com intervalo de 11 d, e simultaneamente com a segunda PGF2 $\alpha$ , as vacas foram tratadas com BE e um dispositivo intravaginal de P4, que permaneceu por 10 d. As dinâmicas ovarianas foram monitoradas diariamente por meio de ultrassonografia durante os 10 d consecutivos ao tratamento com BE. Apenas vacas com emergência da onda folicular sincronizada pelo protocolo foram incluídas, ou seja, quando a emergência ocorreu entre 1 e 6 d após tratamento com BE + P4. Em resposta aos tratamentos, 2,5% (1/39) das vacas Nelores não apresentaram sincronização da emergência da onda folicular, sendo que esta única vaca foi tratada com 1 mg de BE. Para as vacas Holandesas, 15,1% (5/33) não apresentaram sincronização da emergência da onda folicular (três vacas receberam 1 mg e as outras duas, 2 ou 4 mg de BE). Independentemente da raça, houve um efeito dose-dependente do tratamento com BE nas seguintes variáveis:

dia da emergência da onda folicular, diâmetro do folículo dominante 9 d após o tratamento com BE, concentrações circulantes de E2 24 h após o tratamento com BE, tempo para início do aumento do FSH circulante (início do pico de FSH) após BE, e tempo de ocorrência do pico de FSH circulante (Tabela 2). A emergência da onda de crescimento folicular ocorreu  $3,1 \pm 0,3^a$ ,  $3,3 \pm 0,1^{ab}$  e  $3,9 \pm 0,2^b$  d após tratamento com 1, 2, ou 4 mg de BE, respectivamente ( $^{a,b}P \leq 0,05$ ), independentemente da raça, apesar das concentrações circulantes de E2 24 h após tratamento com BE terem sido muito maiores em vacas Nelores do que nas Holandesas (Tabela 2). O diâmetro do maior folículo 9 d após o tratamento foi  $12,2 \pm 0,5^a$ ,  $11,5 \pm 0,8^{ab}$  e  $9,9 \pm 0,7^b$  mm em vacas que receberam 1, 2 ou 4 mg de BE, respectivamente ( $^{a,b}P \leq 0,05$ ), mas não houve efeito da raça (Tabela 2). Na emergência da onda folicular, o número de folículos de 2 a 5 mm presente em vacas Nelores foi maior do que em Holandesas ( $30,8 \pm 4,5$  vs.  $13,6 \pm 1,1$  CFA; Tabela 2). Adicionalmente, o desvio follicular ocorreu em média  $3,0 \pm 0,2$  d após a emergência da onda, independentemente da raça, quando o diâmetro do maior folículo atingiu  $7,3 \pm 0,4$  e  $9,0 \pm 0,5$  mm em vacas Nelores e Holandesas, respectivamente ( $P < 0,05$ ). Concluiu-se que o tempo da emergência da onda folicular após tratamento com BE + P4 foi BE-dose dependente para ambas as raças.

Os resultados apresentados acima são, de certa forma, contraditórios, pois apesar de apresentarem uma taxa de metabolização de E2 muito diferentes (mesmas doses porém muito distintas concentrações de E2 circulante após tratamento com BE [ $> 2$  vezes] em vacas com pouca diferença de peso corporal – as Holandesas eram apenas 12% mais pesadas que as vacas Nelores), o comportamento da emergência da onda após tratamento com BE + P4 não foi diferente entre as raças (Tabela 2). Entretanto, com base nas diferenças de E2 circulante após tratamento com BE entre as raças, poderíamos esperar que doses de BE mais baixas deveriam ser utilizadas para Nelore e doses mais altas de BE para Holandês no início de um protocolo de IATF baseado em E2/P4 de forma a sincronizar a emergência da onda folicular. Em contraste, com base em respostas similares de ambas as raças em relação à emergência da onda folicular após tratamento com EB, uma dose similar de E2 pode ser considerada ótima tanto para vacas Nelores quanto para Holandesas.

Atualmente, tanto para *B. indicus* quanto *B. taurus*, a dose de BE recomendada para início do protocolo de IATF é 2 mg aplicados no mesmo momento do tratamento com P4/progestágeno. Entretanto, hipotetizando que a dose de 2 mg de BE seria insuficiente para efetivamente sincronizar a emergência da onda folicular em vacas leiteiras lactantes, Monteiro Jr *et al.* (2015a) compararam 2 vs. 3 mg de BE no início do protocolo de IATF. Todas as vacas foram tratadas com BE (2 ou 3 mg) no momento da introdução do dispositivo de P4 (d 0). No d 7, as vacas receberam 25 mg de PGF2 $\alpha$ ; no d 8, o dispositivo de P4 foi removido e as vacas receberam 1 mg de cipionato de estradiol (ECP). Todas as vacas foram submetidas a IATF no d 10. Diariamente foram realizadas avaliações dos ovários por ultrassonografia transretal. Não houve diferença ( $P > 0,10$ ) entre os tratamentos com 3 vs. 2 mg de BE para a proporção



de vacas que sincronizaram a emergência da onda folicular (71,4% [15/21] vs. 82,6% [19/23]), e tempo para a emergência da onda ( $3,6 \pm 0,19$  vs.  $3,4 \pm 0,17$  d). Entretanto, o tratamento com 3 mg de BE diminuiu a porcentagem de vacas com CL no d 7 do protocolo de IATF (19,8% [4/17] vs. 55,3% [13/21];  $P < 0,05$ ), indicando que uma dose mais alta de BE causou aumento da regressão de CL durante o protocolo.

Seguindo a mesma linha de raciocínio, Pessoa *et al.* (2015) realizaram um estudo em *B. taurus* e *B. indicus* de corte comparando 1 vs. 2 mg BE + P4 no início do protocolo de IATF. Eles compararam os tratamentos acima durante o protocolo de resincronização com início 22 d (d 22) após a primeira IATF e avaliaram P/IA, perda gestacional e indução da emergência de uma nova onda folicular em vacas de corte lactantes. Então, no d 22 após a primeira IATF todas as vacas receberam um dispositivo intravaginal de P4 e, independentemente do status gestacional, 1.426 vacas (768 *B. taurus* e 728 *B. indicus*) foram tratadas com 1 ou 2 mg de BE. Após 8 d (d 30), o dispositivo de P4 foi removido e o diagnóstico de gestação realizado por ultrassonografia. Vacas não gestantes foram então tratadas com PGF2 $\alpha$ . No mesmo dia, vacas *B. taurus* receberam 10 mg de FSH e 1 mg de BE, enquanto vacas *B. indicus* foram tratadas com 300 UI de eCG e 1 mg de ECP. A IATF foi realizada 44 h ou 48 h após remoção da P4 em *B. indicus* e *B. taurus*, respectivamente. O diagnóstico de gestação foi realizado aos 62 d após a primeira IATF (30 d após a segunda). A P/IA após a primeira IATF foi similar ( $\sim 44,0\%$ ;  $P = 0,85$ ) entre os tratamentos independentemente da raça, entretanto, a P/IA após a resincronização foi menor ( $P < 0,01$ ) em vacas tratadas com 1 mg quando comparadas àquelas tratadas com 2 mg de BE (36,1% vs. 47,3%). A perda gestacional entre 32 d e 62 d após a primeira IATF foi similar ( $P = 0,37$ ) entre os tratamentos (3,8% vs. 5,5% para 1 e 2 mg de BE), porém a prenhez acumulada foi maior ( $P = 0,01$ ) em vacas tratadas com 2 mg de BE (68,2%) do que aquelas tratadas com 1 mg de BE (62,8%). Adicionalmente, vacas *B. indicus* foram submetidas à avaliação da dinâmica ovariana por ultrassonografia para avaliar a indução da emergência de uma nova onda folicular após tratamento com 1 mg ( $n = 12$ ) vs. 2 mg ( $n = 12$ ) de BE. Apesar de não apresentar diferença ( $P = 0,13$ ) no intervalo entre o tratamento com BE e a emergência de nova onda folicular, a emergência da nova onda apresentou-se mais dispersa ( $P = 0,03$ ) em vacas tratadas com 1 mg de BE ( $1,8 \pm 1,3$  d) quando comparada àquelas tratadas com 2 mg de BE ( $2,3 \pm 0,6$  d). Portanto, a dose de 2 mg de BE produziu a emergência de uma onda folicular mais uniforme e uma maior P/IA após a resincronização, sem comprometer a gestação estabelecida à primeira IATF em vacas de corte *B. taurus* e *B. indicus* lactantes. Resultados preliminares de um estudo (Prata e Sartori, dados não publicados) que utiliza vacas Nelores, lactantes, no pós-parto seguiu uma tendência similar na P/IA para o tratamento com 1 vs. 2 mg de BE no início do protocolo de IATF (40,9% [36/88] vs. 47,2% [42/89];  $P = 0,40$ ) mas não apresentou valores diferentes (d 0: BE + P4; d 8: remoção P4, 0,6 mg ECP, 500  $\mu$ g cloprostenol, e 300 UI eCG; d 10: IATF).

### Função do corpo lúteo, luteólise, e crescimento e ovulação do folículo pré-ovulatório

Apesar de apresentar CL menor, vacas *B. indicus* apresentam maiores concentrações circulantes de P4, provavelmente devido à uma maior produção de P4 somada a uma menor taxa de metabolização, quando comparada a *B. taurus* (Sartori *et al.*, 2016). Além disso, dentro de uma mesma raça de *B. taurus*, vacas leiteiras lactantes apresentam menores concentrações de hormônios esteroides circulantes (Sartori *et al.*, 2002a; Sartori *et al.*, 2004) devido a maior taxa de metabolização associada com a maior ingestão de matéria seca (Sangsritavong *et al.*, 2002; Vasconcelos *et al.*, 2003).

Um dos primeiros estudos (Carvalho *et al.*, 2009) que sugeriu taxas de metabolização menores em *B. indicus* do que *B. taurus* foi conduzido utilizando 70 novilhas nulpáras de diferentes grupos genéticos [*B. indicus* (Nelore e Gir), *B. indicus* x *B. taurus* (Nelore x Angus e Gir x Holandês), *B. taurus* (Angus e Holandês)]. Dois tratamentos com PGF2 $\alpha$  foram realizados 24 e 12 d (d -24 e d -12) antes da inserção do implante de P4. No d 0, cada novilha recebeu um implante de P4, e 2 mg de BE. Adicionalmente, metade das novilhas de cada grupo genético recebeu 25 mg de PGF2 $\alpha$  no d 0. Um segundo tratamento com PGF foi realizado em todas as novilhas no momento da retirada do implante de P4 (d 8). No d 9, todas as novilhas receberam 1 mg de BE. Não houve diferença detectável nas concentrações de P4 no soro entre os grupos genéticos no d 0, mas as concentrações de P4 foram maiores no d 3 ( $P < 0,05$ ) em *B. indicus* ( $6,8 \pm 0,8$  ng/mL) e *B. indicus* x *B. taurus* ( $5,7 \pm 0,7$  ng/mL) do que em novilhas *B. taurus* ( $3,9 \pm 0,4$  ng/mL). A P4 circulante em novilhas *B. indicus* no d 6 ( $5,7 \pm 0,6^a$  vs.  $4,0 \pm 0,6^b$  vs.  $3,2 \pm 0,5^b$  ng/mL) e d 8 ( $5,3 \pm 0,7^a$  vs.  $3,3 \pm 0,4^b$  vs.  $3,0 \pm 0,5^b$  ng/mL) excedeu ( $^{a,b}P < 0,05$ ) aquelas de novilhas *B. indicus* x *B. taurus* ou *B. taurus*, respectivamente. Estes resultados foram corroborados por outros estudos (Nascimento *et al.*, 2002; Sartori *et al.*, 2016) delineados para comparar o perfil de P4 circulante em vacas Holandesas ( $n = 20$ ) e Nelores ( $n = 20$ ) não lactantes alimentadas com dieta de manutenção após a inserção de implantes intravaginais de P4. Nenhuma vaca tinha CL funcional no momento da inserção do implante. Houve efeito de raça ( $P < 0,05$ ) (1,2 vs. 2,2 ng/mL, Holandês e Nelore, respectivamente), no qual as concentrações de P4 foram aproximadamente 90% maiores em vacas Nelores do que em Holandesas, provavelmente devido a maior taxa de metabolização de P4 em Holandês (Figura 2A). Após remoção do implante de P4, coletou-se sangue a cada 40 minutos (0,65 horas) até 240 minutos, e uma concentração mais baixa de P4 foi observada em vacas Holandesas quando comparadas às Nelores (Figura 2B).

Tabela 2. Resultados (media dos quadrados mínimos  $\pm$  SEM) de variáveis reprodutivas de vacas Nelore (*B. indicus*) e Holstein (*B. taurus*) não lactantes tratadas com 1, 2, ou 4 mg de benzoato de estradiol (EB) e um implante intravaginal de progesterona.

	Raça						Valor de P		
	Nelore			Holstein					
	1 mg EB (n = 11)	2 mg EB (n = 12)	4 mg EB (n = 12)	1 mg EB (n = 11)	2 mg EB (n = 11)	4 mg EB (n = 11)	Raça	Dose	RxD
Emergência da onda após EB; d	3,1 ± 0,3 <sup>b</sup>	3,4 ± 0,2 <sup>ab</sup>	4,0 ± 0,2 <sup>a</sup>	3,0 ± 0,3 <sup>b</sup>	3,3 ± 0,3 <sup>b</sup>	3,9 ± 0,3 <sup>a</sup>	0,66	0,01	0,98
Contagem de folículos antrais na emergência; n	31,1 ± 5,8	32,4 ± 5,8	30,9 ± 5,8	11,8 ± 6,2	13,8 ± 6,1	14,1 ± 6,1	0,03	0,67	0,79
Diâmetro do maior folículo 9 após EB; mm	11,5 ± 0,9 <sup>a</sup>	11,5 ± 0,9 <sup>ab</sup>	9,8 ± 0,8 <sup>b</sup>	13,7 ± 1,2 <sup>a</sup>	11,4 ± 1,1 <sup>ab</sup>	10,4 ± 1,2 <sup>b</sup>	0,34	0,05	0,47
Taxa de crescimento do folículo dominante; mm/d	1,3 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,4 ± 0,2	0,03	0,22	0,95
Estradiol circulante 24 h após EB; pg/mL	57,0 ± 9,1 <sup>c</sup>	85,4 ± 9,5 <sup>b</sup>	148,1 ± 9,1 <sup>a</sup>	25,8 ± 12,0 <sup>c</sup>	42,3 ± 11,2 <sup>b</sup>	71,0 ± 11,9 <sup>a</sup>	< 0,01	<0,01	0,06
Máximo FSH circulante após EB, ng/mL	1,06 ± 0,06	1,07 ± 0,06	1,06 ± 0,06	1,30 ± 0,08	1,27 ± 0,08	1,10 ± 0,09	0,04	0,26	0,30
Início do pico de FSH após EB, h	57,8 ± 5,4 <sup>ab</sup>	53,3 ± 3,5 <sup>b</sup>	64,0 ± 3,2 <sup>a</sup>	46,0 ± 4,7 <sup>b</sup>	56,0 ± 4,4 <sup>ab</sup>	60,9 ± 4,0 <sup>a</sup>	0,26	0,04	0,30
Duração do pico de FSH após EB, h	78,0 ± 5,7 <sup>b</sup>	82,7 ± 6,3 <sup>b</sup>	110,0 ± 5,7 <sup>a</sup>	91,6 ± 7,5 <sup>b</sup>	90,1 ± 7,0 <sup>b</sup>	101,9 ± 7,5 <sup>a</sup>	0,46	< 0,01	0,25

<sup>a,b,c</sup> Efeito da dose dentro da raça (P < 0,05).

Foi demonstrado que concentrações séricas de LH durante o pico pré-ovulatório de LH natural (Randel, 1976; Randel and Moseley, 1977), induzido por E2 (Rhodes et al., 1978), ou por GnRH (Griffin e Randel, 1978) foram mais baixos em Brahman (*B. indicus*) do que em raças britânicas (*B. taurus*). Da mesma forma, como discutido por Bó et al. (2003), o padrão de secreção de gonadotrofinas no período pós-parto também diferiu entre *B. taurus* e *B. indicus*. Sob as mesmas condições, *B. taurus* (vacas Hereford × Shorthorn lactantes) apresentaram maiores concentrações plasmáticas de LH ( $0,7 \pm 0,1$  ng/mL) do que vacas Brahman lactantes ( $0,6 \pm 0,1$  ng/mL) 30 d após o parto e esta diferença parece aumentar com o tempo (D'Occhio et al., 1990). Adicionalmente, uma maior proporção de vacas *B. taurus* apresentou a secreção pulsátil de LH mais elevada do que *B. indicus* (D'Occhio et al., 1990). Neste estudo, as concentrações de LH também foram afetadas pela condição corporal e de manejo pós-parto (D'Occhio et al., 1990), sugerindo que nutrição é uma das maiores preocupações quando se avalia atividade pós-parto em *B. indicus* e *B. taurus*. Ainda, independentemente da raça, ou grupo genético, vacas lactantes com bezerro apresentaram

frequência de pulsos de LH mais baixa do que vacas lactantes sem bezerro (discutido em Stevenson e Lamb, 2016). Apesar disso, vacas Holandesas não-gestantes e lactantes apresentaram maior frequência de pulsos de LH do que vacas Holandesas não-gestantes e não-lactantes (Vasconcelos et al., 2003). Foi demonstrado que os pulsos de LH são essenciais para o crescimento do folículo dominante (Ginther et al., 1996). Concentrações de P4 circulantes parecem influenciar a frequência de pulsos de LH pois a P4 inibe o desenvolvimento do folículo dominante de maneira dose-dependente (Adams et al., 1992; Santos et al., 2016). Entretanto, vacas com elevadas concentrações circulantes de P4, vacas recém-paridas, ou vacas sob restrição nutricional podem apresentar desenvolvimento reduzido do folículo dominante/pré-ovulatório potencialmente levando à redução da probabilidade de ovulação e tamanho reduzido do folículo ovulatório, o que pode comprometer a fertilidade sob estas circunstâncias. Estes problemas podem acontecer com maior frequência em *B. indicus* devido a vários fatores, como os descritos acima.

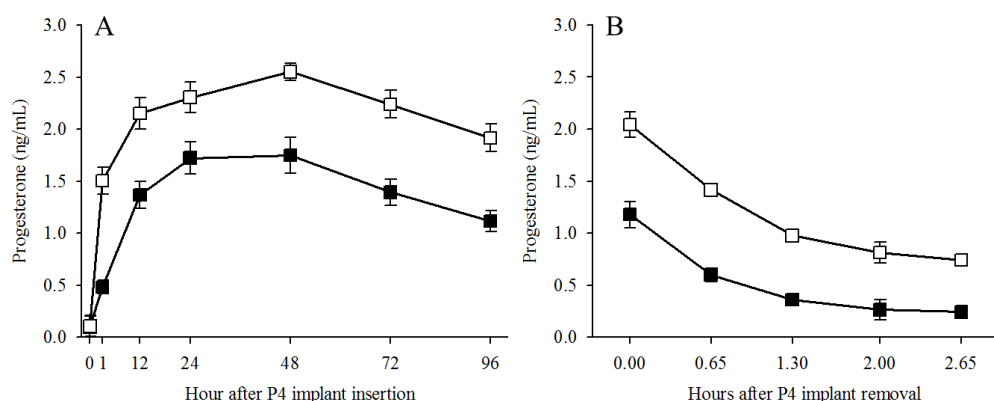


Figura 2. Concentrações de progesterona (P4) circulante (medias dos quadrados mínimos  $\pm$  erro padrão) de vacas Holstein ( $n = 20$ ; ■) e Nelore ( $n = 20$ ; □) não lactantes alimentadas com uma dieta de manutenção. (A) Sangue foi coletado antes (0 horas), e 1, 6, 12, 24, e 48 horas após inserção do implante de P4. Houve efeitos da raça e do dia ( $P \leq 0,05$ ). (B) Sangue foi coletado imediatamente antes (0 horas) e 0,65, 1,30, 2,00, e 2,65 horas após a remoção do implante de P4. Houve efeitos da raça e do dia ( $P \leq 0,05$ ; De Sartori et al., 2016).

A importância das concentrações circulantes de P4 durante o desenvolvimento do folículo pré-ovulatório sobre a ovulação e a fertilidade em vacas foi discutido por vários autores (Carvalho et al., 2008; Wiltbank et al., 2006; Santos et al., 2016; Stevenson e Lamb, 2016). A idéia geral é que devido à alta frequência de pulsos de LH e baixa P4 circulante (fisiologicamente) em virtude do elevado metabolismo de hormônios esteróides, vacas leiteiras lactantes ovulam folículos maiores, e apresentam alta incidência de ovulações duplas, entretanto a qualidade do oócito e do embrião pode estar comprometida (Sartori et al., 2002b; Wiltbank et al., 2006; Wiltbank et al., 2014; Santos et al., 2016). Em gado de corte (*B. taurus*), Stevenson e Lamb (2016) relataram pouco efeito do ambiente de P4

durante o desenvolvimento do folículo pré-ovulatório sobre o risco de gestação. Adicionalmente, novilhas Holandesas que receberam PGF2 $\alpha$  no início do protocolo com Cosynch + CIDR, e portanto, apresentaram concentrações circulantes de P4 mais baixa durante o protocolo, apresentaram folículos ovulatórios maiores, e tiveram P/IA similar às novilhas que não receberam PGF2 $\alpha$  no início do protocolo (Stevenson et al., 2008). Em contraste, estudos em novilhas ou vacas não-lactantes *B. indicus* indicaram que altas concentrações circulantes de P4 durante protocolos de sincronização da ovulação reduziu o crescimento do folículo dominante, o que afetou negativamente a taxa de ovulação e o sucesso da gestação (Carvalho et al., 2008; Dias et al., 2009; Peres et al., 2009).

Os resultados apresentados acima podem explicar as diferenças contrastantes em relação aos efeitos da gonadotrofina coriônica equina (eCG) no final do protocolo de IATF sobre o desenvolvimento final do folículo e ovulação entre *B. indicus* e *B. taurus*. Enquanto em *B. indicus*, a maioria dos estudos relatou um efeito positivo da eCG na porcentagem de novilhas e vacas que ovularam ao final do protocolo, nas concentrações circulantes de P4 durante o diestro subsequente, e no aumento da P/IA (Baruselli *et al.*, 2004; Peres *et al.*, 2009; Sá Filho *et al.*, 2009; Sá Filho *et al.*, 2010a; Sá Filho *et al.*, 2010b; Lemes *et al.*, 2011; Sales *et al.*, 2011), dados em *B. taurus* são conflitantes e, apesar de alguns estudos em vacas de corte terem mostrado aumento da taxa de ovulação e fertilidade pela adição de eCG ao protocolo de IATF (Pessoa *et al.*, 2016), muitos estudos demonstraram pouco ou nenhum benefício da eCG, especialmente em vacas Holandesas lactantes (Small *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2013; Puley *et al.*, 2013).

Em relação à luteólise induzida por tratamento exógeno, a resposta do CL à PGF2 $\alpha$  parece muito semelhante entre *B. indicus* e *B. taurus*. Para estudar o efeito da dose do análogo de PGF2 $\alpha$  e dia do ciclo estral no momento do tratamento, Ferraz Jr *et al.* (2016) realizaram um experimento com vacas Nelores não lactantes, com delineamento fatorial 3 x 2, no qual três doses de dinoprost trometamina (12,5, 25, e 50 mg) foram utilizadas nos dias 5 ou 7 do ciclo estral. Neste estudo a luteólise foi dose-dependente. Entretanto, aumentando-se a dose de PGF2 $\alpha$ , aumentou a proporção de vacas detectadas em estro e também a porcentagem de vacas com P4 circulante < 1,0 ng/mL 72 h após o tratamento. Resultados similares foram relatados por Nascimento *et al.* (2014), que concluíram que a luteólise completa não ocorreu em vacas Holandesas não lactantes no d 5 do ciclo estral com uma dose completa de PGF2 $\alpha$  (25 mg de dinoprost trometamina), duas doses completas com intervalo de 8 horas, ou uma dose dupla (50 mg). Giordano *et al.* (2013) avaliaram se o aumento da dose de PGF2 $\alpha$  (cloprostenol) durante o segundo Ovsynch do protocolo Ovsynch duplo poderia aumentar as taxas de ovulação e luteólise e portanto aumentar a P/IA. Os autores observaram uma melhor resposta luteolítica à PGF2 $\alpha$  (% de vacas com regressão completa do CL) quando a dose foi aumentada de 500  $\mu$ g para 750  $\mu$ g vacas Holandesas lactantes (84,3 vs. 90,8%; P = 0,03). O aumento da dose de cloprostenol aumentou a regressão luteal primariamente nas vacas múltiparas, e aumentou a fertilidade (P = 0,05) apenas aos 39 dias após IATF.

Em adição à dose de PGF2 $\alpha$ , também está estabelecido que o dia do ciclo estral afeta a proporção de vacas em luteólise após tratamento com PGF2 $\alpha$  (dinoprost trometamina). Ferraz Jr *et al.* (2016) observaram que vacas Nelores que apresentavam CL no d 5 do ciclo estral eram mais refratárias à PGF2 $\alpha$  do que aquelas que estavam no d 7 do ciclo. Em vacas Holandesas lactantes, um segundo tratamento com dinoprost trometamina (+PGF2 $\alpha$ ; 24 h de intervalo) aumentou a porcentagem de vacas que apresentaram luteólise completa (95,6%) comparado às vacas controles (84,6%). Apesar de um estudo não ter encontrado efeito da adição de uma dose de PGF2 $\alpha$  na P/IA

(controle = 41,5% vs. +PGF2 $\alpha$  = 44,7%; P = 0,34; Brusveen *et al.*, 2009), estudos recentes relataram melhoras significativas na P/IA quando é administrada uma segunda dose de PGF2 $\alpha$ , particularmente em vacas múltiparas (Carvalho *et al.*, 2015; Wiltbank *et al.*, 2015). Portanto, luteólise completa é essencial para otimizar a ovulação e a fertilidade de um protocolo de IATF. De fato, uma maior proporção de vacas Holandesas lactantes com concentrações circulantes de P4 < 0,1 ng/mL, comparadas àquelas em que as concentrações circulantes de P4 estavam  $\geq$  0,1 e < 0,22 ng/mL no momento da IA, ovularam ao protocolo de IATF baseado em E2/P4 (81,2 vs. 58,0%), e apresentaram aumento em P/IA (47,4 vs. 21,4%; Monteiro Jr *et al.*, 2015). Resultados similares foram observados por Pereira *et al.* (2013b) quando vacas leiteiras lactantes foram sincronizadas com protocolo baseado em E2/P4, e foram inseminadas ou utilizadas como receptoras de embrião. A concentração de P4 no momento da IA ou 7 d antes da transferência de embrião (TE) alterou a fertilidade de vacas submetidas a IATF, com aumento da P/IA em vacas com concentrações circulantes de P4 < 0,1 ng/mL comparadas àquelas em que as concentrações estavam  $\geq$  0,1 ng/mL. Já, nas vacas que receberam embrião, foi observada maior P/TE em vacas com P4 < 0,22 ng/mL quando comparadas àquelas com P4  $\geq$  0,22 ng/mL.

#### **Implicações práticas das diferenças fisiológicas entre *B. indicus* e *B. taurus* para a produção de embriões**

As diferenças fisiológicas entre *B. indicus* e *B. taurus* descritas acima, necessitam ser consideradas quando do manejo das fêmeas para MOET ou PIV.

Um dos protocolos mais utilizados em vacas e novilhas *B. indicus* para MOET foi desenvolvido por Barros e Nogueira (2005) e foi denominado P-36. O protocolo inclui a inserção de um implante intravaginal de P4 por 36 h após administração de PGF2 $\alpha$  e indução da ovulação com LH exógeno, administrado 12 h após a remoção do dispositivo de P4 (48 h após administração de PGF2 $\alpha$ ). Sendo a IATF realizada 12 e 24 h após a administração de LH, uma vez que a ovulação ocorre entre 24 e 36 h após administração do mesmo. A efetividade do protocolo P-36 foi confirmada (Baruselli *et al.*, 2006; Nogueira *et al.*, 2007). Uma variação do protocolo P-36 na qual o implante de P4 é removido 24 h após PGF2 $\alpha$  (protocolo P-24) e o LH é administrado 24 h após (48 h depois da PGF2 $\alpha$ ), foi utilizado em fêmeas Nelores, aparentemente com resultados similares aos obtidos com o protocolo P-36 (Baruselli *et al.*, 2006).

O uso do protocolo P-36 em raças *B. taurus*, entretanto, resultou em diminuição do número de embriões viáveis em comparação com protocolos convencionais de detecção de estro. Em doadoras Holandesas (Baruselli *et al.*, 2006) e Angus (Bó *et al.*, 2006), a produção de embriões viáveis foi aumentada com o protocolo P-36 quando o indutor de ovulação (LH ou GnRH) foi administrado 60 h (P-36/LH60), ao invés de 48 h (P-36/LH48) após a aplicação de PGF2 $\alpha$ . Por outro lado, apesar da ovulação ser atrasada em 12 h no protocolo P-36 em raças *B. taurus* (protocolo P-36/LH60) houve um efeito positivo na produção de embriões, e o contrário ocorreu quando se utilizou o mesmo

protocolo em *B. indicus*. O protocolo P-36/LH60 causou uma diminuição na produção de embriões quando comparado ao protocolo P-36/LH48 (Baruselli *et al.*, 2006). Portanto, pode ser inferido que a ovulação em protocolos de superestimulação deva ser induzida antes em doadoras *B. indicus*; enquanto que em doadoras *B. taurus*, é necessário retardar o tratamento com um indutor de ovulação para permitir um aumento do tamanho folicular e aquisição dos receptores para LH.

Raças *B. indicus* apresentam uma capacidade reduzida para secreção de LH e uma sensibilidade aumentada às gonadotrofinas exógenas do que *B. taurus* (Randel, 1984). A resposta superovulatória foi avaliada em vacas Nelores submetidas a três doses de Folltropin-V (100, 133 ou 200 mg) em um delineamento crossover. Não houve diferença significativa em nenhuma das variáveis avaliadas, indicando ser possível diminuir a dose de FSH para 100 mg em vacas Nelores submetidas a protocolo de superestimulação para IATF, sem comprometer a resposta superovulatória e a produção de embrião (Baruselli *et al.*, 2006). Outros estudos em novilhas Nelores induziram com sucesso a superovulação e a produção de embriões utilizando uma dose menor de FSH (70 mg; Guardieiro *et al.*, 2014), o que é muito improvável de ser efetiva em *B. taurus*.

Especialmente devido à maior CFA e melhor qualidade de oócito em *B. indicus* em relação a *B. taurus*, PIV alcança muito mais sucesso em *B. indicus*. Por exemplo, Gir (*B. indicus*), Holandês e fêmeas cruzadas (1/4 Holandês x 3/4 Gir ou 1/2 Holandês-Gir) forma comparadas em relação ao número total de oócitos viáveis e PIV de embriões (Pontes *et al.*, 2010). O número total de oócitos aspirados, de oócitos viáveis e de embriões produzidos foi maior em vacas Gir do que Holandês (17,1 vs. 11,4; 12,1 vs. 8,0; 3,2 vs. 2,2, respectivamente). Além disso, a produção de embriões (5,5 blastocistos) foi ainda maior em vacas Girolando comparadas às outras raças. Outro estudo foi conduzido para comparar PIV em novilhas Nelores e Holandesas (Gimenes *et al.*, 2015). Mais oócitos foram recuperados (37,1 vs. 15,4), mais embriões foram produzidos (7,3 vs. 1,1), e uma taxa maior de blastocisto foi obtida (28,3 vs. 14,1%) em novilhas Nelores do que em Holandesas. Em outro estudo (Sales *et al.*, 2015), vacas Gir tiveram um maior número de oócitos recuperados por ovum pickup (OPU; 23,4 vs. 14,9), melhor qualidade de oócitos, demonstrado pela maior taxa de clivagem (73,6 vs. 40,8%), maior número de blastocistos (3,8 vs. 0,7) e melhor taxa de blastocisto (36,7 vs. 12,1%) do que doadoras Holandesas.

De maneira geral, os principais resultados descritos acima indicam que *B. taurus* tem menos oócitos e produz menos blastocistos por OPU do que doadoras *B. indicus*. Este padrão parece se repetir mesmo quando outras raças *B. taurus* são estudadas. Sudano *et al.* (2014) conduziram um experimento no qual vacas não lactantes Simental (*B. taurus*) e Nelore foram comparadas para produção de embriões in vivo e in vitro. Apesar do número total de oócitos/embriões recuperados por vaca (5,5 vs. 3,7) e do número de embriões transferíveis produzidos a partir de MOET por vaca não ser diferente entre Nelore e Simental (3,8 vs. 2,3, respectivamente), quando foi realizada a PIV, vacas Nelores produziram mais oócitos por OPU (14,9 vs.

8,1) e apresentaram maior taxa de blastocisto por OPU (41,5 vs. 23,4%) do que vacas Simental. O impacto potencial dos hormônios metabólicos ou esteroides, associados ou não com diferentes regimes de ingestão de dieta sobre a produção de embriões em *B. indicus* e *B. taurus*, foi discutido em maiores detalhes por Sartori *et al.* (2016).

### Considerações Finais

*Bos indicus* e *B. taurus* tem sido utilizados principalmente para produção de leite e carne ao redor do mundo. Apesar de, geralmente, *B. taurus* ter sido mais intensamente selecionado para produção, a melhor adaptação aos ambientes tropicais e subtropicais faz com que o *B. indicus* e seus cruzamentos sejam opções adequadas para a produção. Além disso, existem diferenças significativas na fisiologia reprodutiva entre estes grupos genéticos que afetam a aplicação de ferramentas adequadas para o manejo reprodutivo. Por exemplo, *B. taurus* em geral alcança a puberdade mais cedo (Sartori *et al.*, 2010a) e apresenta uma duração de gestação mais curta comparado ao *B. indicus* (Paschal *et al.*, 1991). Portanto, para alcançar um intervalo de partos de 12 meses, vacas *B. indicus* devem conceber 10 d antes que *B. taurus*. Diferenças no comportamento de estro e funções ovarianas também implicam em ajustes para o manejo reprodutivo. Devido a maior sensibilidade ao feedback negativo dos hormônios esteroides sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário torna necessária, algumas vezes, uma redução da dose de tratamento hormonal em *B. indicus*. Por outro lado, devido à maior taxa de metabolização de hormônios esteroides, especialmente em vacas lactantes *B. taurus* leiteiras, doses maiores dos hormônios podem ser necessárias para otimizar estratégias de manejo reprodutivo. Em relação à produção de embriões, a maior CFA, maior qualidade de oócito, e maior sensibilidade às gonadotrofinas em *B. indicus*, torna a produção de embriões muito mais factível do que em *B. taurus*.

### Agradecimentos

Nós agradecemos a todos os estudantes, instituições e empresas que colaboraram com nossa pesquisa, bem como às agências de financiamento FAPESP, CNPq e CAPES.

### Referências

- Alvarez P, Spicer LJ, Chase CC, Payton ME, Hamilton TD, Stewart RE, Hammond AC, Olson TA, Wettemann RP. 2000. Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. *J Anim Sci*, 78:1291-1302.
- Ayres H, Martins CM, Ferreira RM, Mello JE, Dominguez JH, Souza AH, Valentin R, Santos ICC, Baruselli PS. 2008. Effect of timing of estradiol benzoate administration upon synchronization of ovulation in suckling Nelore cows (*Bos indicus*) treated with a

progesterone-releasing intravaginal device. *Anim Reprod Sci*, 109:77-87.

**Baldrighi JM, Sa Filho MF, Batista EOS, Lopes RNV, Visintin JA, Baruselli PS, Assumpção MEO.** 2014. Anti-mullerian hormone concentration and antral ovarian follicle population in Murrah heifers compared to Holstein and Gyr kept under the same management. *Reprod Dom Anim*, 49:1015-1020.

**Barros CM, Nogueira MFG.** 2005. Superovulation in zebu cattle: protocol P-36. *Embryo Transfer Newsletter*, 23:5-9.

**Baruselli PS, de Sá Filho MF, Martins CM, Nasser LF, Nogueira MFG, Barros CM, Bo GA.** 2006. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*, 65:77-88.

**Baruselli PS, Reis EL, Marques MO, Nasser LF, Bó GA.** 2004. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. *Anim Reprod Sci*, 82-83:479-486.

**Bastos MR, Mattos MCC, Meschiatti MAP, Surjus RS, Guardieiro MM, Ferreira JCP, Mourao GB, Pires AV, Biehl MV, Pedroso AM, Santos FAP, Sartori R.** 2010. Ovarian function and circulating hormones in nonlactating Nelore versus Holstein cows. *Acta Sci Vet*, 38 (Suppl. 2):776. (abstract).

**Bastos MR, Surjus RS, Prata AB, Meschiatti MAP, Borsato M, Mourão GB, Pedroso AM, Pires AV, Sartori R.** 2011. Dose effect of estradiol benzoate associated with progesterone on the synchronization of follicular wave emergence in *Bos indicus* and *Bos taurus* cows. *Acta Sci Vet*, 39(Suppl. 1):315. (abstract).

**Batista EOS, Macedo GG, Sala RV, Ortolan MDDV, Sa Filho MF, Del Valle TA, Jesus EF, Lopes RNV, Renno FP, Baruselli PS.** 2014. Plasma antimullerian hormone as a predictor of ovarian antral follicular population in *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein) heifers. *Reprod Dom Anim*, 49:448-452.

**Biehl MV, Pires AV, Ferraz Junior MVC, Nepomuceno DD, Ferreira EM, Gentil RS, Cruppe LH, Day ML.** 2013. Reproductive performance of *Bos indicus* heifers with reduced serum progesterone concentration at the onset of a 5-d Co-Synch + CIDR program. *J Anim Sci*, 91(E-Suppl. 2):353. (abstract).

**Binelli M, Sartori R, Vasconcelos JLM, Pereira MHC, Monteiro Jr PLJ, Ramos RS.** 2014. Evolution in fixed-time: from synchronization of ovulation to improved fertility. p.493-506 in *Reproduction in Domestic Ruminants VIII*. Vol. 1. 1st ed. J. L. Juengel, A. Miyamoto, C. Price, L. P. Reynolds, M. F. Smith, and R. Webb, ed. Context, Ashby de la Zouch, UK.

**Bo GA, Adams GP, Caccia M, Martinez M, Pierson RA, Mapletoft RJ.** 1995. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Anim Reprod Sci*, 39:193-204.

**Bo GA, Adams GP, Nasser LF, Pierson RA, Mapletoft R J.** 1993. Effect of estradiol valerate on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating gonadotropins in heifers. *Theriogenology*, 40:225-239.

**Bo GA, Adams GP, Pierson RA, Tribulo HE, Caccia M, Mapletoft R.** 1994. Follicular wave dynamics

after estradiol-17-beta treatment of heifers with or without a progestogen implant. *Theriogenology*, 41:1555-1569.

**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, Baruselli PS, Martínez, MF.** 2003. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Anim Reprod Sci*, 78:307-326.

**Bridges GA, Helser LA, Grum DE, Mussard ML, Gasser CL, Day ML.** 2008. Decreasing the interval between GnRH to PGF2 $\alpha$  from 7 to 5 days and lengthening proestrus increases timed-AI pregnancy rates in beef cows. *Theriogenology*, 69:843-851.

**Brusveen DJ, Souza AH, Wiltbank MC.** 2009. Effects of additional prostaglandin F-2 alpha and estradiol-17 beta during Ovsynch in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, 92:1412-1422.

**Carvalho JBP, Carvalho NAT, Reis EL, Nichi M, Souza AH, Baruselli PS.** 2008. Effect of early luteolysis in progesterone-based AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus* and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology*, 69:167-175.

**Carvalho PD, Fuenzalida MJ, Ricci A, Souza AH, Barletta RV, Wiltbank MC, Fricke PM.** 2015. Modifications to Ovsynch improve fertility during resynchronization: Evaluation of presynchronization with gonadotropin-releasing hormone 6 d before initiation of Ovsynch and addition of a second prostaglandin F2 $\alpha$  treatment. *J Dairy Sci*, 98:8741-8752.

**Cerri RLA, Rutigliano HM, Chebel RC, Santos JEP.** 2009. Period of dominance of the ovulatory follicle influences embryo quality in lactating dairy cows. *Reproduction*, 137:813-823.

**Chenault JR, Kratzer DD, Rzepkowski RA, Goodwin MC.** 1990. LH and FSH response of Holstein heifers to fertirelin acetate, gonadorelin and buserelin. *Theriogenology*, 34:81-98.

**Colazo MG, Kastelic JP, Davis H, Rutledge MD, Martinez MF, Small JA, Mapletoft RJ.** 2008. Effects of plasma progesterone concentrations on LH release and ovulation in beef cattle given GnRH. *Domest Anim Endocrinol*, 34:109-117.

**Dias CC, Wechsler FS, Day ML, Vasconcelos JLM.** 2009. Progesterone concentrations, exogenous equine chorionic gonadotropin, and timing of prostaglandin F2 $\alpha$  treatment affect fertility in postpubertal Nelore heifers. *Theriogenology*, 72:378-385.

**Dias HP, Albuquerque JP, Castilho ACS, Vasconcelos JLM.** 2004. High progesterone concentration has a negative effect on the expression of LH receptors in granulosa cells from Nelore heifers. *Anim Reprod*, 11:366. (abstract).

**D'Occhio MJ, Neish A, Broadhurst L.** 1990. Differences in gonadotrophin secretion postpartum between Zebu and European breed cattle. *Anim Reprod Sci*, 22:311-317.

**Fernandes P, Teixeira AB, Crocci AJ, Barros CM.** 2001. Timed artificial insemination in beef cattle using GnRH agonist, PGF2alpha and estradiol benzoate. *Theriogenology*, 55:1521-1532.

**Ferraz Junior MVC, Pires AV, Biehl MV, Santos MH, Barroso JPR, Gonçalves JR, Sartori R, Day ML.** 2016. Comparison of two different timed AI system schemes to synchronize estrus and ovulation in Nelore cattle. *Theriogenology*, in press.

**Ferreira RM, Ayres H, Sales JN, Souza AH, Rodrigues CA, Baruselli PS.** 2013. Effect of different doses of equine chorionic gonadotropin on follicular and luteal dynamics and P/AI of high-producing Holstein cows. *Anim Reprod Sci*, 140:26-33.

**Figueiredo RA, Barros CM, Pinheiro OL, Soler JM.** 1997. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. *Theriogenology*, 47:1489-1505.

**Fricke PM, Carvalho PD, Giordano JO, Valenza A, Lopes G Jr, Amundson MC.** 2014. Expression and detection of estrus in dairy cows: the role of new technologies. *Animal*, 8:134-143.

**Gandra JR, Freitas JE, Barletta RV, Maturana M, Gimenes LU, Vilela FG, Baruselli PS, Renno FP.** 2011. Productive performance, nutrient digestion and metabolism of Holstein (*Bos taurus*) and Nelore (*Bos taurus indicus*) cattle and Mediterranean buffaloes (*Bubalis bubalis*) fed with corn-silage based diets. *Livest Sci*, 140:283-291.

**Gimenes LU, Ferraz ML, Fantinato-Neto P, Chiaratti MR, Mesquita LG, Sa Filho MF, Meirelles FV, Trinca LA, Renno FP, Watanabe YF, Baruselli PS.** 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*, 83:385-393.

**Gimenes LU, Sa MF, Carvalho NAT, Torres JRS, Souza AH, Madureira EH, Trinca LA, Sartorelli ES, Barros CM, Carvalho JBP, Mapletoft RJ, Baruselli PS.** 2008. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. *Theriogenology*, 69:852-858.

**Ginther OJ, Kastelic JP, Knopf L.** 1989. Intraovarian relationships among dominant and subordinate follicles and the corpus luteum in heifers. *Theriogenology*, 32:787-795.

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

**Giordano JO, Fricke PM, Guenther JN, Lopes Jr G, Herlihy MM, Nascimento AB, Wiltbank MC.** 2012. Effect of progesterone on magnitude of the luteinizing hormone surge induced by two different doses of gonadotropin-releasing hormone in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, 95:3781-3793.

**Giordano JO, Wiltbank MC, Fricke PM, Bas S, Pawlisch R, Guenther JN, Nascimento AB.** 2013. Effect of increasing GnRH and PGF(2 alpha) dose during Double-Ovsynch on ovulatory response, luteal regression, and fertility of lactating dairy cows. *Theriogenology*, 80:773-783.

**Griffin JL, Randel RD.** 1978. Reproductive studies of Brahman cattle. II. Luteinizing hormone patterns in ovariectomized Brahman and Hereford cows before and

after injection of gonadotropin releasing hormone. *Theriogenology*, 9:437-446.

**Guardieiro MM, Machado GM, Bastos MR, Mourão GB, Carrijo LH, Dode MA, Leroy JL, Sartori R.** 2014. A diet enriched in linoleic acid compromises the cryotolerance of embryos from superovulated beef heifers. *Reprod Fertil Dev*, 26(4):511-520.

**Gumen A, Guenther JN, Wiltbank MC.** 2003. Follicular size and response to Ovsynch versus detection of estrus in anovular and ovular lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, 86:3184-3194.

**Herlihy MM, Giordano JO, Souza AH, Ayres H, Ferreira RM, Keskin A, Nascimento AB, Guenther JN, Gaska JM, Kacuba SJ, Crowe MA, Butler ST, Wiltbank MC.** 2012. Presynchronization with Double-Ovsynch improves fertility at first postpartum artificial insemination in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, 95:7003-7014.

**Lemes AP, Rodrigues ADP, Peres RFG, Graff, HB, Carvalho ER, Souza AH, Sartori R.** 2011. Concepção em vacas Nelore pós-parto tratadas com eCG antes e/ou após inseminação artificial em tempo fixo. 2010. *Acta Sci Vet*, 39(Suppl. 1):381. (abstract).

**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.

**Martinez MF, Adams GP, Bergfelt DR, Kastelic JP, Mapletoft RJ.** 1999. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in beef heifers. *Anim Reprod Sci*, 57:23-33.

**Martinez MF, Adams GP, Kastelic JP, Bergfelt DR, Mapletoft RJ.** 2000. Induction of follicular wave emergence for estrus synchronization and artificial insemination in heifers. *Theriogenology*, 54:757-769.

**Melo LF, Monteiro Jr PLJ, Surjus RS, Drum JN, Wiltbank MC, Sartori R.** 2016. Progesterone-based fixed-time artificial insemination protocols for dairy cows: GnRH vs. estradiol benzoate at initiation and estradiol cypionate vs. estradiol benzoate at the end. *J Dairy Sci*, in press.

**Meneghetti M, Sá Filho OG, Peres RF, Lamb GC, Vasconcelos JL.** 2009. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I: basis for development of protocols. *Theriogenology*, 72(2):179-189.

**Monteiro Jr PLJ, Borsato M, Silva FLM, Prata AB, Wiltbank MC, Sartori R.** 2015a. Increasing estradiol benzoate, pretreatment with gonadotropin-releasing hormone, and impediments for successful estradiol-based fixed-time artificial insemination protocols in dairy cattle. *J Dairy Sci*, 98:3826-3839.

**Monteiro Jr PLJ, Nascimento AB, Pontes GCS, Fernandes GO, Melo LF, Wiltbank MC, Sartori R.** 2015b. Progesterone supplementation after ovulation: Effects on corpus luteum function and on fertility of dairy cows subjected to AI or ET. *Theriogenology*, 84:1215-1224.

**Nascimento AB, Monteiro Jr PLJ, Silva FLM, Guardieiro MM, Prata AB, Nogueir GP, Mourão GB, Wiltbank MC, Pires AV, Sartori R.** 2012. Serum progesterone concentrations in Holstein and Nelore cows

after the insertion of two different progesterone devices. *J Dairy Sci*, 95(Suppl. 2):326. (abstract).

**Nogueira MFG, Fragnito PS, Trinca LA, Barros CM.** 2007. The effect of type of vaginal insert and dose of pLH on embryo production, following fixed-time AI in a progestin-based superstimulatory protocol in Nelore cattle. *Theriogenology*, 67:655-660.

**Paschal JC, Sanders JO, Kerr JL.** 1991. Calving and weaning characteristics of Angus-, Gray Brahman-, Gir-, Indu-Brazil-, Nellore-, and Red Brahman-sired F1 calves. *J Anim Sci*, 69:2395-2402.

**Pereira M H C, Rodrigues ADP, Martins T, Oliveira WVC, Silveira PSA, Wiltbank MC, Vasconcelos JLM.** 2013a. Timed artificial insemination programs during the summer in lactating dairy cows: Comparison of the 5-d Cosynch protocol with an estrogen/progesterone-based protocol. *J Dairy Sci*, 96:6904-6914.

**Pereira MHC, Sanches CP, Guida TG, Rodrigues ADP, Aragon FL, Veras MB, Borges PT, Wiltbank MC, Vasconcelos JLM.** 2013b. Timing of prostaglandin F-2 alpha treatment in an estrogen-based protocol for timed artificial insemination or timed embryo transfer in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, 96:2837-2846.

**Peres RFG, Claro Júnior I, Sá Filho OG, Nogueira GP, Vasconcelos JLM.** 2009. Strategies to improve fertility in *Bos indicus* postpubertal heifers and nonlactating cows submitted to fixed-time artificial insemination. *Theriogenology*, 72:681-689.

**Perry GA, Perry BL.** 2009. Effect of the timing of controlled internal drug-releasing device insertion on the gonadotropin-releasing hormone-induced luteinizing hormone surge and ovulatory response. *J Anim Sci*, 87:3983-3990.

**Pessoa GA, Martini AP, Carloto GW, Rodrigues MCC, Claro Junior I, Baruselli PS, Brauner CC, Rubin MIB., Correa MN, Leivas FG, Sá Filho MF.** 2016. Different doses of equine chorionic gonadotropin on ovarian follicular growth and pregnancy rate of suckled *Bos taurus* beef cows subjected to timed artificial insemination protocol. *Theriogenology*, 85:792-799.

**Pessoa GA, Martini AP, Chaiben MFC, Vieira LM, Girotto RW, Pugliesi G, Santin T, Rubin MIB, Baruselli PS, Sá Filho MF.** 2015. Adjustment of the estradiol benzoate dose in the resynchronization protocol with unknown pregnancy status in suckled beef cows. *Anim Reprod*, 12:610. (abstract).

**Picard-Hagen N, Lhermie G, Florentin S, Merle D, Frein P, Gayrard V.** 2015. Effect of gonadorelin, lecinrelin, and buserelin on LH surge, ovulation, and progesterone in cattle. *Theriogenology*, 84:177-183.

**Pinheiro OL, Barros CM, Figueiredo RA, Valle ER, Encarnação RO, Padovani CR.** 1998. Estrus behavior and the estrus to ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F2alpha or norgestomet and estradiol valerate. *Theriogenology*, 49:667-681.

**Pontes JH, Silva KC, Basso AC, Rigo AG, Ferreira CR, Santos GM, Sanches BV, Porcionato JP, Vieira PH, Faifer FS, Sterza FA, Schenk JL, Seneda MM.** 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.

**Pulley SL, Wallace LD, Mellicon Jr HI, Stevenson JS.** 2013. Ovarian characteristics, serum concentrations of progesterone and estradiol, and fertility in lactating dairy cows in response to equine chorionic gonadotropin. *Theriogenology*, 79:127-134.

**Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC.** 1995. Synchronization of ovulation in dairy-cows using PGF(2-alpha), and GnRH. *Theriogenology*, 44:915-923.

**Pursley JR, Wiltbank MC, Stevenson JS, Ottobre JS, Garverick HA, Anderson LL.** 1997. Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. *J Dairy Sci*, 80:295-300.

**Randel RD.** 1976. LH and ovulation in Brahman, Brahman x Hereford and Hereford heifers. *Journal of Animal Science* 43 300. (abstract).

**Randel RD, Moseley WM.** 1977. Serum luteinizing hormone surge and progesterone near estrus in Brahman, Brahman x Hereford and Hereford heifers. *J Anim Sci*, 45:199. (abstract).

**Rhodes FM, De'ath G, Entwistle KW.** 1995. Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. *Anim Reprod Sci*, 38:265-277.

**Rhodes III RC, Randel RD, Harms PG.** 1978. Reproductive studies of Brahman cattle. IV. Luteinizing hormone levels in ovariectomized in Brahman, Brahman x Hereford and Hereford cows following a 20 mg dose of estradiol-17. *Theriogenology*, 10:429-437.

**Ribeiro ES, Galvão KN, Thatcher WW, Santos JEP.** 2012. Economics aspects of applying reproductive technologies to dairy herds. *Anim Reprod*, 9:370-387.

**Sá Filho MF, Ayres H, Ferreira RM, Marques MO, Reis EL, Silva RCP, Rodrigues CA, Madureira EH, Bó GA, Baruselli PS.** 2010a. Equine chronic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone enhance fertility in a norgestomet-based, timed artificial insemination protocol in suckled Nellore (*Bos indicus*) cows. *Theriogenology*, 73:651-658.

**Sá Filho MF, Baldrighi JM, Sales JN, Crepaldi GA, Carvalho JB, Bó GA, Baruselli PS.** 2011. Induction of ovarian follicular wave emergence and ovulation in progestin-based timed artificial insemination protocols for *Bos indicus* cattle. *Anim Reprod Sci*, 129:132-139.

**Sá Filho MF, Torres-Júnior JRS, Penteado L, Gimenes LU, Ferreira RM, Ayres H, Castro e Paula LA, Sales JNS, Baruselli PS.** 2010b. Equine chronic gonadotropin improves the efficacy of a progestin-based fixed-time artificial insemination protocol in Nellore (*Bos indicus*) heifers. *Anim Reprod Sci*, 118:182-187.

**Sá Filho OG, Meneghetti M, Peres RFG, Lamb GC, Vasconcelos JLM.** 2009. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II: Strategies and factors affecting fertility. *Theriogenology*, 72:210-218.

**Sales JNS, Crepaldi GA, Girotto RW, Souza AH, Baruselli PS.** 2011. Fixed time AI protocols replacing eCG with a single dose of FSH were less effective in stimulating



follicular growth, ovulation, and fertility in suckled-anestrus Nelore beef cows. *Anim Reprod Sci*, 124:12-18.

**Sales JNS, Iguma LT, Batista RITP, Quintao CCR, Gama MAS, Freitas C, Pereira MM, Camargo LSA, Viana JHM, Souza JC, Baruselli PS.** 2015. Effects of a high-energy diet on oocyte quality and in vitro embryo production in *Bos indicus* and *Bos taurus* cows. *J Dairy Sci*, 98:3086-3099.

**Sangsritavong S, Combs DK, Sartori R, Armentano LE, Wiltbank MC.** 2002. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 beta in dairy cattle. *J Dairy Sci*, 85:2831-2842.

**Santos JEP, Bisinotto RS, Ribeiro ES.** 2016. Mechanisms underlying reduced fertility in anovular dairy cows. *Theriogenology*, 86:254-262.

**Santos JEP, Rutigliano HM, Sa Filho MF.** 2009. Risk factors for resumption of postpartum estrous cycles and embryonic survival in lactating dairy cows. *Anim Reprod Sci*, 110: 207-221.

**Sartorelli ES, Carvalho LM, Bergfelt DR, Ginther OJ, Barros CM.** 2005. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. *Theriogenology*, 63:2382-2394.

**Sartori R, Barros CM.** 2011. Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. *Anim Reprod Sci*, 124:244-250.

**Sartori R, Bastos MR, Baruselli PS, Gimenes LU, Ereno RL, Barros CM.** 2010a. Physiological differences and implications to reproductive management of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle in a tropical environment. *Soc Reprod Fertil Suppl*, 67:357-375.

**Sartori R, Bastos MR, Mattos MCC.** 2010b. Physiological bases for understanding estrous cycle differences between *Bos taurus* and *Bos indicus*. *Acta Sci Vet*, 38 (Supl 2):s287-s295.

**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.

**Sartori R, Gimenes LU, Monteiro Jr PL, Melo LF, Baruselli PS, Bastos MR.** 2016. Metabolic and endocrine differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* females that impact the interaction of nutrition with reproduction. *Theriogenology*, 86:32-40.

**Sartori R, Guardieiro MM, Surjus RS, Melo LF, Prata AB, Ishiguro M, Bastos MR, Nascimento AB.** 2013. Metabolic hormones and reproductive function in cattle. *Anim Reprod*, 10:199-205.

**Sartori R, Haughian JM, Shaver RD, Rosa GJM, 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.

**Sartori R, Rosa GJM, Wiltbank MC.** 2002a. Ovarian structures and circulating steroids in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J Dairy Sci*, 85:2813-2822.

**Sartori R, Sartor-Bergfelt R, Mertens SA, Guenther JN, Parrish JJ, Wiltbank MC.** 2002b. Fertilization and early embryonic development in heifers

and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J Dairy Sci*, 85:2803-2812.

**Segerson EC, Hansen TR, Libby DW, Randel RD, Getz WR.** 1984. Ovarian and uterine morphology and function in Angus and Brahman cows. *Anim Sci*, 59:1026-1046.

**Small JA, Colazo MG, Kastelic JP, Mapletoft R.J.** 2009. Effects of progesterone presynchronization and eCG on pregnancy rates to GnRH-based, timed-AI in beef cattle. *Theriogenology*, 71:698-706.

**Souza AH, Viechnieski S, Lima FA, Silva FF, Araújo R, Bó GA, Wiltbank MC, Baruselli PS.** 2009. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. *Theriogenology*, 72:10-21.

**Stevenson JL, Dalton JC, Santos JE, Sartori R, Ahmadzadeh A, Chebel RC.** 2008. Effect of synchronization protocols on follicular development and estradiol and progesterone concentrations of dairy heifers. *J Dairy Sci*, 91:3045-3056.

**Stringfellow DA, Seidel SM.** 1998. Manual of the International Embryo Transfer Society. 3rd Edition. (IETS: Savoy, IL).

**Sudano MJ, Caixeta ES, Paschoal DM, Martins Jr A, Machado R, Buratini J, Landim-Alvarenga FDC.** 2014. Cryotolerance and global gene-expression patterns of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* in vitro- and in vivo produced blastocysts. *Reprod Fertil Dev*, 26:1129-1141.

**Vasconcelos JLM, Sangsritavong S, Tsai SJ, Wiltbank MC.** 2003. Acute reduction in serum progesterone concentrations after feed intake in dairy cows. *Theriogenology*, 60:795-807.

**Vasconcelos JLM, Sartori R, Oliveira HN, Guenther JG, Wiltbank MC.** 2001. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology*, 56:307-314.

**Vasconcelos JLM, Silcox RW, Rosa GJM, Pursley JR, Wiltbank MC.** 1999. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. *Theriogenology*, 52:1067-1078.

**Wiltbank MC, Baez GM, Cochrane F, Barletta RV, Trayford CR, Joseph RT.** 2015. Effect of a second treatment with prostaglandin F2 $\alpha$  during the Ovsynch protocol on luteolysis and pregnancy in dairy cows. *J Dairy Sci*, 98:8644-8654.

**Wiltbank MC, Gumen A, Sartori R.** 2002. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology*, 57:21-52.

**Wiltbank M, Lopez H, Sartori R, Sangsritavong S, Gümen A.** 2006. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology*, 65:17-29.

**Wiltbank MC, Souza AH, Carvalho PD, Cunha AP, Giordano JO, Fricke PM, Baez GM, Diskin MG.** 2014. Physiological and practical effects of progesterone on reproduction in dairy cattle. *Animal*, 8:70-81.

## Usos de novas ferramentas analíticas para produção de melhores embriões *in vitro*

J.R. Herrick, E. Silva, R.L. Krisher\*

Colorado Center for Reproductive Medicine, 10290 RidgeGate Circle, Lone Tree, CO 80124 USA

Título curto: Uma abordagem metabolômica para cultura de embriões

\*Autor correspondente: [rkrisher@FLColo.com](mailto:rkrisher@FLColo.com) ; fone, 303-781-2797; fax, 303-788-4438

### Resumo

A proposta desta revisão é resumir o que sabemos sobre metabolismo de embriões durante a pré-implantação, focando nos ruminantes, e discutir como este conhecimento informa a nossa abordagem para a cultura de embriões *in vitro*. A relação importante entre o metabolismo do embrião e a viabilidade será enfatizada, e as teorias das redes metabólicas em embriões apresentadas. Métodos que historicamente têm sido utilizados para estudar o metabolismo do embrião serão comparados e contrastados com uma nova metodologia para avaliar o metabolismo embrionário: a metabolômica. Finalmente, as vantagens e desvantagens do uso da tecnologia metabolômica para estudar o metabolismo embrionário será criticamente avaliada. A aplicação do metabolismo para auxiliar as tecnologias reprodutivas e especialmente a cultura embrionária, será destacada. Nós concluímos que o uso da metabolômica para estudar a fisiologia embrionária esclarecerá nosso entendimento dos caminhos metabólicos embrionários no contexto de um meio completo que possibilite uma boa produção de blastocisto. Este pensamento sobre o metabolismo embrionário como dinâmico, complexo e inter-relacionados com caminhos bioquímicos, disponibilizados pela metabolômica, nos permitirá desenvolver a próxima geração de meio de cultura de embriões para auxiliar e manipular o metabolismo para promover a viabilidade do embrião, assim como para identificar os embriões mais viáveis para a transferência.

**Palavras chaves:** Embrião, metabolismo, cultura *in vitro*, viabilidade

### Introdução

Embriões podem se desenvolver com sucesso para o estágio de blastocisto em uma ampla variedade de meios de cultura disponíveis comercialmente. Embora embriões produzidos *in vitro* exibam taxas de gravidez somente um pouco mais baixas do que aqueles produzidos *in vivo*, eles exibem sobrevida reduzida após vitrificação e tem múltiplos problemas associados durante a gravidez e parto, incluindo peso elevado ao nascimento, gestação prolongada, e uma alta incidência de perda fetal e neonatal, sugerindo uma qualidade reduzida do embrião (Hasler, 2000; Rizos et al., 2002). Melhorias tem sido feitas na cultura de embriões de espécies domésticas na última década, mas um progresso na otimização da produção de embriões *in vitro* permanece indefinido, porque nós ainda não compreendemos

completamente o metabolismo embrionário. Embriões durante a pré-implantação exibem um surpreendente grau de plasticidade metabólica, permitindo-lhes utilizar uma variedade de substratos metabólicos via múltiplos caminhos para auxiliar o desenvolvimento em uma variedade de meios que muitas vezes tem pouca semelhança com o fluido do oviduto ou uterino. Isso complica a determinação da composição de nutrientes ideais para sustentar o desenvolvimento *in vitro*. Embora embriões sejam capazes de adaptar suas atividades metabólicas para utilizar uma variedade de nutrientes em seu ambiente, o custo metabólico da adaptação para uma condição abaixo do ideal pode comprometer a viabilidade do embrião, tolerância ao frio, manutenção da gravidez, crescimento fetal e saúde dos descendentes. Esta relação entre atividade metabólica e viabilidade é fundamental para o sucesso da aplicação de tecnologias de reprodução assistida. Somente pelo entendimento dos requerimentos metabólicos do embrião, nós poderemos planejar sistemas de cultura que sustentam o desenvolvimento de embriões viáveis com as melhores chances de resultar em proles saudáveis.

A aplicação da metabolômica à análise do metabolismo embrionário está ajudando a promover esse entendimento. A metabolômica permite a investigação da fisiologia embrionária de forma focada, com uma certa profundidade que não foi possível anteriormente, o que nos permite pensar em um metabolismo embrionário como uma complexa interação de múltiplos mecanismos metabólicos. Essa tecnologia tem um potencial amplo para expandir nosso conhecimento sobre o metabolismo embrionário porque pode ser aplicada de forma não invasiva para estudar a fisiologia embrionária via medição simultânea de múltiplos substratos seguida de cultura em um meio otimizado. Uma abordagem metabolômica não somente fornece informações sobre caminhos suspeitos de importância, mas também sobre mecanismos regulatórios desconhecidos e intermediários metabólicos. Informação disponibilizada pela metabolômica informará o desenvolvimento de melhores meios de cultura de embriões, visando reduzir o estresse *in vitro* e adaptação, bem como métodos para regular o metabolismo *in vitro* para melhorar a qualidade do embrião. Além disso, características metabólicas específicas de embriões de alta qualidade serão descobertas.

### Redes metabólicas em embriões de mamíferos

Existem estudos que fornecem um vislumbre dos diversos mecanismos metabólicos usados pelos embriões, e sugerem uma bioquímica dinâmica e controlada ao longo do tempo de desenvolvimento durante a pré-implantação. Entretanto, nós somente estamos começando a apreciar esses mecanismos e como eles são controlados. Interpretações de estudos metabólicos são complicadas para as condições *in vitro*, e nós ainda não temos um bom entendimento de como os embriões atuam metabolicamente dentro do largo contexto do seu ambiente, muito menos quais caminhos eles deveriam utilizar para promover uma ótima qualidade. Diversas hipóteses, não necessariamente mutuamente exclusivas, têm sido propostas para compreender o metabolismo embrionário em um contexto amplo. A Hipótese Embrião tranquilo propõe que embriões viáveis têm menor atividade metabólica geral, porque eles respondem ao estresse celular (Leese, 2002; Baumann et al., 2007; Leese et al., 2007; Leese et al., 2008). Os requerimentos energéticos aumentam com o estresse, sugerindo que atividade metabólica elevada tem uma relação negativa com a viabilidade embrionária. Também foi levantada a hipótese de que o metabolismo embrionário espelha-se nas células cancerígenas, que usam a estratégia metabólica conhecida como Efeito Warburg (Warburg, 1956; Krisher and Prather, 2012; Smith and Sturmey, 2013). O metabolismo Warburg possibilita rápida proliferação celular por fornecer precursores para síntese macromolecular e gestão do estresse oxidativo, e isto está relacionado ao controle da diferenciação celular (Vander Heiden et al., 2009; Vander Heiden et al., 2010; Panopoulos et al., 2012; Zhang et al., 2012). Embora o ciclo do ácido tricarboxílico (CAT) é muito mais eficiente na produção de ATP quando comparado a glicólise, para o embrião o uso metabólico da glicose pode ser mais importante do que a simples produção de ATP. Isto pode incluir um controle redox e síntese macromolecular, incluindo DNA, RNA, proteínas e lipídios para auxiliar no rápido crescimento embrionário. Pode ser demasiado simplista visualizar o metabolismo da glicose no embrião principalmente como um meio para produzir ATP, ignorando exigências biossintéticas do embrião. Neste caso, os ácidos graxos e / ou aminoácidos mantem a atividade basal do CAT para fornecer ATP.

### Metabolismo embrionário

Embora o metabolismo embrionário venha sendo bem investigado, a base da nossa compreensão atual vem principalmente a partir de estudos de embriões de murino e a sua utilização de um número limitado de substratos, principalmente o carboidrato glicose, lactato e piruvato e, ocasionalmente, o aminoácido glutamina. Os estudos pioneiros de Biggers e Brinster (Brinster, 1965a; Brinster, 1965b; Biggers et al., 1967) resultaram no modelo no qual os embriões em fase de clivagem utilizam o piruvato e o lactato, enquanto a dependência no metabolismo da glicose via glicólise caracteriza o blastocisto antes da implantação, quando uma grande tomada de glicose é a assinatura da viabilidade (Gardner and Leese, 1987; Gardner et al., 2001). Cinquenta anos mais tarde, este modelo é ainda surpreendentemente acurado e amplamente citado como um

padrão generalizado de atividade metabólica em embriões de mamíferos. Entretanto, estes estudos foram realizados em um meio simples (sais, carboidratos e proteínas) que não mantém um ótimo desenvolvimento. Por exemplo, fluidos do oviduto e uterino contem todos dos 20 aminoácidos (Harris et al., 2005; Hugentobler et al., 2007; Li et al., 2007), em contraste com as formulações do meio de cultura de início nas quais glicose e lactato estavam presentes em concentrações supra fisiológicas e nenhum aminoácido estava presente (Brinster, 1965a; Whitten and Biggers, 1968).

Em ruminantes, a tomada de piruvato excede a da glicose no início dos estágios de clivagem (Rieger et al., 1992; Gardner et al., 1993; Thompson et al., 1996). Similarmente, aproximadamente 90% do ATP é derivado do metabolismo oxidativo antes da compactação, com piruvato e glutamina sendo os substratos preferidos (Thompson et al., 1991; Rieger et al., 1992; Gardner et al., 1993; Thompson et al., 1996). Apesar da glicose não ser o substrato preferido, embriões precoces de bovinos utilizam glicose, com aumento na via das pentoses e glicólise durante o desenvolvimento na fase de pré-implantação (Wales and Brinster, 1968; Leese and Barton, 1984; Pantaleon et al., 2001; Comizzoli et al., 2003). O consumo da glicose, a atividade da hexoquinase e a produção de lactato aumentam da fase de zigoto a mórula (Wales and Brinster, 1968; Leese and Barton, 1984; Gardner and Leese, 1986; O'Fallon and Wright, 1986; Gardner and Leese, 1988; Saito et al., 1994; Houghton et al., 1996). Em embriões de ruminantes na fase de pós-compactação, há uma mudança no metabolismo da glicose, com um aumento: na captação de glucose, produção de lactato, atividade glicolítica e a proporção de ATP produzido através de glicólise (Thompson et al., 1991; Rieger et al., 1992; Gardner et al., 1993; Thompson et al., 1996). A captação de piruvato e também a sua oxidação aumentam durante o desenvolvimento do blastocisto (Rieger et al., 1992; Gardner et al., 1993; Thompson et al., 1993; Thompson et al., 1996; Krisher et al., 1999; Khurana and Niemann, 2000), embora a glicose seja o substrato primário. Oxidação do lactato e piruvato parecem ser inversamente relacionados, com a inclusão de um dos substratos no meio inibindo o metabolismo do outro durante a desenvolvimento na fase de pré-compactação (Khurana and Niemann, 2000). Células isoladas do trofotoderma de blastocistos bovino consumiram menos glicose e mais piruvato e produziram mais lactato do que células da massa interna (Gopichandran and Leese, 2003).

A glicose está presente no oviduto de bovino na concentração de aproximadamente 2.5mM (Hugentobler et al., 2008; Hugentobler et al., 2010). Entretanto, há meios de cultura que surpreendentemente sustentam o desenvolvimento de embriões bovinos na fase de pré-implantação com glicose (SOF, (Tervit et al., 1972; Steeves and Gardner, 1999; Gandhi et al., 2000)) e sem glicose (CR1aa, (Rosenkrans and First, 1994); mSOF, (Takahashi and First, 1992)). Porque os embriões de bovino e suínos são capazes de desenvolver *in vitro* do estágio de 1 célula até blastocisto na ausência de glicose exógena, sem nenhuma consequência prejudicial, possivelmente o piruvato é convertido em fosfoenolpiruvato (PEP) por enzimas

mitocondriais, que podem participar nas reações reversíveis da glicólise para suplementar os intermediários da via das pentoses.

Com exceção da glutamina, a maioria dos estudos tem focado nos carboidratos. Entretanto, embriões de suínos, bovinos e ovinos se desenvolverão para o estágio de blastocisto tendo aminoácidos (AAs) e/ou proteínas como únicas fontes de nutrientes exógenos (Petters et al., 1990; Thompson et al., 1992; Sutton-McDowall et al., 2012). Numerosos estudos tem mostrado que AAs têm efeitos benéficos no desenvolvimento embrionário de várias espécies quando adicionados no meio de cultura (Liu and Foote, 1995; McKiernan et al., 1995; Lane and Gardner, 1997; Steeves and Gardner, 1999; Biggers et al., 2000; Lane et al., 2001; Suzuki and Yoshioka, 2006). Aminoácidos específicos são consumidos (deletados do meio) e produzidos (secretados no meio) por embriões de camundongos, suínos, bovinos e de seres humanos (Houghton et al., 2002; Orsi and Leese, 2004; Humpherson et al., 2005; Wale and Gardner, 2012). Presumivelmente, alguns dos aminoácidos consumidos são utilizados para a síntese de proteínas, mas outros destinos possíveis para os aminoácidos não estão claros. Aminoácidos podem atuar como tampões osmóticos, ajudando o embrião a manter a homeostase celular (Baltz and Zhou, 2012). A produção de amônia pelos embriões cultivados com aminoácidos também indicam que alguns aminoácidos estão sendo convertidos em intermediários do ciclo CAT para a geração de ATP (Gardner et al., 2001; Lane et al., 2001). Desde que a amônia pode ser inibitória para o desenvolvimento, embriões apresentam mecanismos para desintoxicar a amônia e impedir o seu acúmulo no citoplasma ou meio de cultura. Embriões de murino e bovino são capazes de produzir glutamina a partir de amônia e glutamato e/ou produzir alanina a partir de glutamato, piruvato e amônia (Orsi and Leese, 2004; Wale and Gardner, 2013). A alanina e glutamina resultantes são secretadas no meio, o que tem sido observado em vários estudos (Houghton et al., 2002; Orsi and Leese, 2004; Humpherson et al., 2005; Wale and Gardner, 2013; Krisher et al., 2015).

O estudo do metabolismo de carboidratos tem ofuscado a contribuição  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos (FAO) até recentemente. Oócitos de bovinos, suínos e felinos têm grande estoque intracelular de lipídios, enquanto os de ratos têm pouco estoque de lipídeos, um fato que se reflete pela cor do citoplasma (McEvoy et al., 2000; Leroy et al., 2005a). Em humanos e ruminantes domésticos, ácido palmítico, esteárico e oleico são os ácidos graxos mais abundantes nos oócitos, enquanto oócitos de suínos contêm grande quantidade de ácidos graxos insaturados, particularmente ácido linoleico (Homa et al., 1986; Matorras et al., 1998; McEvoy et al., 2000; Kim et al., 2001). Apesar dessas espécies com concentração relativamente baixa de lipídios, como camundongos, coelhos e seres humanos, têm demonstrado que metabolizam ativamente essa fonte de nutriente (Khandoker and Tsujii, 1998; Haggarty et al., 2006; Dunning et al., 2010; Paczkowski et al., 2014). Inibição da oxidação de ácidos graxos diminui o desenvolvimento embrionário em camundongos e bovinos (Hewitson et al., 1996; Ferguson and Leese, 2006). A adição de ácidos graxos

ou carnitina para estimular a oxidação de ácidos graxos em oócitos e meio de cultura de embriões tem mostrado primariamente efeitos positivos no desenvolvimento, embora resultados são variáveis devido em parte a diferenças no tipo e concentrações de ácidos graxos utilizados (Spindler et al., 2000; Leroy et al., 2005b; Dunning et al., 2010; Marei et al., 2010; Somfai et al., 2011; Van Hoeck et al., 2011; Wu et al., 2011).

### Abordagens históricas para mensuração do metabolismo

Até hoje, a maior parte do que sabemos sobre o metabolismo de embriões foi determinada utilizando substratos radio marcados ou micro fluorescência. Substratos radio marcados fornecem informações sobre vias específicas, dependendo da localização do marcador sobre o substrato original e o metabolito final. A micro fluorescência baseia-se em reações acopladas enzimaticamente ligados às alterações nas razões de NAD (P)  $+$ : NAD (P) H. Ambos os métodos resultam na quantificação exata do metabolismo do substrato. Talvez a consideração mais importante quando interpreta-se esses resultados é que o metabolismo embrionário não é somente afetado pelas condições nas quais o embrião se desenvolve, mas também pelo meio no qual o metabolismo é avaliado (Gardner and Leese, 1990; Lane and Gardner, 1998; Krisher et al., 1999; Gandhi et al., 2001). Outra desvantagem para medição metabólica é que somos incapazes de medir as vias metabólicas que são normalmente utilizados pelos embriões *in vivo*, de modo que nós nunca estamos completamente confiantes do que um embrião deveria estar fazendo metabolicamente. Claro, podemos comparar o metabolismo de embriões *in vivo* com o metabolismo de embriões cultivados *in vitro*, mas devemos ter em mente que provavelmente haverá algum tipo de adaptação ao ambiente *in vitro* (Lane and Gardner, 1998). Mesmo tendo em conta estas adversidades, os estudos metabólicos têm fornecido informações importantes que nos ajudou compreender os mecanismos metabólicos em embriões de mamíferos.

### Metabolômicas

Somente recentemente as vantagens tecnológicas na automação e na tecnologia de informação permitiram que as técnicas básicas de metabolômica possam ser aplicadas para o estudo do metabolismo embrionário (Hollywood et al., 2006; Brison et al., 2007; Seli et al., 2007; Krisher et al., 2015). A metabolômica oferece vantagens sobre métodos anteriores. Esta tecnologia é capaz de mensurar a captação e produção de múltiplos substratos pelos embriões por análise não invasiva do meio de cultura *in vitro*. Isto representa um avanço significativo na nossa habilidade em examinar o metabolismo embrionário em um ambiente complexo durante o desenvolvimento na fase de pré-implantação, em comparação com os nossos caminhos atuais de medidas isoladas em meios modificados que não foram concebidos para manter a cultura do embrião longo prazo. Esta abordagem também deixa o embrião viável para a transferência, prestando-se assim para a descoberta de uma

assinatura característica metabólica de embriões de alta qualidade que pode ser utilizado para selecionar os embriões para transferência (Singh e Sinclair, 2007).

Tipicamente, o meio de cultura é analisado após a cultura de embriões e comparado ao meio sem embrião para averiguar como a composição do meio de cultura foi alterada, comumente referido como marcação da atividade metabólica do embrião. Embora uma medida indireta, fornece informação específica sobre qual substrato o embrião está utilizando e produzindo, fornecendo pistas sobre os caminhos em atividade. A metabolômica fornece informações sobre como os embriões usam os substratos que estão incluídos no meio de cultura, utilizando uma abordagem orientada (medindo um conjunto predefinido de metabólitos). Além disso, uma abordagem não-alvo pode ser utilizada, recolhendo informações sobre todos os metabólitos detectáveis, conhecidos e desconhecidos, para gerar novas informações sobre a bioquímica do embrião. Embora a abordagem não-alvo investigue um grupo maior de metabólitos, os conjuntos de dados são grandes e complexos. As recentes melhorias no fluxo de trabalho de informática para metabolômica têm ajudado a diminuir este problema, melhorando a anotação metabólica e interpretação em larga escala. Outro ponto importante a considerar quando se utiliza metabolômica para estudar o metabolismo do embrião é que a quantificação é geralmente relativa. Nesta circunstância, a quantidade de um substrato especial utilizado pelo embrião é relatada como uma porcentagem do que foi detectado no meio sem um embrião. Isso faz com que a inclusão de controle dos meios de cultura apropriados, coletados da mesma placa de cultura e tratados de forma idêntica seja primordial. Embora esse método de quantificação relativa não forneça informação sobre a concentração de qualquer substrato, fornece dados em relação aqueles substratos que os embriões estão consumindo ou produzindo em quantidades estatisticamente significativas comparadas a quantidade total disponível. A quantificação absoluta é possível para alguns metabólitos conhecidos pela calibração de valores de amostra em uma curva padrão. Que permite uma melhor comparação entre os estudos da metabolômica, bem como para estudos de metabolismos realizados utilizando outras técnicas. Entretanto, isto eleva o custo e pode ser de difícil execução devido ao grande número de metabólitos. É importante notar que a quantificação absoluta não é necessária para validar uma comparação metabolômica. Frequentemente, ambas as análises estatísticas (uni e multivariada) permitem o reconhecimento das diferenças ou mudanças no perfil do metabólito que pode ser usado como um marcador de doença ou toxicidade, mesmo antes dos metabólitos específicos serem quantificados, ou mesmo identificados.

Várias plataformas podem ser adaptadas para metabolômica, embora as abordagens baseadas na espectrometria de massa são idealmente adequadas devido a sensibilidade, a composição complexa e baixo volume de amostra inerente na análise dos meios de cultura de embriões. Múltiplas plataformas têm sido relatadas para a análise do metabolismo do embrião, incluindo a cromatografia a gás ou líquida (CG e CL, respectivamente) e/ou ionização e dessorção a laser assistida por matriz

(MALDI) acoplada a espectrometria de massa (ME), bem como a ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia Raman ou espectroscopia de infravermelho (IV). Se a espectrometria de massa é usada, medidas da massa das moléculas, ou das massas de fragmentos distintivos daquela molécula seguidos de derivatização, resulta em uma impressão digital molecular específica que, em seguida, permite a identificação do metabólito quando comparado com bancos de dados conhecidos. A sensibilidade destes métodos permite a análise individualizada de embriões, invalidando a necessidade de pooling embrionário e proporcionando a oportunidade de associar perfis metabólicos específicos com competência embrionária após a transferência.

Junto com a potência inerente na aplicação da tecnologia metabolômica ao metabolismo do embrião, existem algumas limitações. Somente é possível detectar diferenças líquidas no meio de cultura com e sem embrião. Se o mesmo substrato é consumido e produzido pelo embrião, resulta em uma diferença líquida nula, e não será detectado como atividade metabólica. Também não é possível diferenciar entre o mesmo substrato proveniente do meio de cultura ou do embrião. Por exemplo, esta técnica não distingue o lactato do meio de cultura do lactato produzido pelo embrião, somente o valor total de lactato é obtido. Substratos marcados com isótopos estáveis (como o  $^{13}\text{C}$ ) podem ser usados para superar esses problemas, mas não em embriões destinados a transferência. Similarmente, se o meio de cultura necessita de um metabólito importante para o metabolismo embrionário e desenvolvimento, uma abordagem metabolômica não revelará esta ausência. Uma limitação adicional da metabolômica é que para obter a informação sobre muitos intermediários nos caminhos metabólicos, que são críticos para a compreensão do caminho de preferência, o embrião deve ser analisado diretamente e então destruído. Adicionalmente, na maioria dos casos menos metabólitos serão analisados que realmente são detectados no espectro da amostra completa. Porque uma abordagem alvo é usada quando somente metabólitos conhecidos são examinados especificamente, porque alguns metabólitos são desconhecidos, ou porque alguns não são detectados com precisão. Uma desvantagem final para a tecnologia metabolômica é que as plataformas atuais são caras e complexas, exigindo especialistas tanto para processar as amostras e analisar os dados, resultando em rendimento relativamente lento e tornando-os irrealista para a maioria dos laboratórios de tecnologia de reprodução assistida (TRA) (Montag et al., 2013). Entretanto, a vitrificação do blastocisto fornece o tempo necessário para executar essas análises complexas em um centro de recursos especializados antes da transferência do embrião.

#### **Aplicação da tecnologia metabolômica na reprodução assistida**

O perfil metabolômico fornece uma ampla quantidade de informação descrevendo a atividade metabólica individual do embrião. Agora que podemos realizar com sucesso esses estudos, devemos considerar o impacto que esta informação pode ter na TRA. Pode o conhecimento

gerado por essa tecnologia melhorar a TRA? Certamente, um resultado primário é que o conhecimento básico leva a uma melhora na compreensão do metabolismo do embrião. Então nós podemos expandir nossos experimentos para determinar como o metabolismo do embrião muda durante o desenvolvimento na fase de pré-implantação, descobrir como o metabolismo do embrião é alterado por doenças maternas, e de que forma a qualidade do embrião é refletida pelo metabolismo. Finalmente, podemos resolver a questão abrangente de como estes elementos interagem com o ambiente no qual o embrião encontra-se e como influenciam a sua competência. Estes estudos devem levar à formulação de um melhor meio de cultura que conduza o metabolismo do embrião, alterando as atividades das vias específicas críticas essenciais para a qualidade do embrião que não são suportadas em meios convencionais.

A metabolômica tem sido utilizada para a pesquisa do metabolismo de embrião, fornecendo informações básicas originais. Embora analisados em grupos, o metaboloma de embriões de camundongo tem sido definido usando espectrometria de massa em tandem (CL-EM/EM) e eletroforese de capilar TOF-MS (Wale e Gardner, 2012; Yamada et al., 2012). Nosso laboratório, tem relatado análises metabolômicas de embrião de camundongo, bovino e humano usando CG e MALDI-EM relativa às espécies, estágios de desenvolvimento, qualidade do embrião, características maternas e condições da cultura (Krisher et al., 2015). Os lipídios são uma das classes de metabólitos que começaram a ser estudados em profundidade nos oócitos e embriões usando técnicas metabolômicas. Usando MALDI-EM, o conteúdo de lipídios dos oócitos e embriões de várias espécies foi determinado, e alterações no perfil lipídico de embriões bovinos devido ao cultivo com soro foram descritos (Ferreira et al., 2010). MALDI por tempo de voo (TOF) EM foi utilizada para avaliar o perfil lipídico das células do cóndrio humano, demonstrando que a fosfatidilcolina deve ser usada como um marcador da habilidade de produzir um embrião que resulta em uma gravidez (Montani et al., 2012). Ionização de desorção por eletro spray com espectrometria de massa (DESI-EM) vem sendo utilizada para descrever mudanças no perfil lipídico durante o desenvolvimento na fase de pré-implantação em camundongo, e para descrever diferenças entre embriões produzidos *in vitro* e *in vivo* (Ferreira et al., 2012). Em embriões de bovino, MALDI-EM revelou diferenças na fosfatidilcolina e esfingomielina devido a cultura *in vitro*, assim como nas subespécies de origem (Sudano et al., 2012).

Uma aplicação não esperada da metabolômica em laboratórios de TRA é a identificação de contaminante tóxico do embrião em materiais de contato. Teste de qualidade significativo é correntemente realizado, tipicamente, usando um ensaio de embrião de camundongo, para determinar a adequação dos lotes específicos de reagentes e utensílios de plástico para a cultura do embrião humano. Muitos produtos são testados tanto pelo fornecedor quanto pelo usuário final, e os produtos que comprometem desenvolvimento do embrião são detectados. No entanto, não há entendimento dos compostos contaminantes presentes que tornam os inadequados lotes. Se estes componentes pudessem ser identificados, produtos poderiam ser pré-

selecionados para eliminar aqueles contendo contaminantes conhecidos e que causam efeitos negativos sobre o crescimento do embrião. Isto não somente reduziria a chance desses produtos alcançarem um laboratório de TRA, mas reduziria os recursos usados para testá-los.

Provavelmente a aplicação mais antecipada da metabolômica na TRA, entretanto, é o desenvolvimento de bio marcador para a viabilidade do embrião. Dado que o metabolismo embrionário é estritamente relacionado a viabilidade, um bio marcador metabólico é de grande interesse (Nel-Themaat and Nagy, 2011; Gardner and Wale, 2013). A pesquisa tem fornecido muitas evidências de que o metabolismo, e a rotatividade dos aminoácidos, em particular, estão relacionadas com a qualidade do embrião em seres humanos e outras espécies de mamíferos (Houghton et al., 2002; Brison et al., 2004; Sturmey et al., 2008; Sturmey et al., 2010; Hemmings et al., 2012; Gardner and Wale, 2013). Atualmente, a morfologia é o método mais amplamente utilizado para identificar a viabilidade de embriões. Entretanto, é largamente aceito que esse parâmetro fornece informações limitadas sobre a habilidade do embrião durante a implantação e manutenção de uma gravidez viável (Botros et al., 2008). Relatos iniciais sugeriram que a análise metabolômica pode proporcionar uma melhor ferramenta preditiva para seleção de embriões, em comparação com morfologia sozinha (Nagy et al., 2008; Marhuenda-Egea et al., 2010; Cortezzi et al., 2013). Estudos retrospectivos usando Raman e espectroscopia NIR, assim como a ionização de eletro spray EM (ESI-MS), definem associações entre perfis de meios consumidos e o potencial para a implantação bem sucedida na TRA humana (Nagy et al., 2008; Sakkas et al., 2008; Scott et al., 2008; Seli et al., 2010; Marhuenda-Egea et al., 2011; Pudakalakatti et al., 2013; Zivi et al., 2014). Ensaios clínicos randomizados, com base nestes resultados retrospectivos foram realizadas, mas a seleção usando o índice de viabilidade baseado na metabolômica não aumentou a taxa de gravidez em comparação com a seleção baseadas apenas nos dados de morfologia (Hardarson et al., 2012; Vergouw et al., 2012; Uyar and Seli, 2014), possivelmente devido a limitações na sensibilidade dessa plataforma (Gardner and Wale, 2013). De maneira interessante, esses estudos não identificaram metabólitos específicos, apenas calcularam um índice de viabilidade com base no espectro de meio não utilizado. O objetivo aqui era a predição baseada em bio marcadores, não a geração de conhecimento que iria informar o que já sabemos do metabolismo do embrião.

## Conclusões

Está claro que a atividade metabólica é um indicador crítico da viabilidade do embrião. O sucesso nas tecnologias de reprodução assistida envolve até mesmo uma pequena quantidade de tempo na cultura é dependente do fornecimento ao embrião de uma combinação apropriada de substratos que irão apoiar a atividade metabólica normal e minimizar o estresse celular. Embora a nossa compreensão do metabolismo embrionário tenha melhorado grandemente desde do trabalho recente de Biggers e Brinster, há muito trabalho a ser feito. Compreender a relação entre o

metabolismo e a viabilidade, nós devemos examinar o complexo caminho metabólico na totalidade e apreciar suas inter-relações. Nós só estamos começando a compreender a diversidade dos mecanismos metabólicos presentes entre embriões de espécies diferentes. Estudos anteriores têm fornecido apenas instantâneos de vias metabólicas isoladas. Entretanto, aplicação da tecnologia metabolômica para análise do metabolismo embrionário permite a visualização do metabolismo em cultura com condições otimizadas e no contexto de um sistema metabólico completo. Até hoje, a tecnologia metabolômica tem sido aplicada com êxito para o estudo do metabolismo do embrião, embora a maioria dos estudos têm sido de natureza descritiva. Estes estudos iniciais têm fornecido informações importantes e novas sobre a atividade metabólica do embrião durante o seu desenvolvimento in vitro, e começaram a discutir a relação entre metabolismo e qualidade. Agora o campo está preparado para expandir esse trabalho e discutir hipóteses experimentais da pesquisa básica, e aplicar o conhecimento ganho. Por fim, os dados da metabolômica fornecerão detalhadamente as vias bioquímicas usadas pelos embriões sob várias condições, revolucionando nossa compreensão da bioquímica embrionária e conduzindo a competência de manipular o metabolismo in vitro para apoiar a melhoria do desenvolvimento embrionário, e permitindo a identificação dos embriões metabolicamente mais viáveis.

#### Agradecimentos

Os autores agradecem a Alison Greene e Chad Barentsen por sua assistência com experimentos de metabolômica no laboratório que compõem o conteúdo deste manuscrito. Sarah Lyons, Jay Kirkwood, Corey Broeckling, e Jessica Prenni do Núcleo de Proteômica e Metabolômica da Universidade do Estado de Colorado que forneceram ajuda inestimável na concepção, otimização, corridas, solução de problemas e discussão de plataformas metabolômica para análise do metabolismo embrionário.

#### Referências

- Baltz JM, Zhou C.** 2012. Cell volume regulation in mammalian oocytes and preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev* 79: 821-831.
- Baumann CG, Morris DG, Sreenan JM, Leese HJ.** 2007. The quiet embryo hypothesis: molecular characteristics favoring viability. *Mol Reprod Dev* 74: 1345-1353.
- Biggers JD, McGinnis LK, Raffin M.** 2000. Amino acids and preimplantation development of the mouse in protein-free potassium simplex optimized medium. *Biol Reprod* 63: 281-293.
- Biggers JD, Whittingham DG, Donahue RP.** 1967. The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. *Proc Natl Acad Sci* 58: 560-567.
- Botros L, Sakkas D, Seli E.** 2008. Metabolomics and its application for non-invasive embryo assessment in IVF. *Mol Hum Reprod* 14: 679-690.
- Brinster RL.** 1965a. Studies on the Development of Mouse Embryos in Vitro. II. The Effect of Energy Source. *J Exp Zool* 158: 59-68.
- Brinster RL.** 1965b. Studies on the development of mouse embryos in vitro. IV. Interaction of energy sources. *J Reprod Fertil* 10: 227-240.
- Brison DR, Hollywood K, Arnesen R, Goodacre R.** 2007. Predicting human embryo viability: the road to non-invasive analysis of the secretome using metabolic footprinting. *Reprod Biomed Online* 15: 296-302.
- Brison DR, Houghton FD, Falconer D, Roberts SA, Hawkhead J, Humpherson PG, Lieberman BA, Leese HJ.** 2004. Identification of viable embryos in IVF by non-invasive measurement of amino acid turnover. *Hum Reprod* 19: 2319-2324.
- Comizzoli P, Urner F, Sakkas D, Renard JP.** 2003. Up-regulation of glucose metabolism during male pronucleus formation determines the early onset of the phase in bovine zygotes. *Biol Reprod* 68: 1934-1940.
- Cortezzi SS, Cabral EC, Trevisan MG, Ferreira CR, Setti AS, Braga DP, Figueira Rde C, Iaconelli A, Jr., Eberlin MN, Borges E, Jr.** 2013. Prediction of embryo implantation potential by mass spectrometry fingerprinting of the culture medium. *Reproduction* 145: 453-462.
- Dunning KR, Cashman K, Russell DL, Thompson JG, Norman RJ, Robker RL.** 2010. Beta-oxidation is essential for mouse oocyte developmental competence and early embryo development. *Biol Reprod* 83: 909-918.
- Ferguson EM, Leese HJ.** 2006. A potential role for triglyceride as an energy source during bovine oocyte maturation and early embryo development. *Mol Reprod Dev* 73: 1195-1201.
- Ferreira CR, Pirro V, Eberlin LS, Hallett JE, Cooks RG.** 2012. Developmental phases of individual mouse preimplantation embryos characterized by lipid signatures using desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 404: 2915-2926.
- Ferreira CR, Saraiva SA, Catharino RR, Garcia JS, Gozzo FC, Sanvido GB, Santos LFA, Lo Turco EG, Pontes JHF, Basso AC, Bertolla RP, Sartori R, Guardieiro MM, Perecin F, Meirelles FV, Sangalli JR, Eberlin MN.** 2010. Single embryo and oocyte lipid fingerprinting by mass spectrometry. *J Lipid Res* 51: 1218-1227.
- 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.
- Gandhi AP, Lane M, Gardner DK, Krisher RL.** 2001. Substrate utilization in porcine embryos cultured in NCSU23 and G1.2/G2.2 sequential culture media. *Mol Reprod Dev* 58: 269-275.
- Gardner DK, Lane M, Batt P.** 1993. Uptake and metabolism of pyruvate and glucose by individual sheep preattachment embryos developed in vivo. *Mol Reprod Dev* 36: 313-319.
- Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schoolcraft WB.** 2001. Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential. *Fertil Steril* 76: 1175-1180.



- Gardner DK, Leese HJ.** 1986. Non-invasive measurement of nutrient uptake by single cultured pre-implantation mouse embryos. *Hum Reprod* 1: 25-27.
- Gardner DK, Leese HJ.** 1987. Assessment of embryo viability prior to transfer by the noninvasive measurement of glucose uptake. *J Exp Zool* 242: 103-105.
- 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, Leese HJ.** 1990. Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism in vitro. *J Reprod Fertil* 88: 361-368.
- Gardner DK, Wale PL.** 2013. Analysis of metabolism to select viable human embryos for transfer. *Fertil Steril* 99: 1062-1072.
- Gopichran N, Leese HJ.** 2003. Metabolic characterization of the bovine blastocyst, inner cell mass, trophectoderm and blastocoel fluid. *Reproduction* 126: 299-308.
- Haggarty P, Wood M, Ferguson E, Hoad G, Srikantharajah A, Milne E, Hamilton M, Bhattacharya S.** 2006. Fatty acid metabolism in human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 21: 766-773.
- Hardarson T, Ahlstrom A, Rogberg L, Botros L, Hillensjo T, Westlander G, Sakkas D, Wikland M.** 2012. Non-invasive metabolomic profiling of Day 2 and 5 embryo culture medium: a prospective randomized trial. *Hum Reprod* 27: 89-96.
- Harris SE, Gopichandran N, Picton HM, Leese HJ, Orsi NM.** 2005. Nutrient concentrations in murine follicular fluid and the female reproductive tract. *Theriogenology* 64: 992-1006.
- Hasler, JF.** 2000. In-vitro production of cattle embryos: problems with pregnancy and parturition. *Hum Reprod* 15 (Suppl 5): 47-58.
- Hemmings KE, Leese HJ, Picton HM.** 2012. Amino acid turnover by bovine oocytes provides an index of oocyte developmental competence in vitro. *Biol Reprod* 86: 165, 161-112.
- Hewitson LC, Martin KL, Leese HJ.** 1996. Effects of metabolic inhibitors on mouse preimplantation embryo development and the energy metabolism of isolated inner cell masses. *Mol Reprod Dev* 43: 323-330.
- Hollywood K, Brison DR, Goodacre R.** 2006. Metabolomics: current technologies and future trends. *Proteomics* 6: 4716-4723.
- Homa ST, Racowsky C, Mcgaughey RW.** 1986. Lipid analysis of immature pig oocytes. *J Reprod Fertil* 77: 425-434.
- Houghton FD, Hawkhead JA, Humpherson PG, Hogg JE, Balen AH, Rutherford AJ, Leese HJ.** 2002. Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. *Hum Reprod* 17: 999-1005.
- 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.
- Hugentobler SA, Diskin MG, Leese HJ, Humpherson PG, Watson T, Sreenan JM, Morris DG.** 2007. Amino acids in oviduct and uterine fluid and blood plasma during the estrous cycle in the bovine. *Mol Reprod Dev* 74: 445-454.
- Hugentobler SA, Humpherson PG, Leese HJ, Sreenan JM, Morris DG.** 2008. Energy substrates in bovine oviduct and uterine fluid and blood plasma during the oestrous cycle. *Mol Reprod Dev* 75: 496-503.
- Hugentobler SA, Sreenan JM, Humpherson PG, Leese HJ, Diskin MG, Morris DG.** 2010. Effects of changes in the concentration of systemic progesterone on ions, amino acids and energy substrates in cattle oviduct and uterine fluid and blood. *Reprod Fertil Dev* 22: 684-694.
- Humpherson PG, Leese HJ, Sturmey RG.** 2005. Amino acid metabolism of the porcine blastocyst. *Theriogenology* 64: 1852-1866.
- Khandoker M, Tsujii H.** 1998. Metabolism of exogenous fatty acids by preimplantation rabbit embryos. *Japan J Fertil Steril* 43: 195-201.
- Khurana NK, Niemann H.** 2000. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. *Biol Reprod* 62: 847-856.
- Kim JY, Kinoshita M, Ohnishi M, Fukui Y.** 2001. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and in vitro matured bovine oocytes. *Reproduction* 122: 131-138.
- 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 ART. *Reprod Fertil Dev* 27: 602-620.
- 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.
- 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.** 1997. Differential regulation of mouse embryo development and viability by amino acids. *J Reprod Fertil* 109: 153-164.
- Lane M, Gardner DK.** 1998. Amino acids and vitamins prevent culture-induced metabolic perturbations and associated loss of viability of mouse blastocysts. *Hum Reprod* 13: 991-997.
- Lane M, Hooper K, Gardner DK.** 2001. Effect of essential amino acids on mouse embryo viability and ammonium production. *J Assist Reprod Genet* 18: 519-525.
- Leese HJ.** 2002. Quiet please, do not disturb: a hypothesis of embryo metabolism and viability. *Bioessays* 24: 845-849.
- Leese HJ, Barton AM.** 1984. Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos. *J Reprod Fertil* 72: 9-13.
- 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, Sturmey RG, Baumann CG, Mcevoy TG.** 2007. Embryo viability and metabolism: obeying the quiet rules. *Hum Reprod* 22: 3047-3050.



- Leroy JLMR, Genicot G, Donnay I, Van Soom A.** 2005a. Evaluation of the lipid content in bovine oocytes and embryos with Nile red: a practical approach. *Reprod Dom Anim* 40: 76-78.
- Leroy JLMR, Vanholder T, Mateusen B, Christophe A, Opsomer G, De Kruif A, Genicot G, Van Soom A.** 2005b. Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro. *Reproduction* 130: 485-495.
- Li R, Whitworth K, Lai L, Wax D, Spate L, Murphy CN, Rieke A, Isom C, Hao Y, Zhong Z, Katayama M, Schatten H, Prather RS.** 2007. Concentration and composition of free amino acids and osmolalities of porcine oviductal and uterine fluid and their effects on development of porcine IVF embryos. *Mol Reprod Dev* 74: 1228-1235.
- Liu Z, Foote RH.** 1995. Effects of amino acids on the development of in-vitro matured/in-vitro fertilization bovine embryos in a simple protein-free medium. *Hum Reprod* 10: 2985-2991.
- Marei WF, Wathes DC, Fouladi-Nashta AA.** 2010. Impact of linoleic acid on bovine oocyte maturation and embryo development. *Reproduction* 139: 979-988.
- Marhuenda-Egea F, Gonsálvez-Álvarez R, Martínez-Sabater E, Lledó B, Ten J, Bernabeu R.** 2011. Improving human embryos selection in IVF: non-invasive metabolomic and chemometric approach. *Metabolomics* 7: 247-256.
- Marhuenda-Egea FC, Martínez-Sabater E, Gonsálvez-Álvarez R, Lledó B, Ten J, Bernabeu R.** 2010. A crucial step in assisted reproduction technology: human embryo selection using metabolomic evaluation. *Fertil Steril* 94: 772-774.
- Matorras R, Ruiz JI, Mendoza R, Ruiz N, Sanjurjo P, Rodríguez-Escudero FJ.** 1998. Fatty acid composition of fertilization-failed human oocytes. *Hum Reprod* 13: 2227-2230.
- Mcevoy TG, Coull GD, Broadbent PJ, Hutchinson JS, Speake BK.** 2000. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. *J Reprod Fertil* 118: 163-170.
- Mckiernan SH, Clayton MK, Bavister BD.** 1995. Analysis of stimulatory and inhibitory amino acids for development of hamster one-cell embryos in vitro. *Mol Reprod Dev* 42: 188-199.
- Montag M, Toth B, Strowitzki T.** 2013. New approaches to embryo selection. *Reprod Biomed Online* 27: 539-546.
- Montani DA, Cordeiro FB, Regiani T, Victorino AB, Pilau EJ, Gozzo FC, Ferreira CR, Fraietta R, Lo Turco EG.** 2012. The follicular microenvironment as a predictor of pregnancy: MALDI-TOF MS lipid profile in cumulus cells. *J Asst Reprod Genet* 29: 1289-1297.
- Nagy ZP, Sakkas D, Behr B.** 2008. Symposium: innovative techniques in human embryo viability assessment. Non-invasive assessment of embryo viability by metabolomic profiling of culture media ('metabolomics'). *Reprod Biomed Online* 17: 502-507.
- Nel-Themaat L, Nagy ZP.** 2011. A review of the promises and pitfalls of oocyte and embryo metabolomics. *Placenta* 32: 23.
- O'Fallon JV, Wright RW, Jr.** 1986. Quantitative determination of the pentose phosphate pathway in preimplantation mouse embryos. *Biol Reprod* 34: 58-64.
- Orsi NM, Leese HJ.** 2004. Amino acid metabolism of preimplantation bovine embryos cultured with bovine serum albumin or polyvinyl alcohol. *Theriogenology* 61: 561-572.
- Paczkowski M, Schoolcraft WB, Krisher RL.** 2014. Fatty acid metabolism during maturation affects glucose uptake and is essential to oocyte competence. *Reproduction* 148: 429-439.
- Panopoulos A, Yanes O, Ruiz S, Kida Y, Diep D, Tautenhahn R, Herrera-As AD, Batchelder E, Plongthongkum N, Lutz M, Berggren WT, Zhang K, Evans R, Siuzdak G, Ispisua Belmonte J.** 2012. The metabolome of induced pluripotent stem cells reveals metabolic changes occurring in somatic cell reprogramming. *Cell Res* 22: 168-177.
- Pantaleon M, Ryan JP, Gil M, Kaye PL.** 2001. An unusual subcellular localization of GLUT1 and link with metabolism in oocytes and preimplantation mouse embryos. *Biol Reprod* 64: 1247-1254.
- Petters RM, Johnson BH, Reed ML, Archibong AE.** 1990. Glucose, glutamine and inorganic phosphate in early development of the pig embryo in vitro. *J Reprod Fertil* 89: 269-275.
- Pudakalakatti SM, Uppangala S, D'souza F, Kalthur G, Kumar P, Adiga SK, Atreya HS.** 2013. NMR studies of preimplantation embryo metabolism in human assisted reproductive techniques: a new biomarker for assessment of embryo implantation potential. *NMR Biomed* 26: 20-27.
- Rieger D, Loskutoff NM, Betteridge KJ.** 1992. Developmentally related changes in the uptake and metabolism of glucose, glutamine and pyruvate by cattle embryos produced in vitro. *Reprod Fertil Dev* 4: 547-557.
- Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P.** 2002. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev* 61: 234-248.
- Rosenkrans CF, Jr., First NL.** 1994. Effect of free amino acids and vitamins on cleavage and developmental rate of bovine zygotes in vitro. *J Anim Sci* 72: 434-437.
- Saito T, Hiroi M, Kato T.** 1994. Development of glucose utilization studied in single oocytes and preimplantation embryos from mice. *Biol Reprod* 50: 266-270.
- Sakkas D, Morita H, Yamashita N, Kato O, Botros L, Roos P, Seli E.** 2008. Evaluation of Embryo Quality by Metabolomics: A New Strategy to Aid Single Embryo Transfer. *J Mamm Ova Res* 25: 26-31.
- Scott R, Seli E, Miller K, Sakkas D, Scott K, Burns DH.** 2008. Noninvasive metabolomic profiling of human embryo culture media using Raman spectroscopy predicts embryonic reproductive potential: a prospective blinded pilot study. *Fertil Steril* 90: 77-83.
- Seli E, Sakkas D, Scott R, Kwok SC, Rosendahl SM, Burns DH.** 2007. Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using Raman and near-infrared spectroscopy correlates with reproductive potential of

embryos in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 88: 1350-1357.

**Seli E, Vergouw CG, Morita H, Botros L, Roos P, Lambalk CB, Yamashita N, Kato O, Sakkas D.** 2010. Noninvasive metabolomic profiling as an adjunct to morphology for noninvasive embryo assessment in women undergoing single embryo transfer. *Fertil Steril* 94: 535-542.

**Singh R, Sinclair KD.** 2007. Metabolomics: approaches to assessing oocyte and embryo quality. *Theriogenology* 68 Suppl 1: S56-62.

**Smith DG, Sturmey RG.** 2013. Parallels between embryo and cancer cell metabolism. *Biochem Soc Trans* 41: 664-669.

**Somfai T, Kaneda M, Akagi S, Watanabe S, Haraguchi S, Mizutani E, Dang-Nguyen TQ, Geshi M, Kikuchi K, Nagai T.** 2011. Enhancement of lipid metabolism with L-carnitine during in vitro maturation improves nuclear maturation and cleavage ability of follicular porcine oocytes. *Reprod Fertil Dev* 23: 912-920.

**Spindler RE, Pukazhenthil BS, Wildt DE.** 2000. Oocyte metabolism predicts the development of cat embryos to blastocyst in vitro. *Mol Reprod Dev* 56: 163-171.

**Steeves TE, Gardner DK.** 1999. Temporal and differential effects of amino acids on bovine embryo development in culture. *Biol Reprod* 61: 731-740.

**Sturmey RG, Bermejo-Alvarez P, Gutierrez-Adan A, Rizos D, Leese HJ, Lonergan P.** 2010. Amino acid metabolism of bovine blastocysts: a biomarker of sex and viability.[Erratum appears in *Mol Reprod Dev*. 2010 May;77(5):472]. *Mol Reprod Dev* 77: 285-296.

**Sturmey RG, Brison DR, Leese HJ.** 2008. Symposium: innovative techniques in human embryo viability assessment. Assessing embryo viability by measurement of amino acid turnover. *Reprod BioMed Online* 17: 486-496.

**Sudano MJ, Santos VG, Tata A, Ferreira CR, Paschoal DM, Machado R, Buratini J, Eberlin MN, Landim-Alvarenga FD.** 2012. Phosphatidylcholine and Sphingomyelin Profiles Vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* In Vitro- and In Vivo-Produced Blastocysts. *Biol Reprod* 87: 130.

**Sutton-McDowall ML, Feil D, Robker RL, Thompson JG, Dunning KR.** 2012. Utilization of endogenous fatty acid stores for energy production in bovine preimplantation embryos. *Theriogenology* 77: 1632-1641.

**Suzuki C, Yoshioka K.** 2006. Effects of amino acid supplements and replacement of polyvinyl alcohol with bovine serum albumin in porcine zygote medium. *Reprod Fertil Dev* 18: 789-795.

**Takahashi Y, First NL.** 1992. In vitro development of bovine one cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology* 37: 963-978.

**Tervit HR, Whittingham DG, Rowson LEA.** 1972. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J Reprod Fertil* 30: 493-497.

**Thompson JG, Bell AC, Pugh PA, Tervit HR.** 1993. Metabolism of pyruvate by pre-elongation sheep embryos and effect of pyruvate and lactate concentrations during culture in vitro. *Reprod Fertil Dev* 5: 417-423.

**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.

**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, Simpson AC, Pugh PA, Wright RW, Jr., Tervit HR.** 1991. Glucose utilization by sheep embryos derived in vivo and in vitro. *Reprod Fertil Dev* 3: 571-576.

Uyar A, Seli E. 2014. Metabolomic assessment of embryo viability. *Sem Reprod Med* 32: 141-152.

**Van Hoeck V, Sturmey RG, Bermejo-Alvarez P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Leese HJ, Bols PEJ, Leroy J.** 2011. Elevated non-esterified fatty acid concentrations during bovine oocyte maturation compromise early embryo physiology. *PLoS ONE [Electronic Resource]* 6: e23183.

**Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB.** 2009. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324: 1029-1033.

**Vander Heiden MG, Locasale JW, Swanson KD, Sharfi H, Heffron GJ, Amador-Noguez D, Christofk HR, Wagner G, Rabinowitz JD, Asara JM, Cantley LC.** 2010. Evidence for an alternative glycolytic pathway in rapidly proliferating cells. *Science* 329: 1492-1499.

**Vergouw CG, Kieslinger DC, Kosteljik EH, Botros LL, Schats R, Hompes PG, Sakkas D, Lambalk CB.** 2012. Day 3 embryo selection by metabolomic profiling of culture medium with near-infrared spectroscopy as an adjunct to morphology: a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 27: 2304-2311.

**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.

**Wale PL, Gardner DK.** 2013. Oxygen affects the ability of mouse blastocysts to regulate ammonium. *Biol Reprod* 89: 75.

**Wales RG, Brinster RL.** 1968. The uptake of hexoses by pre-implantation mouse embryos in vitro. *J Reprod Fertil* 15: 415-422.

**Warburg O.** 1956. On the origin of cancer cells. *Science* 123: 309-314.

**Whitten WK, Biggers JD.** 1968. Complete development in vitro of the pre-implantation stages of the mouse in a simple chemically defined medium. *J Reprod Fertil* 17: 399-401.

**Wu GQ, Jia BY, Li JJ, Fu XW, Zhou GB, Hou YP, Zhu SE.** 2011. L-carnitine enhances oocyte maturation and development of parthenogenetic embryos in pigs. *Theriogenology* 76: 785-793.

**Yamada M, Takanashi K, Hamatani T, Hirayama A, Akutsu H, Fukunaga T, Ogawa S, Sugawara K, Shinoda K, Soga T, Umezawa A, Kuji N, Yoshimura Y, Tomita M.** 2012. A medium-chain fatty acid as an alternative energy source in mouse preimplantation development. *Sci Rep* 2: 5.

**Zhang J, Nuebel E, Daley G, Koehler C, Teitell M.** 2012. Metabolic regulation in pluripotent stem cells during

reprogramming and self-renewal. Cell Stem Cell 11: 589-595.

**Zivi E, Barash D, Aizenman E, Gibson D, Shufaro Y.** 2014. Zygote serine decreased uptake from the fertilization medium is associated with implantation and pregnancy. J Asst Reprod Genet 31: 889-897.

## Aspectos funcionais do plasma seminal e proteínas espermáticas e seu potencial como marcadores moleculares da fertilidade

A.A. Moura<sup>1,3</sup>, E. Memili<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

<sup>2</sup>Department of Dairy and Animal Sciences, Mississippi State University, MS, USA.

Título curto: Proteínas seminais e espermáticas como marcadores de fertilidade

### Resumo

Os componentes moleculares do espermatozoide e o meio que os circunda influencia a fertilidade do touro. A partir deste conceito, proteínas do plasma seminal modulam funções cruciais e eventos reprodutivos, como motilidade e capacitação espermática, proteção celular, reação acrossomal, fertilização e desenvolvimento embrionário. Proteínas do espermatozoide também são importantes para o sucesso da fertilização, ativação do oócito e desenvolvimento do embrião. Associações empíricas entre proteínas espermáticas e seminais e a fertilidade em bovinos indica que estas proteínas são potenciais marcadores moleculares do estatus reprodutivo do macho.

**Palavras-chave:** touro, fertilidade, proteínas, plasma seminal, espermatozoide

### Introdução

Gestação por inseminação artificial (IA) é o melhor indicador do potencial reprodutivo dos touros. Entretanto, esta informação se torna disponível apenas quando os animais estão maduros e foram selecionados para utilização comercial na indústria de IA. Ademais, critérios como motilidade e morfologia espermática apresentam associação limitada com a fertilidade real dos touros, particularmente em grupos de animais que foram selecionados intensivamente para a indústria de IA (Killian *et al.*, 1993; Moura, 2005; Moura *et al.*, 2006; De Oliveira *et al.*, 2013; Dogan *et al.*, 2015; Kaya and Memili, 2016). Diferenças significativas em fertilidade existe entre touros com parâmetros seminais “normais” e touros com defeitos espermáticos não-compensáveis podem nunca atingir uma fecundidade adequada (De Oliveira *et al.*, 2013; Dogan *et al.*, 2015; Kaya and Memili, 2016). Esta informação sugere que mecanismos pelos quais os perfis moleculares dos espermatozoides influenciam a fertilidade do touro ainda não estão completamente elucidados. Neste context, esforço em pesquisa foi empreendido para identificar marcadores moleculares da função do gameta e fertilidade em quase todos os animais de produção e humanos. Candidatos para marcadores são RNA, proteínas e moléculas dos espermatozoide e do fluido seminal, entre outros. Todos estes estudos são baseados na hipótese que componentes moleculares do espermatozoide e/ou do meio

circundante influencia a capacidade de fertilização dos touros. Considerando este conceito, a análise do proteoma de ambos espermatozoide e plasma seminal deve prover informação significativa sobre os mecanismos regulatórios o potencial de fertilização do espermatozoide e a performance reprodutiva dos touros. Assim, esta revisão discute os papéis de algumas proteínas escolhidas, oriundas do plasma seminal, e como sua expressão se relaciona com a fertilidade. Proteínas espermáticas e seu uso potencial como marcadores de fertilidade também são discutidos com foco na espécie bovina.

### Proteínas do plasma seminal

#### Proteínas envolvidas na proteção do espermatozoide

O plasma seminal contém proteínas que protegem o espermatozoide no epidídimo (Kraus *et al.*, 2005; Hinton *et al.*, 1995), após a ejaculação e no trato reprodutivo feminino. A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) faz parte da fisiologia espermática (MacLeod, 1943) porém, quando em excesso, ROS compromete a homeostase espermática por meio da peroxidação de lipídeos e redução de enzimas que regulam influxo de cálcio e perda de ATP (Ohta *et al.*, 1989; Aitken *et al.*, 1993). Para controlar os efeitos deletérios de ROS, o epidídimo secreta enzimas antioxidantes (Hinton *et al.*, 1996), como glutathione S-transferase, tioredoxina peroxidase, superóxido desmutase, glutathione peroxidase (GSHPx) e catalase (Alvarez e Storey, 1983; Jeulin *et al.*, 1989; Fouchécourt *et al.*, 2000; Dacheux *et al.*, 2006). GSHPx é uma das principais enzimas que protege o espermatozoide (Perry *et al.*, 1992; Dacheux *et al.*, 2005) e cataliza a redução do peróxido de hidrogênio (Halliwell and Gutteridge, 1990). Atividade de GSHPx aumentada em espermatozoides de carneiro está relacionada aos efeitos antioxidantes e manutenção da viabilidade espermática (Casao *et al.*, 2010). Outra molécula do plasma seminal conhecida como proteína ácida do fluido seminal (aSFP) também apresenta ação no controle do estresse oxidativo no trato reprodutor de bovinos (Einspanier *et al.*, 1993; Schöneck *et al.*, 1996). aSFP apresenta identidade com moléculas da família esperma-adesina (Romão *et al.*, 1997) e, no touro, é secretada pelo epidídimo e glândulas sexuais acessórias (Moura *et al.*, 2007a, 2010). A ligação da aSFP a um espermatozoide ejaculado ocorre mas é perdida após a capacitação

(Dòstolová *et al.*, 1994), sugerindo que, ao contrário das proteínas esperma-adesinas suínas (Caballero *et al.*, 2004, 2005), as bovinas não participam da interação espermatozoide-oócito. Adicionalmente, quelantes de íons do plasma seminal, como as lactoferrinas, protegem o espermatozoide contra os efeitos da peroxidação lipídica (Ochsendorf, 1999). A lactoferrina sequestra o íon ferro (Nozaki *et al.*, 2003) e adsorve o espermatozoide durante o trânsito epididimário (Jin *et al.*, 1997) e ejaculação (Thaler *et al.*, 1990), quando também possui efeito antimicrobiano. A albumina seminal, por sua vez, se liga às peroxidases lipídicas contribuindo para a proteção espermática (Alvarez e Storey, 1995) e apresenta correlação positiva com a porcentagem de espermatozoides normais no semen bovino (Elzanaty *et al.*, 2007). Clusterina é uma outra molécula seminal de papel protetor, que atua como chaperona (Humphreys *et al.*, 1999) e inibe a lise celular por mecanismos mediados pelo complemento presente na secreção feminina (Ibrahim *et al.*, 1999; Meri e Jarva, 2001). No epidídimo, algumas funções da clusterina estão relacionadas à maturação, transporte de lipídeos (Tenniswood *et al.*, 1992) e remodelamento da membrana espermática (Humphreys *et al.*, 1999). A atividade chaperona da clusterina é consistente com sua habilidade de interagir com diferentes tipos de proteína *in vivo* (Carver *et al.*, 2003). Análises *in silico* da rede de clusterinas indica que sua interação potencial com proteases e seus inibidores, como plasminogênio, alfa-2-macroglobulina, TIMP-1, alfa-2-antiplasma precursor e ativador do inibidor 1 do plasminogênio. Clusterina também tem supostas ligações com fibronectinas, que participam da adesão celular, cura de cicatrizes e manutenção da estrutura celular, receptores acoplados à proteína GTP e modulares do crescimento celular, como TGF $\beta$ 3. A clusterina do plasma seminal está inversamente relacionada à porcentagem de espermatozoides com membrana intacta em pecuárias (Peccari *tajacu* L.; Santos *et al.*, 2014) e com a porcentagem de espermatozoides normais no sêmen de touros Brahman (Boe-Hansen *et al.*, 2015). Em contraste, espermatozoides de touros e carneiros com defeitos morfológicos exibem extensiva ligação de clustering (Ibrahim *et al.*, 2001a, b). Esta associação provavelmente ocorre como resultado da habilidade da clusterina de se ligar a porções danificadas de regiões hidrofóbicas da membrana do espermatozoide (Bailey and Griswold 1999).

### Proteínas associadas à mobilidade espermática

O plasma seminal contém proteínas associadas com processos de motilidade espermática (Baas *et al.*, 1983), como as cininas-caliceínas. Neste caso, o quinogênio presente no plasma seminal age como substrato específico para caliceína (Fink *et al.*, 1989), produzindo os maiores efetores para estimulação da motilidade espermática após ejaculação (Schill *et al.*, 1989). Estudos demonstraram uma correlação positiva entre a atividade de caliceína do plasma seminal e a adição de caliceína exógena também é benéfica para a motilidade

espermática em bovinos (Somlev *et al.*, 1996). A enzima conversora de angiotensina (ACE) é outro componente do plasma seminal relacionada ao sistema da caliceína (Hohlbrugger *et al.*, 1984). ACE cataliza a formação de angiotensina II e liga a receptores no espermatozoide, intensificando eventos relativos à motilidade (Vinson *et al.*, 1996). A atividade de ACE no plasma seminal de ovinos se correlaciona positivamente com a concentração e a fertilidade espermática (Métayer *et al.*, 2001; Gatti *et al.*, 2004). A inibição da atividade da ACE no plasma seminal bovino diminui o número de espermatozoides com motilidade progressiva e inibe a reação acrossomal após a capacitação *in vitro* (Costa and Thundathil, 2012).

### Proteínas envolvidas na capacitação espermática

As proteínas ligantes de fosfolipídeos que pertencem à família das BSPs (proteínas ligadoras de espermatozoide) estão presentes no plasma seminal de várias espécies, inclusive touros, bodes, coelhos, carneiros, homem, roedores e garanhões (Moura *et al.*, 2007a; Souza *et al.*, 2012; Manjunath *et al.*, 2009; Plante *et al.*, 2016). BSPs correspondem aproximadamente a 60% de todas as proteínas do fluido das glândulas sexuais acessórias (Moura *et al.*, 2007a) e plasma seminal (Manjunath e Sairam, 1987) de touros *Bos taurus* e aproximadamente a mesma quantidade em plasma seminal de *Bos indicus* (Rego *et al.*, 2014). Em bovinos, proteínas BSP são secretadas como várias isoformas de 14-15 kDa (BSP1 e BSP3) e 30 kDa (BSP5). Ambas BSP1 e BSP5 possuem dois domínios de fibronectina tipo II arranjados em sequência e uma extensão aminoterminal que são O-glicosiladas em resíduos treonina. Estes atributos bioquímicos permitem à BSP1 e BSP5 interagir com o espermatozoide e modular a atividade ligante por mecanismos similares (Calvete *et al.*, 1996; Manjunath *et al.*, 2009), também compartilhando similaridades funcionais (Manjunath e Therien, 2002). As BSPs bovinas são típicas proteínas de glândulas sexuais acessórias e não existem relatos de sua expressão no epidídimo (Manjunath e Therien, 2002; Moura *et al.*, 2007a; Moura *et al.*, 2010). As BSPs se ligam ao espermatozoide do touro durante a ejaculação (Manjunath e Therien, 2002) e assim permanecem até o momento que o espermatozoide entra em contato com as secreções da tuba uterina *in vitro* (Souza *et al.*, 2008); após o espermatozoide ter passado pela reação acrossomal e ser submetido à congelamento e descongelamento (Rodríguez-Villamil *et al.*, 2016). As BSPs também medeiam a interação entre espermatozoide e o epitélio tubárico (Gwathmey *et al.*, 2006; Suarez, 2016). O papel mais estudado atribuído às BSPs é seu papel de ligar e remover fosfolipídeos e colesterol da membrana espermática, um dos primeiros eventos da capacitação (Thérien *et al.*, 1999). Os efeitos de capacitação das BSPs parece ser real em outras espécies também como camundongos (Plante e Manjunath, 2015) e humanos (Plante *et al.*, 2014). Entretanto, enquanto as BSPs de ruminantes tem origem principalmente nas glândulas sexuais acessórias, (Manjunath *et al.*, 2009; Souza *et al.*,

2012; van Tilburg *et al.*, 2014), sua expressão em camundongos e humanos ocorre no epidídimo.

Os papéis que as BSPs desempenham parecem ir além da capacitação espermática. Evidências experimentais indicam que a BSP1 contribui para a fertilização *in vitro* e desenvolvimento embrionário quando adicionada ao meio de fertilização. O estudo conduzido por Rodriguez-Villamil *et al.* (Rodriguez-Villamil *et al.*, 2016) avaliou complexos cumulus-oócito (COCs) incubados com espermatozoides de semen congelado e descongelado (18 h) em meio Fert-TALP contendo: heparina e concentrações diferentes de BSP1 (10, 20 ou 40 µg/mL). Com o ejaculado, as taxas de clivagem foram similares quando o meio Fert-TALP foi incubado com heparina (74,1 ± 2,7%), 10 µg/mL BSP1 (77,8 ± 3,1%) ou 20 µg/mL BSP1 (74 ± 2,0%). Taxas de blastocisto no dia 7 foram equivalentes após incubação com heparina (40,8 ± 5,0%) e 10 µg/mL BSP1 (34,1 ± 4,4%), mas houve redução acentuada na formação de blastocistos após o meio de IVF ter sido tratado com 20 µg/mL BSP1 (22,4 ± 2,9%) e 40 µg/mL BSP1 (19,3 ± 4,1%;  $p < 0,05$ ). Estes resultados confirmam que a BSP1 é tão eficiente quanto heparina para indução da capacitação espermática e a capacidade de fertilização de esperma congelado e descongelado. Entretanto o estudo também relatou um efeito nocivo da BSP1 no desenvolvimento embrionário *in vitro*. Este resultado pode ser o reflexo do dano induzido pela BSP1 no espermatozoide, dado o tempo de exposição durante a fertilização (18 h). Corroborando com estes resultados, estudos demonstram que o excesso de proteínas BSP e o tempo de exposição são prejudiciais ao esperma criopreservado em razão da desestabilização da membrana e influxo excessivo de colesterol e fosfolípidos. Ainda, uma investigação anterior mencionou que o conteúdo de BSP5 no fluido das glândulas sexuais acessórias apresenta uma associação quadrática com a fertilidade do touro (Moura *et al.*, 2006), sugerindo que muita BSP é prejudicial ao desenvolvimento embrionário e/ou espermático. Finalmente, a inclusão da BSP1 na solução de Percoll com esperma congelado e descongelado por um período curto de tempo (30 minutos), anteriormente à fertilização *in vitro*, foi prejudicial ao desenvolvimento embrionário (resultados não publicados). Neste caso, 40 µg/mL BSP1 foi tão eficiente quanto heparina para aumentar a capacidade de fertilização do espermatóide. Resultados obtidos com incubação de Percoll consubstanciaram o conceito que o efeito nocivo da BSP1 está relacionado ao tempo de exposição do espermatozoide a esta molécula.

Em outros experimentos COCs foram incubados com esperma congelado e descongelado oriundo da cauda do epidídimo (18 h) em meio Fert-TALP sem heparina, com heparina, 10, 20 ou 40 µg/mL BSP1. Neste caso, as taxas de clivagem e de blastocisto foram similares após os tratamentos com heparina (68,5 ± 1,3% and 24,7 ± 3,2%, respectivamente) ou sem heparina (65,5 ± 1,8% e 27,3 ± 1,6%, respectivamente). Clivagem foi maior após o tratamento com qualquer concentração de BSP1 (74,2 ± 2,7% a 79,0 ± 1,1%) do que sem heparina ( $p < 0,05$ ). Também, a clivagem foi melhor com 40 µg/mL de BSP1

(79,0 ± 1,1%) do que com heparina (68,5 ± 1,3%;  $p < 0,05$ ). O desenvolvimento embrionário foi maior ( $p < 0,05$ ) após tratamento com 20 µg/mL BSP1 (35,6 ± 2,5%) e 40 µg/mL (41,1 ± 2%) do que após incubações com heparina (24,7 ± 3,2%) ou sem heparina (27,3 ± 1,6%). Foi estabelecido que BSPs se ligam a fosfolípidos e colesterol de membrana, mas como isto ocorre ainda é motivo de debate. Interessantemente, o tratamento do meio de FIV (por 18 h) com BSP1 + heparina não melhorou os efeitos da BSP1 quando a fertilização ocorreu com esperma epididimário congelado e descongelado (resultados não publicados). Portanto, podemos concluir que: 1. Heparina apresenta efeito limitado em esperma *in vitro* da cauda do epidídimo, como avaliado pela fertilização e formação de blastocisto; 2. BSP1 apresenta um efeito melhor no desenvolvimento do embrião do que heparina; 3. Combinação de BSP1 com heparina não aumenta as taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário além dos obtidos pela BSP1 sozinha. Ao conduzir estudos em sistemas de FIV, também verificamos que BSP1 não causa reduções nas taxas de blastocisto após fertilização com espermatozoide epididimário, ao contrário do que foi observado em esperma ejaculado. Isto obviamente enfatiza que a exposição prévia ou não do espermatozoide ao plasma seminal determina como o espermatozoide responderá à BSP *in vitro*.

Apesar de todos os papéis importantes desempenhados pelas BSPs, estas moléculas também podem danificar o espermatozoide durante a criopreservação por extraírem colesterol e fosfolípidos da membrana de uma maneira dependente de tempo e de concentração (Manjunath *et al.*, 2002; Plante *et al.*, 2016). Estes efeitos deletérios acontecem quando o espermatozoide é exposto por longo tempo e/ou excess proteínas BSP, como acontece durante o resfriamento e congelamento. Neste sentido, extensors utilizados para preservação do espermatozoide, como gema de ovo (EY) e leite, contêm componentes que se associam com as BSPs (Manjunath *et al.*, 2002). No caso da EY, suas proteínas de baixa densidade interagem com BSPs bovinas (Bergeron e Manjunath, 2006) e as proteínas do leite também interagem com BSPs. Esta interação entre os componentes do leite e BSPs previne a ligação excessiva da BSP ao espermatozoide e remoção excessiva de fosfolípidos da membrana, sendo portanto o mecanismo fundamental pelo qual os componentes do leite protegem o espermatozoide durante a criopreservação (Plante *et al.*, 2015b). De fato, experimentos conduzidos com caprinos (Menezes *et al.*, 2016) mostraram que não apenas as proteínas do leite (caseína e β-lactoglobulina) podem se ligar às BSPs, mas também reduzir a interação da BSP com a membrana espermática. Atualmente, as proteínas BSP são as proteínas do plasma seminal mais estudadas nos mamíferos. Além de ser muito abundante em ruminantes, estudos conduzidos com touros confirmaram que as BSPs apresentam efeitos amplos no esperma ejaculado, inclusive capacitação, interação com o epitélio da tuba uterina e fertilização. O fato que as BSPs interagem com componentes extensors de semen sugere que estas proteínas são alvos potenciais para o desenvolvimento de

novos marcadores de fertilidade e biomoléculas que podem melhorar tecnologias reprodutivas artificiais.

### **Proteínas envolvidas na reação acrossomal e fertilização**

A fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) do plasma seminal participa da capacitação, reação acrossomal e fusão do espermatozoide com a membrana do oócito (Roldan e Shi, 2007; Pietrobon *et al.*, 2005; Soubeyrand *et al.*, 1997). PLA<sub>2</sub> também apresenta efeitos antimicrobianos e sua expressão no plasma seminal é associada à fertilidade em touros (Moura *et al.*, 2006). A análise do proteoma do plasma seminal demonstrou que osteopontina (OPN) à fertilidade *in vivo* fertility de touros Holandeses (Killian *et al.*, 1993; Moura *et al.*, 2006) e à capacidade de fertilização do espermatozoide da cauda do epidídimo tratado com fluido de glândulas sexuais acessórias durante a FIV (Henault *et al.*, 1995; Moura *et al.*, 2007b). De fato, a quantidade de OPN no plasma seminal de touros de alta fertilidade é 4 vezes mais alta do que em touros de baixa fertilidade (Moura *et al.*, 2006). A importância da OPN também foi demonstrada em experimentos de FIV. Neste sentido, a porcentagem de oócitos bovinos fertilizados foi reduzida significativamente pela adição de anticorpos anti-OPN ao meio de fertilização, e a exposição do espermatozoide ou oócito contra as integrinas  $\alpha_5$  e  $\alpha_v$  antes da fertilização diminuiu as taxas de fertilização *in vitro* (Gonçalves *et al.*, 2007). Ainda, o pré-tratamento de espermatozoide e oócito com OPN aumenta tanto a fertilização *in vitro* quanto o desenvolvimento embrionário inicial em bovinos (Gonçalves *et al.*, 2008). A sequência de amino-ácidos da osteopontina medeia sua ligação com integrinas  $\alpha_5$  e  $\alpha_v$  (Denhardt *et al.*, 2001; Wai e Kuo, 2004) e a habilidade da osteopontina de auxiliar a adesão celular é impedida quando a sequência RGD sofre mutação (Liaw *et al.*, 1995; Xuan *et al.*, 1995). O tratamento de espermatozoide ou oócito com o peptide RGD, mas não com a sequência RGE, reduz tanto o número de espermatozoide ligado à zona pelúcida quanto as taxas de fertilização, similar ao observado quando se utilizou anticorpos contra osteopontina. Resultados envolvendo anticorpos anti-RGD e anti-integrin sugerem que a OPN interage com o espermatozoide por meio de integrinas (Gonçalves *et al.*, 2007). A incubação dos oócitos com osteopontina purificada do leite bovino aumentou a taxa de clivagem no dia 4 (de  $78,1 \pm 1,3$  a  $85,8 \pm 1,4$  %), desenvolvimento do blastocisto no dia 8 (de  $24,2 \pm 1,2$  a  $33,8 \pm 1,4$  %) e blastocisto eclodido no dia 11 (de  $10,6 \pm 1,6$  a  $18,5 \pm 1,4$  %; Gonçalves *et al.*, 2007). Seguindo este conceito, OPN purificada do leite auxilia a capacitação espermática e, quando adicionada ao meio de FIV, a OPN aumentou a formação de blastocisto (Monaco *et al.*, 2009). Ainda, o congelamento de semen bovino com diferentes concentrações de OPN resultou em melhores taxas de fertilização *in vitro* ( $85 \pm 78 \pm 4$  % versus  $75 \pm 69 \pm 4$  %) e desenvolvimento do blastocisto no dia 8 ( $45 \pm 2,9$  a  $37 \pm 1,6$  % versus  $33 \pm 2,3$  a  $29 \pm 2,8$  %) em comparação ao sêmen não tratado (Gonçalves *et al.*, 2008). Em suínos, o tratamento do meio de fertilização com OPN recombinante

de rato, aumentou as taxas de fertilização em 41% e reduziu a polispermia (Hao *et al.*, 2006). OPN exógena adicionada ao meio de FIV aumentou a taxa de clivagem e o desenvolvimento dos embriões suínos e também inibiu a apoptose e a fragmentação do DNA (Hao *et al.*, 2008). Ademais, um estudo recente descreveu que anticorpos anti-OPN diminuíram eficientemente as taxas de fertilização *in vitro* e crescimento de blastocisto em camundongo (Liu *et al.*, 2015). Estas evidências adquiridas após experimentos com touros, cachos e camundongos embasam os efeitos da OPN nos eventos de fertilização e pós-fertilização.

A osteopontina está envolvida em adesão celular, remodelamento tecidual e extracelular, inflamação e eventos imuno-mediados (Wai e Kuo, 2004; Denhardt, 2002; Rittling e Singh, 2015; Bouleftour *et al.*, 2016). Apesar de informação substancial sobre as ações da osteopontina em diversos tecidos, uma compreensão de sua função na reprodução do macho ainda está longe de ser adquirida. Com base na literatura corrente e os atributos gerais da osteopontina, uma hipótese plausível foi sugerida por alguns autores sobre a OPN e a fertilização. Neste caso, a OPN secretada pelas glândulas sexuais acessórias se ligam aos espermatozoides na ejaculação por meio de integrinas e o complexo integrina-OPN interage com a zona pelúcida (D'Cruz, 1996). Este modelo é embasado pelo fato que o fluido da tuba uterina de bovinos contém OPN (Gabler *et al.*, 2003). Adicionalmente, a OPN se liga ao receptor CD44, que normalmente participa da adesão celular (Cichy e Puré, 2003) e é expresso tanto em espermatozoides (Bains *et al.*, 2002) quanto na membrana de oócitos (Schoenfelder e Einspanier, 2003). No touro, a osteopontina se liga à capsula acrossomal durante a ejaculação (Cancel *et al.*, 1999) e esta ligação espermatozoide-OPN ainda existe mesmo após o espermatozoide entrar em contato com secreções do fluido tubário e passar pela reação acrossomal *in vitro* (Souza *et al.*, 2008). Além da ligação do espermatozoide, a OPN interage com a zona pelúcida e o oolema de oócitos bovinos (Souza *et al.*, 2008). Sob a luz destes achados, propusemos que a OPN adere ao espermatozoide e este complexo conecta-se à zona pelúcida ou a OPN-zona pelúcida, dado que a osteopontina é capaz de formar ligações de alta afinidade com outras moléculas de OPN (Kartinen *et al.*, 1999; Goldsmith *et al.*, 2002). Após entrar no espaço perivitelino, a OPN aderida ao segmento pós-equatorial medeia a interação do espermatozoide com o oolema também por meio de integrinas e/ou CD44. Integrinas ( $\alpha_v$  e  $\alpha_5$ ) foram identificadas em espermatozoides bovinos (Erikson *et al.*, 2008) e humanos (Fusi *et al.*, 1996; Reddy *et al.*, 2003), assim como no oolema humano (D'Cruz, 1996). As proteínas transmembrânicas CD44 estão presentes no oócito e espermatozoide bovino, como mencionado acima. A interface da osteopontina do espermatozoide com as integrinas do oócito e os receptores de CD44 poderia desencadear a sinalização intracelular, como descrito para outros tipos de células (Wai e Kuo, 2004; Rasgawami *et al.*, 2006), e afetar a fertilização e o desenvolvimento embrionário inicial.

### Proteínas espermáticas e fertilidade

A saúde molecular e celular do espermatozoide são importantes para a reprodução nos mamíferos e as proteínas dos espermatozoides são vitais para fertilidade, habilidade do espermatozoide em fertilizar e ativar o ovo e apoiar o desenvolvimento do embrião. Proteínas espermáticas desempenham papéis importantes na integridade espermática, morfologia e funções, inclusive motilidade, capacitação, fertilização, ativação do ovo e desenvolvimento do embrião (Parisi *et al.*, 2013). Por exemplo, a proteína ODF2 (Outer dense fiber protein 2) é um componente da cauda do espermatozoide envolvida na motilidade, como descrito em camundongos (Tarnasky *et al.*, 2011) e tubulinas, como a tubulina beta-2C localizada na cauda espermática, são down-reguladas em casos de astenozoospermia (Siva *et al.*, 2010). Ainda, mutações no gene que codifica a proteína para canal de (CatSper) em camundongos resulta em movimentos espermáticos menos diretos no camundongo (Ren *et al.*, 2001).

A capacitação espermática é importante para a habilidade de fertilizar o ovo e muitas proteínas e vias de sinalização estão envolvidas na capacitação espermática. Neste sentido, a via extracelular regulada por quinase (ERK) está envolvida na fosforilação de tirosina e capacitação do espermatozoide do cachaço (Awda e Buhr, 2010) e a caseína quinase 2 (CKII) participa na sinalização do EGF em espermatozoide de touros holandeses com diferentes fertilidades. Após a fertilização, as proteínas espermáticas também estão envolvidas na ativação do ovo. A fosfolipase C Zeta 1 (PLCZ 1) espermática está envolvida em oscilações intracelulares de Ca<sup>2+</sup> (Cooney *et al.*, 2002) e a PAWP (postacrosomal sheath WW domain-binding protein) participa na ativação do ovo suíno e formação pronuclear, com diferentes efeitos potenciais no desenvolvimento do embrião (Wu *et al.*, 2007).

A estrutura nuclear do espermatozoide também é importante para a fertilidade. Experimentos demonstraram que o espermatozoide de touros contém várias histonas relacionadas à fertilidade (De Oliveira *et al.*, 2013) e que quantidades de Protamina 1 (PRM1) no espermatozoide estão correlacionadas com a performance reprodutiva dos touros (Dogan *et al.*, 2015). Estes estudos indicam que o espermatozoide contenha diferentes quantidades de histona, e as razões entre as protaminas e histonas determina a viabilidade espermática e portanto a fertilidade do touro.

### Conclusão

Em décadas recentes, novos métodos em proteômica permitiram a detecção de um número sem precedentes de proteínas no plasma seminal e espermatozoide humano, de espécies domésticas e silvestres. Este fato obviamente expandiu nosso conhecimento sobre o papel de moléculas presentes no fluido seminal e esperma e como elas definem a fertilidade dos machos. Associações empíricas existem entre algumas proteínas destas moléculas e índices de fertilidade bem como parâmetros espermáticos. Experimentos também confirmaram relações de causa e

efeito entre fatores masculinos (como osteopontina e BSPs) e fertilização *in vitro* e desenvolvimento inicial do embrião. Portanto, proteínas espermáticas e seminais são potenciais marcadores de fertilidade e podem ser utilizadas na indústria de biotecnologia animal.

### Referências

- Aitken RJ, Harkiss D, Buckingham D. 1993. Relationship between iron catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. *Journal of Reproduction and Fertility*, 98:257–265.
- Alvarez JG, Storey BT. 1983. Role of superoxide dismutase in protecting rabbit spermatozoa from O<sub>2</sub> toxicity due to lipid peroxidation. *Biology of Reproduction*, 28:1129–1136.
- Awda BJ, Buhr MM (2010) Extracellular signal-regulated kinases (ERKs) pathway and reactive oxygen species regulate tyrosine phosphorylation in capacitating boar spermatozoa. *Biology of Reproduction* 83: 750–758.
- Baas JW, Molan PC, Shannon P. 1983. Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 68:275–280.
- Bailey R, Griswold MD. 1999. Clusterin in the male reproductive system: localization and possible function. *Molecular and Cell Endocrinology*, 151:17–23.
- Bains R, Adeghe J, Carson J. 2002. Human sperm cells express CD44. *Fertility and Sterility*, 78:307–312.
- Bergeron A, Manjunath P. 2006. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular Reproduction and Development*, 73:1338–1344.
- Boe-Hansen GB, Rego JP, Crisp JM, Moura AA, Nouwens AS, Li Y, Venus B, Burns BM, McGowan MR. 2015. Seminal plasma proteins and their relationship with percentage of morphologically normal sperm in 2-year-old Brahman (*Bos indicus*) bulls. *Animal Reproduction Science*, 162:20–30.
- Bouleftour W. 2016. The role of the SIBLING, Bone Sialoprotein in skeletal biology - Contribution of mouse experimental genetics. *Matrix biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, 52–54:60–77.
- Caballero I, Vazquez JM, Gil MA, Calvete JJ, Roca J, Sanz L, Parrilla I, Garcia EM, Rodriguez-Martinez H, Martinez EA. 2004. Does seminal plasma PSP-I/PSP-II spermadhesin modulate the ability of boar spermatozoa to penetrate homologous oocytes *in vitro*? *Journal of Andrology*, 25:1004–1012.
- Caballero I, Vazquez JM, Rodriguez-Martinez H, Gill MA, Calvete JJ, Sanz L, Garcia EM, Roca J, Martinez EA. 2005. Influence of seminal plasma PSP-I/PSP-II spermadhesin on pig gamete interaction. *Zygote*, 13:11–16.
- Calvete JJ, Mann K, Sanz L, Raida M, Töpfer-Petersen E. 1996. The primary structure of BSP-30K, a major lipid-, gelatin-, and heparin-binding glycoprotein of bovine seminal plasma. *FEBS Lett*, 399:147–152.



- Cancel AM, Chapman DA, Killian GJ. 1999. Osteopontin localization in the Holstein bull reproductive tract. *Biology of Reproduction*, 60:454-460.
- Carver JA, Rekas A, Thorn DC, Wilson MR. 2003. Small heat-shock proteins and clusterin: intra- and extracellular molecular chaperones with a common mechanism of action and function? *IUBMB Life*, 55:661-668.
- Casao A, Cebrián I, Asumpção ME, Pérez-Pé R, Abecia JA, Forcada F, Cebrián-Pérez JA, Muñio-Blanco T. 2010. Seasonal variations of melatonin in ram seminal plasma are correlated to those of testosterone and antioxidant enzymes. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 11:59-66.
- Cichy J, Puré E. 2012. The liberation of CD44. *Journal of Cell Biology*, 161:839-843.
- Cooney MA, Malcuit C, Cheon B, Holland MK, Fissore RA, D'Cruz NT. 2010. Species specific differences in the activity and nuclear localization of murine and bovine phospholipase C zeta 1. *Biology of Reproduction*, 83: 92-101.
- Costa DS, Thundathil JC. 2012. Characterization and activity of angiotensin-converting enzyme in Holstein semen. *Animal Reproduction Science*, 133:35-42.
- D'Cruz OJ. 1996. Adhesion molecules in human sperm-oocyte interaction: relevance to infertility. *Frontiers in Bioscience*, 1:161-176.
- Dacheux JL, Belghazi M, Lanson Y, Dacheux F. 2006. Human epididymal secretome and proteome. *Molecular Cellular and Endocrinology*, 250:36-42.
- Dacheux JL, Castella S, Gatti JL, Dacheux F. 2005. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology*, 63:319-341.
- De Oliveira RV, Dogan S, Belser LE, Kaya A, Topper E, Moura A, Thibaudeau G, Memili E. 2013. Molecular morphology and function of bull spermatozoa linked to histones and associated with fertility. *Reproduction*, 146: 263-272.
- Denhardt DT. 2002. The third international conference on osteopontin and related proteins, San Antonio, Texas, May 10-12, 2002. *Calcified Tissue International*, 74:213-219.
- Dogan S, Vargovic P, Oliveira R, Belser LE, Kaya A, Moura A, Sutovsky P, Parrish J, Topper E, Memili E. 2015. Sperm protamine-status correlates to the fertility of breeding bulls. *Biology of reproduction* 92:1-9.
- Dostálová Z, Calvete JJ, Sanz L, Hettel C, Riedel D, Schöneck C, Einspanier R, Töpfer-Petersen E. 1994. Immunolocalization and quantitation of acidic seminal fluid protein (aSFP) in ejaculated, swim-up, and capacitated bull spermatozoa. *Biological Chemistry Hoppe Seyler*, 375:457-461.
- Elzanaty S, Erenpreiss J, Becker C. 2007. Seminal plasma albumin: origin and relation to the male reproductive parameters. *Andrologia*, 39:60-65.
- Einspanier R, Amselgruber W, Sinowatz F, Henle T, Ropke R, Schams D. 1993. Localization and concentration of a new bioactive acetic seminal fluid protein (asfp) in bulls (*Bos taurus*). *Journal of Reproduction and Fertility*, 98:241-244.
- Erikson DW, Way AL, Chapman DA, Killian GJ. 2008. Detection of osteopontin on Holstein bull spermatozoa, in cauda epididymal fluid and testis homogenates, and its potential role in bovine fertilization. *Reproduction*, 133:909-917.
- Fink E, Schill WB, Miska W. 1989. Kinin-containing kininogen is present in human seminal plasma. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 247:311-315.
- Fouchécourt S, Métayer S, Locatelli A, Dacheux F, Dacheux JL. 2000. Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization; secretion and dynamic changes of major proteins. *Biology of Reproduction*, 62:1790-1803.
- Fusi FM, Tamburini C, Mangili F, Montesano M, Ferrari A, Bronson R. 1996. The expression of alpha v, alpha 5, beta 1 and beta 3 integrin chains on ejaculated human spermatozoa varies with their functional state. *Molecular Human Reproduction* 2:169-175.
- Gabler C, Chapman DA, Killian GJ. 2003. Expression and presence of osteopontin and integrins in the bovine oviduct during the estrous cycle. *Reproduction*, 126:721-729.
- Gatti J, Castella S, Dacheux F, Ecroyd H, Métayer S, Thimon V, Dacheux J. 2004. Post-testicular sperm environment and fertility. *Animal Reproduction Science*, 82:321-339.
- Goldsmith HL, Labrosse JM, McIntosh FA, Maenpää PH, Kaartinen MX, McKee MD. 2002. Homotypic interactions of soluble and immobilized osteopontin. *Annals of Biomedical Engineering*, 30:840-850.
- Gonçalves RF, Staros AL, Killian GJ. 2008. Oviductal fluid proteins associated with the bovine zona pellucida and the effect on in vitro sperm-egg binding, fertilization and embryo 582 development. *Reproduction in Domestic Animals*, 43:720-729.
- Gonçalves RF, Wolinetz CD, Killian GJ. 2007. Influence of arginine-glycine-aspartic acid (RGD), integrins ( $\alpha$ v and  $\alpha$ 5) and osteopontin on bovine sperm-egg binding, and fertilization in vitro. *Theriogenology*, 67:468-474.
- Gonçalves RF, Chapman DA, Bertolla RP, Eder I, Killian GJ. 2008. Pre-treatment of cattle semen or oocytes with purified milk osteopontin affects in vitro fertilization and embryo development. *Animal Reproduction Science*, 108:375-383.
- Gwathmey TM, Ignatz GG, Mueller JL, Manjunath P, Suarez SS. 2006. Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. *Biology of Reproduction*, 75:501-507.
- Hao Y, Murphy CN, Spate L, Wax D, Zhong Z, Samuel M, Mathialagan N, Schatten H, Prather RS. 2008. Osteopontin improves in vitro development of porcine embryos and decreases apoptosis. *Molecular Reproduction and Development*, 75:291-298.
- Hao Y, Mathialagan N, Walters E, Mao J, Lai L, Becker D, Li W, Critser J, Prather RS. 2006. Osteopontin reduces polyspermy during in vitro fertilization of porcine oocytes. *Biology of Reproduction*, 75:726-733.

- Halliwell B, Gutteridge JMC.** 1990. The antioxidants of human extracellular fluids. *Archives in Biochemistry and Biophysics*, 280:1-8.
- Henault MA, Killian GJ, Kavanaugh JF, Griel LC Jr.** 1995. Effect of accessory sex gland fluid from bulls of differing fertilities on the ability of cauda epididymal sperm to penetrate zona-free bovine oocytes. *Biology of Reproduction*, 52:390-397.
- Hinton BT, Palladino MA, Rudolph D, Lan ZJ, Labus JC.** 1996. The role of the epididymis in the protection of spermatozoa. *Current Topics in Developmental Biology*, 33:61-102.
- Hinton BT, Palladino MA., Rudolph D, Labus JC.** 1995. The epididymis as protector of maturing spermatozoa. *Reproduction Fertility and Development*, 7:731-745.
- Hohlbrugger G, Pschorr J, Dahlheim H.** 1984. Angiotensin I-converting enzyme in the ejaculate of fertile and infertile men. *Fertility and Sterility*, 41:324-325.
- Hulboy DL, Rudolph LA, Matrisian LM.** 1997. Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. *Molecular Human Reproduction*, 3:27-45.
- Humphreys DT, Carver JA, Easterbrook-Smith SB, Wilson MR.** 1999. Clusterin has chaperone-like activity similar to that of small heat shock proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 274:6875-6881.
- Ibrahim NM, Troedsson MH, Foster DN, Loseth KJ, Farris JA, Blaschuk O, Crabo BG.** 1999. Reproductive tract secretions and bull spermatozoa contain different clusterin isoforms that cluster cells and inhibit complement-induced cytolysis. *Journal of Andrology*, 20:230-240.
- Ibrahim NM, Foster DN, Crabo BG.** 2001. Localization of clusterin on freeze-preserved bull spermatozoa before and after glass wool-sephadex filtration. *Journal of Andrology*, 22:891-902.
- Ibrahim NM, Romano JE, Troedsson MH, Crabo BG.** 2001. Effect of scrotal insulation on clusterin-positive cells in ram semen and their relationship to semen quality. *Journal of Andrology*, 22:863-877.
- Jeulin C, Soufir JC, Weber P, Laval-Martin D, Calvayrac R.** 1989. Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. *Gamete Research*, 24:185-196.
- Jin YZ, Bannai S, Dacheux F, Dacheux JL, Okamura N.** 1997. Direct evidence for the secretion of lactoferrin and its binding to sperm in the porcine epididymis. *Molecular Reproduction and Development*, 47:490-496.
- Jobim MIM, Oberst ER, Salbego CG, Souza DO, Wald VB, Tramontina F, Mattos RC.** 2004. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology*, 61:255-266.
- Kaya A, Memili E.** 2016. Sperm macromolecules associated with bull fertility. *Animal Reproduction Science*, 169:88-94.
- Kaartinen MT, Pirhonen A, Linnala-Kankkunen A, Mäenpää PH.** 1999. Cross-linking of osteopontin by tissue transglutaminase increases its collagen binding properties. *Journal of Biological Chemistry*, 274:1729-1735.
- Killian GJ, Chapman DA, Rogowski LA.** 1993. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biology of Reproduction*, 49:1202-1207.
- Kraus M, Tichá M, Zelezná B.** 2005. Characterization of human seminal plasma proteins homologous to boar AQN spermadhesins. *Journal of Reproductive Immunology*, 65:33-46.
- Liaw L1, Lindner V, Schwartz SM, Chambers AF, Giachelli CM.** 1995. Osteopontin and beta 3 integrin are coordinately expressed in regenerating endothelium in vivo and stimulate Arg-Gly-Asp-dependent endothelial migration in vitro. *Circulation Research*, 77:665-672.
- Liu Q1, Xie QZ1, Zhou Y1, Yang J1.** 2015. Osteopontin is expressed in the oviduct and promotes fertilization and preimplantation embryo development of mouse. *Zygote*, 23:622-630.
- Macleod J.** 1943. The role of oxygen in the metabolism and motility of the human spermatozoa. *American Journal of Physiology*, 138:512-518.
- Manjunath P, Sairam M.** 1987. Purification and biochemical characterization of three major acid proteins (BSP A1, BSP A2 and BSP A3) from bovine seminal plasma. *Biochemical Journal*, 7:685-692.
- Manjunath P, Therien I.** 2002. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *Journal of Reproductive Immunology*, 53:109-119.
- Manjunath P, Lefebvre J, Jois PS, Fan J, Wright MW.** 2009. New nomenclature for mammalian BSP genes. *Biology of Reproduction*, 80:394-397.
- Manjunath P, Nauc V, Bergeron A, Menard M.** 2002. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biology of Reproduction* 67:1250-1258.
- Menezes BM, van Tilburg M, Plante G, de Oliveira RV, Moura AA, Manjunath P.** 2016. Milk proteins interact with goat Binder of Sperm (BSP) proteins and decrease their binding to sperm. *Cell, Tissue and Research*, 2016 Jul 19. [Epub ahead of print]. DOI: 10.1007/s00441-016-2438-2.
- Meri S, Jarva, H.** 2001. Complement regulatory proteins. *Nature Encyclopedia of Life Sciences*, 1-7.
- Métayer S, Dacheux F, Guérin Y, Dacheux JL, Gatti JL.** 2001. Physiological and enzymatic properties of the ram epididymal soluble form of germinal angiotensin I-converting enzyme. *Biology of Reproduction*, 65:1332-1339.
- Monaco E, Gasparrini B, Boccia L, De Rosa A, Attanasio L, Zicarelli L, Killian G.** 2009. Effect of osteopontin (OPN) on in vitro embryo development in cattle. *Theriogenology*, 71:450-457.
- Moura AA, Chapman DA, Koc H, Killian GJ.** 2007a. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. *Animal Reproduction Science*, 98:169-188.
- Moura AA, Chapman DA, Killian GJ.** 2007b. Proteins of the accessory sex glands associated with the oocyte-penetrating capacity of cauda epididymal sperm from Holstein bulls of documented fertility. *Molecular Reproduction and Development*, 74:214-222, 2007.

- Moura AA, Koc H, Chapman DA, Killian GJ.** 2006. Identification of accessory sex gland fluid proteins as related to fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. *Journal of Andrology*, 27:201–211.
- Moura AA, Souza CE, Stanley BA, Chapman DA, Killian GJ.** 2010. Proteomics of cauda epididymal fluid from mature Holstein bulls. *Journal of Proteomics*, 73:2006–2020.
- Moura AA.** 2005. Seminal plasma proteins and fertility indexes in the bull: the case for osteopontin. *Animal Reproduction*, 2:3–10.
- Nozaki A, Ikeda M, Naganuma A, Nakamura T, Inudoh M, Tanaka K, Kato N.** 2003. Identification of a lactoferrin-derived peptide possessing binding activity to hepatitis C virus E2 envelope protein. *Journal of Biological Chemistry*, 278:10162–73.
- Ochsendorf FR.** 1999. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. *Humand Reproduction Update*, 5:399–420.
- Ohta A, Mohri T, Ohyashiki T.** 1989. Effect of lipid peroxidation on membrane-bound  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity of the intestinal brush-border membrane. *Biochemical Biophysical Acta*, 984:151–157.
- Parisi AM, Thompson SK, Kaya A, Memili E.** 2013. Molecular, cellular and physiological determinants of bull fertility. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 38:637–642.
- Perry AC, Jones R, Niang LS, Jackson RM, Hall L.** 1992. Genetic evidence for an androgen-regulated epididymal secretory glutathione peroxidase whose transcript does not contain a selenocysteine codon. *Biochemical Journal*, 285:863–870.
- Pietrobon EO, Soria M, Domínguez LA, MonclusMde L, Fornés MW.** 2005. Simultaneous activation of PLA2 and PLC are required to promote acrosomal reaction stimulated by progesterone via G-proteins. *Molecular Reproduction and Development*, 70:58–63.
- Plante G, Prud'homme B, Fan J, Lafleur M, Manjunath P.** 2016. Evolution and function of mammalian binder of sperm proteins. *Cell Tissue and Research*, 363:105–127.
- Plante G, Manjunath P.** 2015a. Murine binder of sperm protein homolog 1: a new player in HDL-induced capacitation. *Reproduction*, 149:367–376.
- Plante G, Lusignan MF, Lafleur M, Manjunath P.** 2015b. Interaction of milk proteins and Binder of Sperm (BSP) proteins from boar, stallion and ram semen. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 13:92–112.
- Plante G, Thérien I, Lachance C, Leclerc P, Fan J, Manjunath P.** 2014. Implication of the human Binder of Sperm Homolog 1 (BSPH1) protein in capacitation. *Molecular Human Reproduction*, 20:409–421.
- Rangaswami H, Bulbule A, Kundu GC.** 2006. Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression. *Trends in Cell Biology*, 16:79–87.
- Romao MJ, Kolln I, Dias JM, Carvalho AM, Romero A, Varela PF, Sanz L, Topfer-Petersen E, Calvete JJ.** 1997. Crystal structure of acidic seminal fluid protein (asfp) at 1.9 °Å resolution: a bovine polypeptide of the spermadhesin family. *Journal of Molecular Biology*, 274:650–660.
- Rego JP, Moura AA, Nouwens AS, McGowan MR, Boe-Hansen GB.** 2014. Seminal plasma proteome of electroejaculated *Bos indicus* bulls. *Animal Reproduction Science*, 148:1–17.
- Reddy VRK, Rajeev S, Gupta V.** 2003.  $\alpha 6\beta 1$  integrin is a potential clinical marker for evaluating sperm quality in men. *Fertility and Sterility*, 79:1590–1596.
- Ren D, Navarro B, Perez G, Jackson AC, Hsu S, Shi Q, Tilly JL, Clapham DE.** 2001. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature*, 413:603–609.
- Rittling S R, Singh R.** 2015. Osteopontin in immune-mediated diseases. *Journal of Dental Research*, 94:1638–1645.
- Rodríguez-Villamil P, Hoyos-Marulanda V, Martins JA, Oliveira AN, Aguiar LH, Moreno FB, Velho AL, Monteiro-Moreira AC, Moreira RA, Vasconcelos IM, Bertolini M, Moura AA.** 2016. Purification of binder of sperm protein 1 (BSP1) and its effects on bovine in vitro embryo development after fertilization with ejaculated and epididymal sperm. *Theriogenology*, 85:540–554.
- Roldan ER, Shi QX.** 2007. Sperm phospholipases and acrosomal exocytosis. *Frontiers in Bioscience*, 2:89–104.
- Santos EA, Sousa PC, Martins JA, Moreira RA, Monteiro-Moreira AC, Moreno FB, Oliveira MF, Moura AA, Silva AR.** 2014. Protein profile of the seminal plasma of collared peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758). *Reproduction*, 147:753–764.
- Siva AB1, Kameshwari DB, Singh V, Pavani K, Sundaram CS, Rangaraj N, Deenadayal M, Shivaji S.** 2010. Proteomics-based study on asthenozoospermia: differential expression of proteasome alpha complex. *Molecular Human Reproduction*, 16:452–462.
- Schill WB.** 1989. Significance of the kallikrein-kinin system in andrology. In: Fritz, H., Schmidt, I., Dietze, G. (Eds), *The kallikrein-kinin system in health and disease*. Braunschweig, 171–203.
- Schoenfelder M, Einspanier R.** 2003. Expression of hyaluronan synthases and corresponding hyaluronan receptors is differentially regulated during oocyte maturation in cattle. *Biology of Reproduction*, 69:269–277.
- Schöneck C, Braun J, Einspanier R.** 1996. Sperm viability is influenced in vitro by the bovine seminal protein aSFP: effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. *Theriogenology*, 45:633–642.
- Somlev B, Helili K, Karcheva V.** 1996. Tissue kallikrein activity in seminal plasma of bovine ejaculates with different quality. *Theriogenology*, 45:471–475.
- Soubeyrand S, Khadir A, Brindle Y, Manjunath P.** 1997. Purification of a novel phospholipase A2 from bovine seminal plasma. *Journal of Biological Chemistry*, 272:222–227.
- Souza CEA, Moura AA, Monaco E, Killian GJ.** 2008. Binding patterns of bovine seminal plasma proteins A1/A2, 30 kDa and osteopontin on ejaculated sperm before and after incubation with isthmic and ampullary oviductal fluid. *Animal Reproduction Science*, 105:72–89.

**Souza CE, Rego JP, Lobo CH, Oliveira JT, Nogueira FC, Domont GB, Fioramonte M, Gozzo FC, Moreno FB, Monteiro-Moreira AC, Figueiredo JR, Moura AA.** 2012. Proteomic analysis of the reproductive tract fluids from tropically-adapted Santa Ines rams. *Journal of Proteomics*, 75:4436-4456.

**Suarez SS.** 2016. Mammalian sperm interactions with the female reproductive tract. *Cell Tissue and Research*, 363:185-194.

**Tarnasky H, Cheng M, Ou Y, Thundathil JC, Oko R, van der Hoorn FA.** 2010. Gene trap mutation of murine outer dense fiber protein-2 gene can result in sperm tail abnormalities in mice with high percentage chimaerism. *BMC Developmental Biology*, 10:67-76.

**Tenniswood MP, Guenette RS, Lakins J, Mooibroek M, Wong P, Welsh JE.** 1992. Active cell death in hormone-dependent tissues. *Cancer Metastasis Reviews*, 11:197-220.

**Thaler CJ, Vanderpuye OA, McIntyre JA, Faulk WP.** 1990. Lactoferrin binding molecules in human seminal plasma. *Biology of Reproduction*, 43:712-717.

**Thérien I, Moreau R, Manjunath P.** 1999. Bovine seminal plasma phospholipid binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. *Biology of Reproduction*, 61:590-598.

**Thérien I, Moreau R, Manjunath P.** 1998. Major proteins of bovine seminal plasma and high density lipoprotein induces cholesterol efflux from epididymal sperm. *Biology of Reproduction*, 58:768-776.

**Therien I, Bleau G, Manjunath P.** 1995. Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. *Biology of Reproduction*, 52:1372-1379.

**van Tilburg MF, Salles MG, Silva MM, Moreira RA, Moreno FB, Monteiro-Moreira AC, Martins JA, Cândido MJ, Araújo AA, Moura AA.** 2014. Semen variables and sperm membrane protein profile of Saanen bucks (*Capra hircus*) in dry and rainy seasons of the Northeastern Brazil (3 degrees S). *International Journal of Biometeorology*, 59:561-573.

**Vinson GP, Mehta J, Evans S, Matthews, S, Puddefoot, JR, Saridogan E, Holt WV, Djahanbakhch O.** 1996. Angiotensin II stimulates sperm motility. *Regulatory Peptides*, 67:131-135.

**Wai PY, Kuo PC.** 2004. The role of osteopontin in tumor metastasis. *Journal of Surgical Research*, 121:228-241.

**Wu AT, Sutovsky P, Manandhar G, Xu W, Katayama M, Day BN, Park KW, Yi YJ, XiYW, Prather RS, Oko R.** 2007. PAWP, a sperm-specific WW domain-binding protein, promotes meiotic resumption and pronuclear development during fertilization. *Journal of Biological Chemistry*, 282:12164-12175.

**Xuan JW, Hota C, Shigeyama Y, D'Errico JA, Somerman MJ, Chambers AF.** 1995. Site-directed mutagenesis of the arginine-glycine-aspartic acid sequence in osteopontin destroys cell adhesion and migration functions. *Journal of Cellular Biochemistry*, 57:680-690.

## Marcadores de gestação: como podemos detectar prenhez em bovinos usando glicoproteínas associadas à gestação (PAGs) e microRNAs?

S.T. Reese<sup>1</sup>, M.C. Pereira<sup>2</sup>, J.L.M. Vasconcelos<sup>2</sup>, M.F. Smith<sup>3</sup>, J.A. Green<sup>3</sup>, T.W. Geary<sup>4</sup>, R.F.G Peres<sup>2</sup>, G.A. Perry<sup>5</sup>, K.G. Pohler<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Science, University of Tennessee, Knoxville, TN

<sup>2</sup>Departamento de Produção Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-UNESP, Botucatu, Brazil

<sup>3</sup>Division of Animal Science, University of Missouri, Columbia, MO

<sup>4</sup>USDA-ARS, Fort Keogh Livestock and Range Research Laboratory, Miles City, MT

<sup>5</sup>Department of Animal Science, South Dakota State University, Brookings, SD

Título curto: Marcadores de sucesso gestacional em bovinos

\*Autor para correspondência: [kpohler@utk.edu](mailto:kpohler@utk.edu)  
244 Brehm Animal Science, 2506 River Drive  
Knoxville, TN 37996

### Resumo

A detecção da prenhez tem evoluído ao longo das últimas décadas e a importância desta detecção é fundamental para minimizar a quantidade de tempo gasto por uma vaca não prenhe. Mortalidade embrionária (ME) é geralmente considerada o principal fator de limitação da taxa de prenhez em bovinos e ocorre no início (< dia 28) ou tardiamente (≥ dia 28) durante a gestação (dia 0 = estro). Em bovino, a incidência de ME precoce é aproximadamente de 20 a 40% e a incidência de ME tardia é aproximadamente 3.2 para 42,7%. Um esforço significativo tem sido direcionado para compreensão dos mecanismos que resultam na ME precoce até o dia 17; no entanto, relativamente é pouco conhecido sobre as causas ou mecanismos associados de ME após o dia 17. Baseado em trabalhos da área, numerosos pesquisadores buscam métodos de detecção da prenhez precoce ou de ME após o dia 17 de gestação. Esta revisão irá destacar algumas tecnologias e marcadores que estão sendo usados para a detecção da prenhez precoce e fornecer evidências de como a prenhez precoce pode ser detectada em bovino. Avanços na detecção embrionária ou prenhez precoce podem levar ao desenvolvimento de estratégias para superar as perdas de gestação precoce.

**Palavras-chave:** bovino, prenhez, placenta, mortalidade embrionária.

### Introdução

A prenhez bem sucedida é o fator mais importante para garantir uma operação eficiente e economicamente viável da carne ou de produtos lácteos. A fim de atingir esse ponto final, a perda na reprodução deve ser evitada. A identificação precoce de falha na prenhez é a chave para determinar estratégias de gestão mais eficazes e a capacidade de prever esta perda, oferece maior oportunidade de minimizar o seu impacto. Perda da prenhez pode ocorrer a qualquer momento entre a concepção e o parto; no entanto, alguns pontos neste período são mais críticos do que outros. Falha de prenhez afeta todos os bovinos; entretanto, a alta produção do gado de leite são mais suscetíveis a diminuição

das taxas de prenhez do que novilhas de leite e de corte (Diskin et al., 2011, Pohler et al., 2015a, Pohler et al., 2016a, Pohler et al., 2016b). Embora a taxa de fertilização em bovinos é muitas vezes superior a 85% (Santos et al., 2004, Diskin e Morris, 2008) tem ocorrido relatos de diferenças nas taxas de fertilização em bovinos de corte e de leite que resultam em uma grande quantidade de falhas reprodutivas (Breuelet et al., 1993, Sartori et al., 2002, Santos et al., 2004, Santos et al., 2009); no entanto, o foco desta revisão será em caso de falha pós fertilização e detecção. Além disso, as perdas fetais (> 45 dias de gestação) são baixas em cerca de 3% (Inskeep e Dailey, 2005). Assim, a perda reprodutiva durante a fase do embrião (dia 0-44) em desenvolvimento é substancial. A perda embrionária precoce pode ser classificada como perda que ocorre antes do dia 28 de prenhez. Embora a pulsação do coração embrionário pode ser detectado neste período através de ultra-som em tempo real, o conceito ainda não se assemelha a um bezerro. Causas de mortalidade embrionária precoce incluem mutações genéticas letais, assincronia uterina e falha de reconhecimento materno (Ayalon, 1978, Diskin e Morris, 2008). A perda embrionária precoce é geralmente aceita a conta de 20 a 40% de perda gestacional (Sreenan e Diskin, 1986, Inskeep e Dailey, 2005, Santos et al., 2004, Santos et al., 2009). Durante o período embrionário final, até ao dia 44, o crescimento pode ser caracterizado pelo desenvolvimento de membros, órbitas oculares e a formação de placentomas. Embora a mortalidade embrionária tardia representa menos de 10% de perda de prenhez, tem ocorrido implicações significativas para o produtor e tem sido sugerida a causa de maior encargo financeiro, seguido, da ME precoce (Diskin et al., 2008). Por volta do dia 45, o conceito têm a verdadeira forma de um feto com os cascos divididos, costelas e exibe movimentos limitados (Curran et al., 1986). Após dias 45 a 60 a perda de prenhez diminui e é inferior a 5% a partir do segundo e terceiro trimestre de prenhez.

Falhas na prenhez é extremamente oneroso para o produtor. Perda de rendimento pode ser atribuído ao custo da alimentação e manejo de vacas não prenhes, diminuição do peso dos bezerros nascidos no final do tempo de venda e uma porcentagem de partos diminui devido às vacas que perderam a prenhez. Em um estudo envolvendo vacas em

lactação, a perda de prenhez após 1 mês de gestação custou aos produtores uma média de \$ 555 (US), devido a repetição das despesas de reprodução, aumento do intervalo entre partos e uma maior probabilidade de involuntária de abate (De Vries, 2006). Em bovinos de corte que tiveram perda de prenhez e conseguiram emprenhar à uma reprodução posterior, há ainda uma quantidade significativa de perda da renda pela redução do peso de bezerros nascidos tardiamente e diminuição da uniformidade da safra do bezerro. O diagnóstico de gestação é uma ferramenta de gestão muito importante que é subutilizada nos Estados Unidos. De acordo com a USDA's 2008 do Sistema Nacional de Monitoramento de Saúde Animal (NAHMS) de pesquisa de corte, apenas 20% das operações utilizam o diagnóstico de prenhez por palpação ou ultra-som, um número que se manteve praticamente inalterado desde a pesquisa de 1997 (USDA, 2010). Em comparação, a pesquisa leiteira de 2007 NAHMS relatou 93% das operações realizam a detecção de prenhez (USDA, 2009). O diagnóstico de prenhez identifica vacas vazias, ajuda a estimar datas de parto, e ajuda os produtores a tomarem decisões de abate. Esta avaliação irá descrever vários métodos de diagnóstico de prenhez em bovinos e os avanços da pesquisas que podem permitir a detecção mais precoce da prenhez.

### **Métodos estabelecidos de diagnóstico de prenhez**

#### **Palpação Retal e ultra-sonografia**

À medida que o conceito desenvolve durante a prenhez, o acúmulo de fluido, os avanços na placentação, os métodos de detecção de prenhez permitem a palpação manual transrectal do útero pelo reto e do seu conteúdo. A palpação transrectal do útero, iniciando ao dia 35 de prenhez, permite a detecção da prenhez por palpação do fluido e da vesícula amniótica dentro do útero. Palpação do útero e do seu conteúdo é habitualmente praticada a partir de 40 a 60 dias após a inseminação com o limite de detecção mais precoce sendo aproximadamente 30 a 35 dias após a inseminação. A sensibilidade adicional pode ser obtida durante este intervalo de tempo, utilizando ultra-som transrectal para a detecção da prenhez (Lucy et al., 2011). O ultra-som é padrão para a determinação da prenhez e confirma a presença de um embrião viável. Ultra-sonografia transretal pode ser precisa do dia 26 a 29 para diagnosticar a prenhez e visualizar uma pulsação perceptível (Pierson e Ginther de 1984, Kastelic et al., 1988, Beal et al., 1992). O ultra-som Doppler pode fornecer informações adicionais com base na visualização do fluxo de sangue para a placenta /conceito; no entanto, os dados que suportam a sua utilização como método de diagnóstico de prenhez é confuso. Hoje, o ultra-som é considerado o único indicador visual de prenhez em bovinos e é usado para comparação de todas as tentativas recentes de diagnóstico de prenhez no início desta revisão. Com todas as técnicas de palpação e ultra-som, um indivíduo altamente experiente é necessário para concluir estes testes.

#### **Química baseada em Testes de Prenhez**

Os meios mais precoces e eficazes de diagnóstico de prenhez estão sendo constantemente procurados e avaliados. Numerosos testes de prenhez com bases químicas e bioquímicas, foram desenvolvidos e testados para utilização em bovinos. Cada um tem pontos fortes e fracos que levaram à sua adoção ou falta de uso em vários esquemas de produção. Uma consideração importante na avaliação de testes de diagnóstico de prenhez é a diferença entre métodos específicos de prenhez e não-prenhez. Marcadores específicos de prenhez são fisiologicamente presentes apenas em animais prenhes e são produzidos especificamente a partir da prenhez; enquanto que os marcadores específicos da não-prenhez elevados durante a prenhez, podem ser produzido sob outras condições fisiológicas.

A progesterona é um exemplo de um método de diagnóstico específico da não prenhez. A progesterona é um dos testes químicos mais comuns de prenhez comercialmente disponível, embora no geral, um percentual muito pequeno de produtores usam (USDA, 2009). Produzida pelo corpo lúteo (CL), a progesterona é um hormônio esteróide crucial para a manutenção da prenhez; no entanto, o perfil cíclico da progesterona na detecção da prenhez deve ocorrer entre a luteólise e a formação de um novo CL. Durante este período de tempo, as vacas não prenhes devem apresentar baixos níveis de progesterona, enquanto que as concentrações de progesterona em vacas prenhes devem permanecer elevadas. Diferenças significativas na concentração de progesterona aparecem entre vacas prenhes e não prenhes entre os dias 20-24 após a inseminação, tanto no soro e leite. O diagnóstico preciso de prenhez positivo variou entre 60 e 100% para a progesterone no leite, no entanto, a detecção de animais não prenhes variou entre 81 a 100% (Nebel e col., 1987, Sasser, 1987, Nebel, 1988). Longas fases luteínicas em algumas vacas, cistos ou folículos persistentes podem desempenhar um papel de concentrações elevadas de progesterona durante o período de teste de prenhez, que produzem resultados falsos positivos (Pohler et al., 2015a). Existem algumas discrepâncias na avaliação da eficácia do teste de progesterona com relação à perda de embrião. A pesquisa mostrou que as vacas prenhes com concentração de progesterona abaixo de 3,76 ng / ml na semana 5 foram mais propensas a experimentar a mortalidade embrionária antes da semana 9 do que vacas com uma maior concentração de progesterona (Starbuck et al., 2004). No entanto, deve se notar que a maioria das vacas (77%) no grupo de baixa concentração, manteve a prenhez até à semana 9. Um estudo posterior por Pohler et al. (2013), demonstrou que a concentração de progesterona no soro entre os dias 28 a 30 em vacas prenhes não foi preditiva de perda de prenhez entre um diagnóstico de prenhez positivo pela progesterona e confirmação final da prenhez no dia 70 de gestação.

Outro hormônio esteróide, sulfato de estrona é produzido pelo conceito e pode ser detectado no dia 100 de prenhez em bovino (Holdsworth et al., 1982). Sulfato de estrona é um marcador específico de prenhez, embora o seu período de detecção tardio limita sua utilização em animais domésticos. Embora os testes de prenhez com hormônio esteróide em grande parte foram substituídos em bovinos,

ovinos e suínos, a utilização de sulfato de estrona foi usado para a detecção de prenhez em animais não domésticos em estado selvagem e em zoológicos através de amostras não-invasivas, de fezes e urina. Sulfato de estrona foi avaliado com sucesso para uso na detecção de prenhez, em gorilas, orangotangos, babuínos e felinos selvagens (Kumar et al., 2013).

O Fator de Precoce da Prenhez (EPF), também conhecido como fator de concepção precoce, aparece na circulação materna logo após a fertilização. Em bovinos, EPF é observado dentro de 48 horas após o acasalamento e parece contribuir para supressão imune materna e preparação da implantação (Morton, 1998, Cordoba et al., 2001). Um estudo realizado por Athanasas-Platsis et al. (1989) demonstraram um papel crítico de EPF quando os ratinhos que haviam sido imunizados contra EPF diminuíram a viabilidade do embrião e um aumento da incidência de perda gestacional. Ação de EPF não está restrito à prenhez como as propriedades do fator de crescimento foram observadas em tumores. Uma grande porcentagem de perda do embrião ocorre após o tempo de amostragem recomendada de ensaios comerciais de EPF (48 h a 7 d). Estudos têm indicado que os testes comerciais de EPF tem uma sensibilidade (ou detecção de animais prenhes) de 45 para 86% e uma especificidade (ou detecção de animais não prenhes) de 4 para 28.8% (Cordoba et al., 2001, Gandy et al., 2001). Em relação ao EPF como um método de detecção de prenhez, os testes comerciais não são confiáveis na identificação dos animais não-prenhes o que limita o seu uso nesta capacidade.

O sinal do reconhecimento materno da prenhez em bovinos e outros ruminantes é o interferon tau (IFNT). O interferon-tau estimula a manutenção do CL através de ações endócrinas, como bloqueio de receptores de estrogênio e mecanismos parácrinos sobre

o endométrio (Pohler et al., 2015a, Spencer e Hansen, 2015). Devido à dificuldade associada à detecção de pequenas concentrações de IFNT, a investigação centrou-se na medição de *genes estimulados* por interferons (ISGs) que foram regulados positivamente em células sanguíneas de leucócitos do sangue periférico (PBL). Picos de concentração de mRNA de IFNT em conceptos bovinos no dia 20 pós-concepção (Han et al., 2006, Spencer e Hansen, 2015). Incluindo, os genes ISG15, Mx1 e Mx2 são mais altamente expressos em leucócitos do sangue periférico (PBL) de vacas prenhe que vacas não prenhe (Han et al., 2006, Gifford et al., 2007). Um estudo por Green, et al. (2010), mostrou que novilhas prenhes tiveram maior expressão de genes estimulados por IFNT do que vacas. Eles concluíram que um gene estimulado por IFNT com base em teste de prenhez, seria possível para as novilhas no dia 18, mas não para vacas cuja resposta é mais limitada baseado na sensibilidade atual de ensaios disponíveis (Green et al., 2010). Infelizmente, ISGs não são exclusivos de prenhez, que limita a sua utilização como uma ferramenta de detecção de prenhez para identificação dos animais não-prenhes (Han et al., 2006, Gifford et al., 2007, Pohler et al., 2015a); no entanto, um protocolo de resincronização pode ser implementado em vacas que são identificadas como não-prenhes para melhorar a eficiência de operação (Lucy et al., 2011).

### **MiRNAs: biomarcadores potenciais para o diagnóstico de prenhez**

A busca de biomarcadores facilmente acessíveis de diversas doenças e estados fisiológicos tem-se centrado recentemente sobre microRNAs (miRNA). Entre 18 e 22 nucleótidos de comprimento, miARNs desempenham papéis importantes na regulação da expressão de genes e têm sido encontradas em fluidos biológicos que variam a partir do soro e do líquido amniótico para a urina e leite (Reid et al., 2011, Pohler et al., 2015a). MicroRNAs são liberados por células da maioria dos tipos de tecido com membrana de plasmática acoplada à vesículas extracelulares (VE), especialmente exossomos. O empacotamento de miARN em VE ou exossomos é importante do ponto de vista de detecção de como as RNAses são incapazes de penetrar e de desarranjar, permitindo que o miRNA ser extraído a partir do sangue e de soro (Reid et al., 2011). Exossomos e VEs desempenham um papel crucial na comunicação intercelular, incluindo a promoção da maturação do esperma, regulação da função imune, liberação de miRNA para uma ampla gama de funções de regulação, bem como outras funções atualmente a serem estudadas (Raposo e Stoorvogel, 2013). O soro e o sangue total têm-se revelado uma fonte aceitável de perfis de miRNA derivados de VE, proporcionando assim um potente candidato à biomarcador transmitido pelo sangue para vários estados patológicos e fisiológicos (Häusler et al., 2010, Reid et al., 2011). Com base em pesquisa de doença humana, revelou-se diferenças significativas na abundância de miRNA para muitos cânceres (Lawrie et al., 2008, Häusler et al., 2010), doenças do coração (Tijssen et al., 2010) e sepse (Wang et al., 2010). Além disso, a circulação de miRNAs no soro materno têm sido observado como potencial biomarcador do estado de prenhez, devido ao seu impacto significativo sobre a expressão do gene e regulação (Chim et al., 2008). Um estudo realizado por Gilad et al. (2008) identificou os miRNAs que são aumentados em abundância em mulheres grávidas, mas não em não-grávidas. Esta descoberta levou à rápida expansão da identificação de miRNAs que eram específicos da prenhez e de várias espécies, embora nenhuma delas tenha sido minuciosamente explicada.

Um estudo inicial de marcadores específicos de prenhez em éguas identificou 7 miRNAs que só foram expressos em éguas prenhes (Cameron et al., 2011), em comparação com os controles não-prenhes. Além disso, o trabalho em ovelhas confirmou a presença de miRNA no fluido do lúmen uterino em ovelhas prenhes e cíclicas (Burns et al., 2014). Estes dados suportam a ideia de um provável papel do miRNA em interações conceito-endométrio durante o estabelecimento da prenhez (Burns et al., 2014). Além disso, um estudo de seguimento descrito acima, fornece evidências de que os VE são produzidos a partir do trofotoderma e epitélios uterinos em ovelhas prenhes e estão envolvidos na comunicação intercelular (Burns et al., 2016).

Muitos grupos estão a olhando para miRNAs como biomarcadores para a detecção de prenhez em vaca. Há cada vez mais evidências de que existem miRNAs específicos da prenhez e podem ser potenciais marcadores para diagnóstico

de gestação. Em 2015, foram notificados miRNAs exosomal a ser diferencialmente expressos em vacas prenhes contra não-prenhes e vacas submetidas a mortalidade embrionária precoce (Pohler et al., 2015b). Um estudo recente da Fiandanese, et al. (2016) identificou um potencial miRNA, BTA-mir 140, como um biomarcador precoce para detecção de prenhez. No dia 19, BTA-mir 140 estava regulamentado em todas as vacas prenhes, e no dia 13 em diante, foi regulado em vacas prenhes não lactantes (Fiandanese et al., 2016). Da mesma forma, Ioannidis e Donadeu (2016) identificou 6 miRNA (Dia 16: BTA-miR-26a, BTA-miR-29c, BTA-miR-138, BTA-miR-204 Dia 24: BTA-miR-1249 Dia 16 e 24: hsa-miR-4532), que foram diferencialmente expressos em novilhas prenhes. Apesar do refinamento necessário para identificar o miRNA ideal para diagnóstico de gestação, os resultados indicam os miRNAs como uma ferramenta potencial de detecção de prenhez precoce. Além disso, o miRNA pode fornecer informações para denotar viabilidade embrionária. Os dados preliminares de nosso laboratório indicam que vacas que passaram pela experiência de mortalidade embrionária em comparação com as vacas que obtiveram prenheses bem sucedidas, tem um aumento significativo da abundância de miRNAs específicos nos dias 17 e 24 de gestação. Futuros estudos são necessários para avaliar a repetibilidade destes resultados e determinar miRNA mais precisos aplicáveis para a análise de viabilidade do embrião.

#### **Desenvolvimento de método de diagnóstico de prenhez precoce; glicoproteínas associadas à prenhez**

A Placentação adequada é crucial para o desenvolvimento da prenhez e, finalmente, o sucesso da prenhez. A ativa placentação ocorre na vaca entre os dias 28 e 40 de gestação (Aires et al., 2014). A placentação bovina envolve a adesão entre as estruturas da carúncula materna e tecidos fetais cotiledonares para formar placentônios. A interação superficial começa por volta do dia 20 em bovinos entre microvilosidades do trofotoderma e do epitélio uterino. Placentônios verdadeiros, marcado por aumento do comprimento das vilosidades e do tecido do endométrio caruncular são distintos no dia 31 a 33 de gestação. Por volta do dia 39, placentônios são facilmente perceptível e têm longas vilosidades, ocasionalmente ramificações (King et al., 1979).

Células trofoblásticas binucleadas (BNCs) aparecem no córion fetal de ruminantes nos dias 18 e 19 de gestação e compreendem 15 a 20% do trofotoderma durante toda a prenhez. As células trofoblásticas binucleadas migram para o epitélio materno do córion fetal após a maturação, mas não penetram na membrana basal (King e Atkinson, 1987). O contato entre a interface materno-fetal na junção de microvilosidades permite a migração de BNC na direção da membrana basal para o início (Wooding e Wathes, 1980, Wooding e Burton, 2008). Produtos de BNC, incluindo hormônios, lactogênio placentário e glicoproteínas associadas a prenhez (PAGs), são embalados em grânulos de secreção e entram na circulação materna através da membrana basal (Pohler et al., 2015a).

#### **Produção de PAG**

Glicoproteínas associadas foram identificados na década de 1980, durante as primeiras tentativas para desenvolver marcadores específicos de prenhez que poderiam ser usados para o diagnóstico de prenhez. Embora as PAGs são pensadas muitas vezes para ser produzida por BNCs, Green et al. (2000) relataram que as PAGs podem ser classificadas em duas famílias distintas com base na sua expressão de células trofoblásticas. Algumas PAGs são expressas em ambos os conectores BNC e células trofoblásticas mononucleadas, enquanto outras são produzidas apenas em BNC (Green et al., 2000). Embora a função fisiológica é desconhecida, têm sido descrito um grande número de distintas PAGs e mais do que duas dezenas de genes específicos de PAG. Com base na acumulação de PAGs na junção entre útero e placenta e conhecida atividade proteolítica de certos PAGs, foi levantada a hipótese de que PAGs podem ajudar a fatores de crescimento ou no processo de adesão (Wallace et al., 2015). Com base na evidência de que PAGs pode inibir determinadas células do sistema imunológico, também podem desempenhar um papel no disfarce de antígenos do sistema imune materno (Perry et al., 2005). Depois do aparecimento de BNCs e adesão do trofoblasto epitelial, o primeiro aumento considerável na concentração de PAG ocorre entre os dias 22 a 24 de gestação. As concentrações de PAG continuam a aumentar até ao dia 36, seguido por subsequente diminuição de concentração até o dia 60 de prenhez seguido de um aumento constante através do segundo e terceiro trimestres de prenhez. Nas semanas que antecedem o parto, um aumento substancial das concentrações de PAG circulantes ocorre em picos até o parto. Isto pode ser atribuído ao crescimento placentário significativo no final da gestação ou a liberação de PAG armazenado a partir de outros tecidos (Green et al., 2005, Pohler et al., 2013). Oito semanas após o parto, PAGs não são detectáveis na circulação materna (Green et al., 2005).

#### **PAGs e diagnóstico de prenhez**

Desde a sua descoberta, as PAGs tem sido um alvo para o diagnóstico de gestação. Proteína B específica da prenhez foi a identificada pela primeira vez em PAG de interesse por cientistas que procuram marcadores específicos da prenhez que poderiam ser detectados no início da gestação, na década de 1980 (Butler et al., 1982, Sasser et al., 1986). Usando ensaios iniciais, PAGs eram detectáveis no dia 24 de gestação em bovinos; no entanto, a função fisiológica é desconhecida, que ainda é o caso hoje. Descoberta de múltiplas famílias PAG e genes, tem contribuído para a compreensão da complexidade crescente das PAGs. O radioimunoensaio (RIA), desenvolvido pela primeira vez logo após a detecção da proteína B específica da prenhez foi o padrão para a detecção de PAG, durante muitos anos (Zoli et al., 1992). Este ensaio foi altamente específico e o estudo de validação concluiu que as PAGs foram segregadas para o sistema materno e eram únicas para animais prenhes. Um estudo de Green et al. (2005) validado um ELISA direcionado especificamente para PAGs



secretadas no início da gestação que tinha uma meia-vida mais curta (4,3 dias versus 8,4 dias) do que alvos anteriores para reduzir o potencial de falsos positivos em vacas pós-parto (Zoli et al., 1992, de Sousa et al., 2003, Green et al., 2005). O ELISA foi demonstrado para detectar com precisão vacas prenhes via concentrações séricas de PAGs no dia 28 após a inseminação. Estudos comparando a eficácia do ELISA PAG, PAG RIA e ultra-sonografia transretal revelou resultados comparáveis para o diagnóstico de gestação em bovinos no dia 28 de gestação, embora tenham sido identificadas algumas diferenças na capacidade de determinados ensaios para detectar os animais não-prenhes (Szenci et al., 1998, Karen et al., 2015).

Testes PAG comerciais estão atualmente disponíveis usando ambos, amostras de leite e sangue, e incluem BioPRYN (BioTracking LLC. Moscow, ID EUA), teste de prenhez bovino IDEXX (IDEXX Laboratories Inc. Westbrook, ME EUA) e teste de prenhez DG29 (Genex Cooperative Inc. Shawano, WI EUA). BioPRYN aceita amostras de sangue de novilhas 25 dias após a reprodução e vacas 28 dias após a reprodução, IDEXX recomenda amostras de sangue ou de leite do dia 28 e DG29 foi validado usando amostras de sangue do dia 29. No momento de amostragem recomendado, todos os testes comerciais proporcionaram 98-99% leitura verdadeiro positivo (prenhe) e falsos positivo (relatado como prenhe mas vazia) taxas variam de 1-5%, no entanto, alguma variação pode ser devido a mortalidade embrionária tardia.

### Diagnóstico precoce de gestação

A pesquisa atual está focada na busca de marcadores e aumento da sensibilidade para identificar vacas prenhes antes do dia 28 de gestação. Embora o diagnóstico é limitada ao período de tempo após a introdução de PAGs na circulação materna nos dias 19 a 20, uma pesquisa preliminar indica que PAGs podem ser eficaz no diagnóstico de prenhez tão cedo quanto o dia 24. Atualmente, a pesquisa está focada em novilhas, pois apresentam maiores concentrações de PAG no início da gestação em comparação com vacas. Um estudo recente no Brasil avaliou a precisão do diagnóstico de gestação no dia 24 em predominantemente novilhas da raça holandesa após o tempo limite de transferência de embriões (Reese et al., 2016). As concentrações séricas de PAG no dia 24 diferiram entre bezerras prenhes (2,98 ng / ml) e não prenhes (0,69 ng / ml). Usando a análise da *curva operacional do receptor*, concentrações superiores de PAG a 1,39 ng / mL foram de 95% de precisão para o diagnóstico de uma novilha prenhe no dia 24 de gestação. Usando uma amostra base do dia 17, a diferença entre o dia 24 e o dia 17 previu 79% das gestações. Este, diagnóstico precoce de gestação utilizando PAG é possível; no entanto, é necessário mais trabalhos na área. É realista assumir que as concentrações de PAG no dia 24 pode diagnosticar gestação, mas altas taxas de perda embrionária antes do dia padrão de 30 testes pode diminuir a eficiência e os benefícios dos testes iniciais. Em um estudo recente, a mortalidade embrionária entre o dia 24 e 31 de gestação foi de 20,8% em vacas, assim, a perda da prenhez após o reconhecimento materno da gestação pode ser mais

prevalente do que se pensava anteriormente que o diagnóstico de prenhez precoce seria menos útil (Pohler et al., 2016b).

#### PAGs como indicadores de sucesso embrionário

Estudos recentes têm demonstrado uma forte correlação entre prenhez bem sucedidas e concentrações de PAG durante a gestação precoce. Aumento das concentrações circulantes de PAG aproximadamente no dia 28 de gestação são geralmente previsão de aumento da sobrevivência embrionária, tornando PAG um marcador provável para avaliar a viabilidade do embrião e competência da placenta. Em comparação com a progesterona, que não exibe nenhuma diferença entre bezerras ou vacas que se submetem a mortalidade embrionária e aqueles que mantêm a prenhez, concentrações de PAG são significativamente diferentes entre novilhas e vacas (Figura 1; Mate et al., 2013). Concentrações séricas de PAG em vacas que mantiveram a prenhez ( $4,53 \pm 0,34$  ng / ml) foram significativamente maiores do que as vacas que sofreram a perda da prenhez ( $3,14 \pm 0,72$  ng / ml) após a detecção do batimento cardíaco fetal no dia 28 (Pohler et al., 2013). Todas as vacas tiveram uma prenhez com um batimento cardíaco fetal no dia 28, indicando uma prenhez viável naquele momento. Talvez mais importante, as PAGs parecem ser particularmente eficazes para identificar vacas que serão submetidas a mortalidade embrionária tardia ou precoce fetal. Como as concentrações séricas aumentadas, a probabilidade da mortalidade embrionária diminui significativa. A mortalidade embrionária tardia entre os dias 31 e 59 foi previsto com precisão de 95% se as concentrações PAG foram  $<1,4$  ng / ml no dia 31 após a inseminação artificial em tempo fixo (Pohler et al., 2016b). Pohler et al. (2016a) demonstraram que ambas as vacas *Bos indicus* e *Bos taurus* que experimentaram mortalidade embrionária tiveram concentração de PAG semelhante e menor no dia 28, apesar das diferenças significativas entre as concentrações de PAG de prenhez bem sucedida em vacas *Bos taurus* comparadas com vacas *Bos indicus* (Figura 2).

Uma infinidade de fatores podem afetar as concentrações circulantes de PAG incluindo subespécies, paridade e reprodutor. Apesar de uma correlação entre a dimensão embrionária e tamanho da placenta, os resultados indicam nenhuma relação significativa entre a concentração de PAG e tamanho do embrião durante a gestação precoce (Pohler et al., 2014). A falta de correlação indica que a diminuição da concentração de PAG em vacas que experimentaram mortalidade embrionária tardia é indicativo de placenta ou função endometrial comprometida, não lento crescimento embrionário. Além disso, animais *Bos indicus* tendem a ter maiores concentrações circulantes de PAG em comparação com animais *Bos taurus* (Pohler et al., 2016a). Qualquer influência *Bos indicus* na base genética vai aumentar as concentrações PAG sobre uma vaca *Bos taurus* pura (Mercadante et al., 2013). Outros relataram que os perfis de PAG circulante são semelhantes entre subespécies, embora vacas *Bos indicus* podem ter um aumento relativo menor nas semanas anteriores ao parto (de Sousa et al., 2003). Vacas de alta produção de leite apresentam uma correlação negativa significativa entre a produção de leite e concentração de PAG. Num estudo realizado por Lopez-

Gatius et al. (2007), cada aumento de 1 kg de leite resultou numa diminuição da PAG de 0,08 a 0,1 ng / mL. Talvez

ainda mais interessante são os efeitos de paridade e de reprodução sobre as concentrações de PAG.

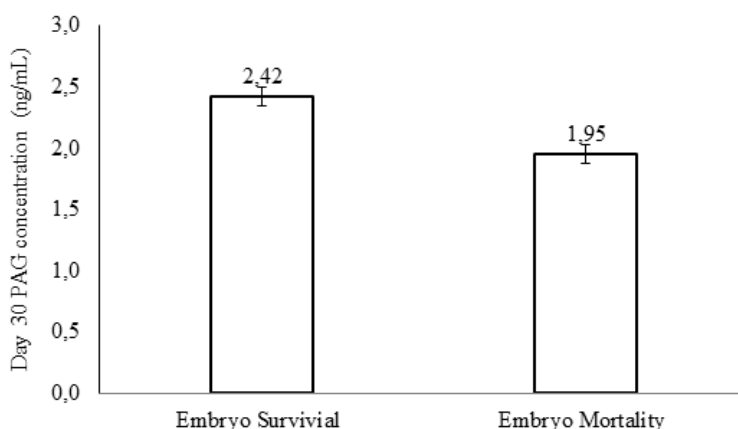


Figura 1. As concentrações séricas de glicoproteínas associadas à prenhez(PAGs) em novilhas que tiveram batimentos cardíacos embrionários no dia 30 e mantiveram a prenhez (sobrevivência de embriões; n = 406) ou não mantiveram a prenhez (mortalidade embrionária; n = 21). Novilhas que tiveram mortalidade embrionária entre os dias 30 e 65 de gestação tinham concentrações séricas de PAG significativamente menores do que as novilhas que mantiveram a prenhez.

As novilhas foram consistentemente relatadas à ter maior concentração PAG e, com o aumento da paridade, a concentração média de PAG seguidamente diminuiu de forma um tanto linear até o 3º ou 4º parto (Lobago et al., 2009, Ricci et al., 2015, Pohler et al., 2016a). Um trabalho recente examinou diferenças genéticas, sobre a concentração de PAG devido à influência paterna sobre trofoblasto e desenvolvimento da placenta. Evidências preliminares sugerem que gestações produzidas por touros responsáveis por taxas menores de ME tardia podem apresentar aumento das concentrações de PAG comparado com touros que resultam em aumento das taxas de ME tardia (Pohler et al., 2016a).

Expressão do estro no momento da inseminação ou antes da transferência do embrião foi diretamente correlacionada com o sucesso da prenhez em ambos os bovinos de corte e de leite (Perry et al., 2005, Pereira et al., 2016). Em um estudo recente (Pereira et al., 2016), vacas em lactação submetidas à IATF ou transferência de embriões tinham aumento da fertilidade e diminuição da mortalidade

embrionárias se exibiu estro contra aqueles que não apresentaram estro. Além disso, vacas em lactação com perda de prenhez diminuíram as concentrações circulantes de PAGs no início da gestação (Pohler et al., 2016b), semelhante ao estudo atual. Em um estudo pós-parto com vacas de corte, houve um aumento das concentrações de PAG no dia 28 de gestação quando se compararam os escores estrotec em IATF (dia 0). Surpreendentemente, o trabalho anterior não demonstrou uma associação com estradiol pré / pós-ovulatória ou a produção de progesterona com a produção de PAG no início da gestação (Pohler et al., 2013).

Assim, estes dados indicam que as vacas que apresentam estro e concebem, aumentaram as concentrações circulantes de PAGs no dia 28 e aumentaram a probabilidade de sucesso de prenhez em comparação com as vacas prenhes que não expressaram estro por IATF. Futuros experimentos são necessários nesta área para que realmente entenda a relação e o mecanismo potencial que está subjacente a este aumento da produção de PAG.

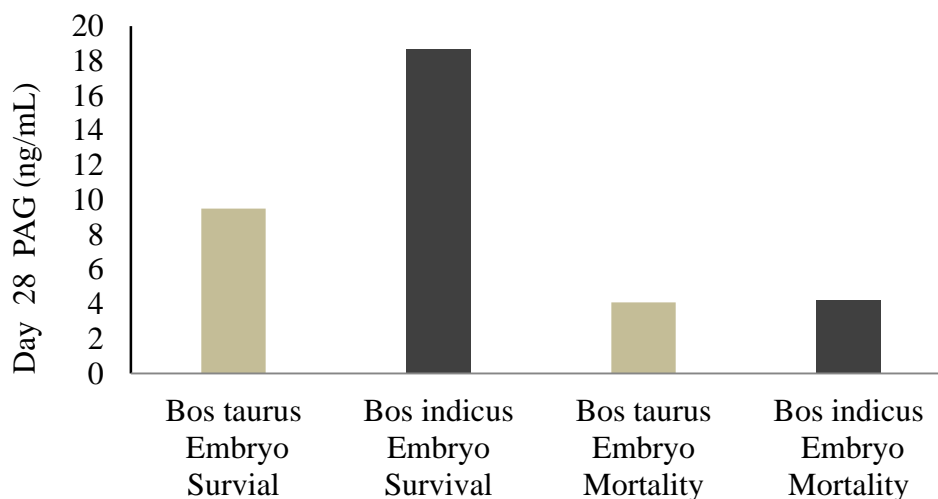


Figura 2. As concentrações séricas de glicoproteínas associadas à prenhez (PAGs) em amostras colhidas no dia 28 de gestação de vacas prenhas *Bos taurus* e *Bos indicus* com um embrião viável com base no batimento cardíaco fetal. As vacas foram, então, classificadas as que mantiveram a prenhez até o dia 72 (*Bos Taurus*; n = 1416) ou no dia 100 (*Bos indicus*; n = 1.365) de gestação (sobrevivência embrionária) ou mortalidade embrionária (entre os dias 29 para 72 ou 100; *Bos Taurus*; n = 171; *Bos indicus*; n = 213). Vacas de corte que apresentaram mortalidade embrionária tardia diminuíram ( $P < 0,05$ ) concentrações circulantes de PAGs no dia 28 em comparação com as vacas que mantiveram um embrião.

### Conclusões

Embora vários métodos de detecção possam diagnosticar com precisão a prenhez em bovino, as PAGs e miRNA específicos da prenhez são biomarcadores que podem ser usados antes do dia 30 de gestação e pode ser útil na predição da mortalidade embrionária. Embora o diagnóstico de gestação pode ser possível no início da gestação, os benefícios podem ser mitigados pela alta incidência de mortalidade embrionária após o dia 24.

### Referências

- Ahmad N, Schrick FN, Butcher RL, Inskeep EK. 1995. Effect of persistent follicles on early embryonic losses in beef cows. *Biol Reprod*, 52:1129-1135.
- Aires M, Dekagi K, Dantzer V, Yamada A. 2014. Bovine placental development during early pregnancy. *Microscope*, 1:390-396.
- Athanasas-Platsis S, Quinn K, Wong T, Rolfe B, Cavanagh A, Morton H. 1989. Passive immunization of pregnant mice against early pregnancy factor causes loss of embryonic viability. *J Repro Fertil*, 87:495-502.
- Ayalon N. 1978. A review of embryonic mortality in cattle. *J Repro Fertil*, 54:483-493.
- Beal WE, Perry RC, Corah LR. 1992. The use of ultrasound in monitoring reproductive physiology of beef cattle. *J Anim Sci*, 70:924-929.
- Breuel K, Lewis P, Schrick F, Lishman A, Inskeep E, Butcher R. 1993. Factors affecting fertility in the postpartum cow: role of the oocyte and follicle in conception rate. *Biol Reprod*, 48:655-661.
- 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.
- Burns GW, Brooks KE, Spencer TE. 2016. Extracellular vesicles originate from the conceptus and uterus during early pregnancy in sheep. *Biol Reprod*, 94:1-11.
- Butler J, Hamilton W, Sasser R, Ruder C, Hass G, Williams R. 1982. Detection and partial characterization of two bovine pregnancy-specific proteins. *Biol Reprod*, 26:925-933.
- Cameron A, da Silveira JC, Bouma G, Bruemmer JE. 2011. Evaluation of exosomes containing miRNA as an indicator of pregnancy status in the mare. *J Equine Vet Sci*, 31:314-315.
- Cartmill J, El-Zarkouny S, Hensley B, Lamb G, Stevenson J. 2001a. Stage of cycle, incidence, and timing of ovulation, and pregnancy rates in dairy cattle after three timed breeding protocols. *J Dairy Sci*, 84:1051-1059.
- Cartmill J, El-Zarkouny S, Hensley B, Rozell T, Smith J, Stevenson J. 2001b. An alternative AI breeding protocol for dairy cows exposed to elevated ambient temperatures before or after calving or both. *J Dairy Sci*, 84:799-806.
- Chim SS, Shing TK, Hung EC, Leung T, Lau T, Chiu RW, Lo YD. 2008. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clin Chem*, 54:482-490.
- Cordoba M, Sartori R, Fricke P. 2001. Assessment of a commercially available early conception factor (ECF) test for determining pregnancy status of dairy cattle. *J Dairy Sci*, 84:1884-1889.
- Curran S, Pierson R, Ginther O. 1986. Ultrasonographic appearance of the bovine conceptus from days 20 through 60. *J Amer Vet Med Assoc*, 189:1295-1302.
- de Sousa NM, Zongo M, Pitala W, Boly H, Sawadogo L, Sanon M, de Figueiredo JR, Gonçalves

- PBD, El Amiri B, Perényi Z. 2003. Pregnancy-associated glycoprotein concentrations during pregnancy and the postpartum period in Azawak Zebu cattle. *Theriogenology*, 59:1131-1142.
- De Vries A. 2006. Economic value of pregnancy in dairy cattle. *J Dairy Sci*, 89:3876-3885.
- Diskin MG, Morris DG. 2008. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reprod Dom Anim*, 43:260-267.
- Diskin M, Parr M, Morris D. 2011. Embryo death in cattle: an update. *Reprod Fertil Devel*, 24:244-251.
- Dunne L, Diskin M, Sreenan J. 2000. Embryo and foetal loss in beef heifers between day 14 of gestation and full term. *Anim Reprod Sci*, 58:39-44.
- Fiandanese N, Viglino A, Strozzi F, Stella A, Williams JL, Lonergan P, Forde N, Iamartino D. 2016. Circulating microRNAs as potential biomarkers of early pregnancy in high producing dairy cows. *Proceedings IETS*, Louisville, KY (Abstract).
- Gandy B, Tucker W, Ryan P, Williams A, Tucker A, Moore A, Godfrey R, Willard S. 2001. Evaluation of the early conception factor (ECF<sup>TM</sup>) test for the detection of nonpregnancy in dairy cattle. *Theriogenology*, 56:637-647.
- Gifford C, Racicot K, Clark D, Austin K, Hansen T, Lucy M, Davies C, Ott T. 2007. Regulation of interferon-stimulated genes in peripheral blood leukocytes in pregnant and bred, nonpregnant dairy cows. *J Dairy Sci*, 90:274-280.
- Gilad S, Meiri E, Yogev Y, Benjamin S, Lebanony D, Yerushalmi N, Benjamin H, Kushnir M, Cholak H, Melamed N. 2008. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS one*, 3(9):e3148.
- Green J, Okamura C, Poock S, Lucy M. 2010. Measurement of interferon-tau (IFN- $\tau$ ) stimulated gene expression in blood leukocytes for pregnancy diagnosis within 18–20d after insemination in dairy cattle. *Anim Reprod Sci*, 121:24-33.
- Green JA, Xie S, Quan X, Bao B, Gan X, Mathialagan N, Beckers JF, Roberts RM. 2000. Pregnancy-associated bovine and ovine glycoproteins exhibit spatially and temporally distinct expression patterns during pregnancy. *Biol Reprod*, 62:1624-1631.
- Green JA, Parks TE, Avale MP, Telugu BP, McLain AL, Peterson AJ, McMillan W, Mathialagan N, Hook RR, Xie S. 2005. The establishment of an ELISA for the detection of pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) in the serum of pregnant cows and heifers. *Theriogenology*, 63:1481-1503.
- Han H, Austin KJ, Rempel LA, Hansen TR. 2006. Low blood ISG15 mRNA and progesterone levels are predictive of non-pregnant dairy cows. *J Endo*, 191:505-512.
- Häusler S, Keller A, Chandran P, Ziegler K, Zipp K, Heuer S, Krockenberger M, Engel J, Hönig A, Scheffler M. 2010. Whole blood-derived miRNA profiles as potential new tools for ovarian cancer screening. *British J Cancer*, 103:693-700.
- Holdsworth, RJ, Heap RB, Booth JM, Hamon M. 1982. A rapid direct radioimmunoassay for the measurement of oestrone sulphate in the milk of dairy cows and its use in pregnancy diagnosis. *J Endo*, 95:7-12.
- Inskeep EK, Dailey RA. 2005. Embryonic death in cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 21:437-461.
- Ioannidis J, Donadeu X. 2016. Circulating microRNA signatures associated with early bovine pregnancy. *Proceedings IETS*, Louisville, KY (Abstract).
- Karen A, De Sousa NM, Beckers JF, Bajcsy AC, Tibold J, Madl I, Szenci O. 2015. Comparison of a commercial bovine pregnancy-associated glycoprotein ELISA test and a pregnancy-associated glycoprotein radiomimmunoassay test for early pregnancy diagnosis in dairy cattle. *Anim Reprod Sci*, 159:31-37.
- Kastelic J, Curan S, Pierson RA, Ginther OJ. 1988. Ultrasonic evaluation of the bovine conceptus. *Theriogenology*, 29:39-54.
- Kill LK, Pohler KG, Perry GA, Smith MF. 2013. Serum bovine pregnancy associated glycoproteins and progesterone in beef heifers that experienced late embryonic/ fetal mortality. *J Anim Sci*, (Abstract Midwest Section Meetings).
- King G, Atkinson B, Robertson H. 1979. Development of the bovine placenta during the second month of gestation. *J Reprod Fertil*, 55:173-NP.
- King G, Atkinson B. 1987. The bovine intercaruncular placenta throughout gestation. *Anim Reprod Sci*, 12:241-254.
- Kumar A, Mehrotra S, Dangi S, Singh G, Singh L, Mahla A, Kumar S, Nehra K. 2013. Faecal steroid metabolites assay as a non-invasive monitoring of reproductive status in animals. *Vet World*, 6(1).
- Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, Banham AH, Pezzella F, Boultonwood J, Wainscoat JS. 2008. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *British J Haematology*, 141:672-675.
- Lobago F, Bekana M, Gustafsson H, Beckers JF, Yohannes G, Aster Y, Kindahl H. 2009. Serum profiles of pregnancy-associated glycoprotein, oestrone sulphate and progesterone during gestation and some factors influencing the profiles in Ethiopian Borana and crossbred cattle. *Reprod Domest Anim*, 44:685-692.
- Lopez-Gatius F, Garbayo J, Santolaria P, Yaniz J, Ayad A, De Sousa N, Beckers JF. 2007. Milk production correlates negatively with plasma levels of pregnancy-associated glycoprotein (PAG) during the early fetal period in high producing dairy cows with live fetuses. *Domest Anim Endo*, 32:29-42.
- Lucy M, Green J, Poock S. 2011. Pregnancy determination in cattle: A review of available Alternatives. *Proceedings, Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle*, Joplin, MO, USA, 367-376.
- Mercadante PM, Waters KM, Mercadante VR, Lamb GC, Elzo MA, Johnson SE, Rae DO, Yelich JV, Ealy AD. 2013. Subspecies differences in early fetal development and plasma pregnancy-associated glycoprotein concentrations in cattle. *J Anim Sci*, 91:3693-3701.
- Morton H. 1998. Early pregnancy factor: an extracellular chaperonin 10 homologue. *Immun Cell Biol*, 76:483-496.

- Nebel R, Whittier W, Cassell B, Britt J.** 1987. Comparison of on-farm and laboratory milk progesterone assays for identifying errors in detection of estrus and diagnosis of pregnancy. *J Dairy Sci*, 70:1471-1476.
- Nebel R.** 1988. On-farm milk progesterone tests. *J Dairy Sci*, 71:1682-1690.
- Pereira M, Wiltbank M, Vasconcelos J.** 2016. Expression of estrus improves fertility and decreases pregnancy losses in lactating dairy cows that receive artificial insemination or embryo transfer. *J Dairy Sci*, 99:2237-2247.
- 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. *PNAS USA*, 102:5268-5273.
- Pierson RA, Ginther OJ.** 1984. Ultrasonography for detection of pregnancy and study of embryonic development in heifers. *Theriogenology*, 22:225-233.
- Pohler KG, Geary TW, Johnson CL, Atkins JA, Jinks EM, Busch DC, Green JA, MacNeil MD, Smith MF.** 2013. Circulating bovine pregnancy associated glycoproteins are associated with late embryonic/fetal survival but not ovulatory follicle size in suckled beef cows. *J Anim Sci*, 91:4158-4167.
- Pohler KG, Green JA, Moley LA, Doran KM, Graff HB, Peres RFG, Vasconcelos JLM, Smith MF.** 2014. The effect of embryonic size and sire on circulating concentrations of bovine pregnancy associated glycoproteins in beef cattle. Page 563 in *International Symposium on Reproduction in Domestic Ruminants*. J. Juengel, A. Miyamoto, C. Price, L. Reynolds, M. Smith, and R. Webb, ed. Context, Obihiro, Hokkaido, Japan.
- Pohler KG, Green JA, Geary TW, Peres RF, Pereira MH, Vasconcelos JL, Smith MF.** 2015a. Predicting Embryo Presence and Viability. *Adv Anat Embryo Cell Biol* 216:253-270.
- Pohler KG, Green JA, Moley LA, Hung W, Hong X, Christenson LK, Geary TW, Smith MF.** 2015b. Circulating microRNAs as biomarkers of early embryonic viability in cattle. *Proceedings SSR*, San Juan, Puerto Rico (Abstract).
- Pohler KG, Peres RF, Green JA, Graff HB, Martins T, Vasconcelos JL, Smith MF.** 2016a. Use of bovine pregnancy associated glycoproteins (bPAGs) to diagnose pregnancy and predict late embryonic mortality in postpartum Nelore beef cows. *Theriogenology*, 85:1652-1659.
- Pohler KG, Pereira MH, Lopes FR, Lawrence JC, Keisler DH, Smith MF, Vasconcelos JL, Green JA.** 2016b. Circulating concentrations of bovine pregnancy-associated glycoproteins and late embryonic mortality in lactating dairy herds. *J Dairy Sci*, 99:1584-1594.
- Raposo G, Stoorvogel W.** 2013. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*, 200:373-383.
- Reese ST, Pereira MHC, Vasconcelos JLM, Pohler KG.** 2016. Pregnancy Associated Glycoprotein (PAG) concentrations in early gestation from dairy heifers undergoing embryo transfer. *Proceedings ASAS- ADAS Joint Annual Meeting*, Salt Lake City, Utah. (Abstract).
- Reid G, Kirschner MB, van Zandwijk N.** 2011. Circulating microRNAs: Association with disease and potential use as biomarkers. *Critical Reviews Oncology/Hematology*, 80:193-208.
- Ricci A, Carvalho P, Amundson M, Fourdraine R, Vincenti L, Fricke P.** 2015. Factors associated with pregnancy-associated glycoprotein (PAG) levels in plasma and milk of Holstein cows during early pregnancy and their effect on the accuracy of pregnancy diagnosis. *J Dairy Sci*, 98:2502-2514.
- Santos J, Thatcher W, Chebel R, Cerri R, Galvao K.** 2004. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Anim Reprod Sci*, 82:513-535.
- Santos J, Rutigliano H., Sá Filho M.** 2009. Risk factors for resumption of postpartum estrous cycles and embryonic survival in lactating dairy cows. *Anim Reprod Sci*, 110:207-221.
- Sartori R, Sartor-Bergfelt R, Mertens S, Guenther J, Parrish J, Wiltbank M.** 2002. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J Dairy Sci*, 85:2803-2812.
- Sasser RG, Ruder CA, Ivani KA, Butler JE, Hamilton WC.** 1986. Detection of pregnancy by radioimmunoassay of a novel pregnancy-specific protein in serum of cows and a profile of serum concentrations during gestation. *Biol Reprod*, 35:936-942.
- Sasser R.** 1987. Detection of early pregnancy in domestic ruminants. *J Reprod Fertil Suppl* 34:216-271.
- Spencer TE, Hansen TR.** 2015. Implantation and Establishment of Pregnancy in Ruminants. *Regulation of Implantation and Establishment of Pregnancy in Mammals*, Springer 105-135.
- Sreenan J, Diskin M.** 1986. The extent and timing of embryonic mortality in the cow. *Embryonic mortality in farm animals*. Springer 1-11.
- Starbuck MJ, Dailey RA, Inskeep EK.** 2004. Factors affecting retention of early pregnancy in dairy cattle. *Anim Reprod Sci*, 84:27-39.
- Szenci O, Beckers JF, Humblot P, Sulon J, Sasser G, Taverne M, Varga J, Baltussen R, Schekk G.** 1998. Comparison of ultrasonography, bovine pregnancy-specific protein B, and bovine pregnancy-associated glycoprotein 1 tests for pregnancy detection in dairy cows. *Theriogenology*, 50:77-88.
- Tijssen AJ, Creemers EE, Moerland PD, de Windt LJ, van der Wal AC, Kok WE, Pinto YM.** 2010. MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure. *Circulation Research*, 106:1035-1039.
- USDA.** 2009. NAHMS Dairy 2007 USDA APHIS.
- USDA.** 2010. NAHMS Beef 2007-2008. USDA APHIS.
- Vasconcelos J, Silcox R, Lacerda J, Pursley J, Wiltbank M.** 1997. Pregnancy rate, pregnancy loss, and response to head stress after AI at 2 different times from ovulation in dairy cows. *Biol Reprod Suppl*, 230-230 (Abstract).
- Wallace RM, Pohler KG, Smith MF, Green JA.** 2015. Placental PAGs: gene origins, expression patterns, and

use as markers of pregnancy. *Reproduction* 149(3):R115-126.

**Wang J, Yu M, Yu G, Bian J, Deng X, Wan X, Zhu K.** 2010. Serum miR-146a and miR-223 as potential new biomarkers for sepsis. *Biochem Biophys Comm*, 394(1):184-188.

**Wooding F, Wathes DC.** 1980. Binucleate cell migration in the bovine placentome. *J Reprod Fertil*, 59(2):425-430.

**Wooding P, Burton G.** 2008. Synepitheliochorial placentation: ruminants (ewe and cow). *Comparative Placentation: Structures, Functions and Evolution*, 133-167.

**Zoli AP, Guilbault LA, Delahaut P, Ortiz WB, Beckers JF.** 1992. Radioimmunoassay of a bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum: its application for pregnancy diagnosis. *Biol Reprod*, 46(1):83-92.

## Efeito da maturação do folículo pré-ovulatório no estabelecimento da prenhez em bovinos: o papel da competência oocitária e do ambiente materno

S.E. Dickinson<sup>1</sup>, T.W. Geary<sup>2</sup>, J.M. Monnig<sup>1</sup>, K.G. Pohler<sup>3</sup>, J.A. Green<sup>1</sup>, M.F. Smith<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Division of Animal Sciences, University of Missouri, Columbia, MO;

<sup>2</sup>Livestock and Range Research Laboratory, USDA-ARS, Miles City, MT

<sup>3</sup>Department of Animal Sciences, University of Tennessee, Knoxville, TN

Título resumido: Determinantes foliculares da prenhez em bovinos

\*Autor correspondente: [Smithmf@missouri.edu](mailto:Smithmf@missouri.edu); Division of Animal Science, 160 ASRC  
University of Missouri, Columbia, MO, 65211; Fone: 573-882-8239; Fax: 573-884-6827

### Resumo

Tecnologias reprodutivas para sincronizar o estro e a ovulação em bovinos têm reforçado a capacidade de utilizar praticamente a inseminação artificial para aumentar tanto o mérito genético quanto o manejo reprodutivo dos rebanhos de corte e leite. A capacidade de sincronizar com êxito uma onda de crescimento folicular e ovulação, em novilhas e vacas, melhorou substancialmente nos últimos anos. Consequentemente, as taxas de prenhez para uma única inseminação artificial em tempo fixo (IATF) podem aproximar-se às de uma inseminação seguinte a um estro espontâneo. Apesar destes avanços, algumas novilhas e vacas, frequentemente, têm folículo dominante fisiologicamente imaturo no momento da ovulação induzida por GnRH. Estes animais apresentam taxas de prenhez reduzidas e diminuição da sobrevivência embrionária se a prenhez se estabelece. Os mecanismos fisiológicos subjacentes a diminuição da fertilidade tem sido um dos focos de nossos laboratórios e podem incluir o efeito do microambiente folicular na competência oocitária e no ambiente materno. Oócitos devem ter uma oportunidade adequada para completar a maturação citoplasmática e molecular durante os estágios finais de maturação que ocorrem dentro do folículo pré-ovulatório. O status folicular, durante o proestro, deve ser tal que as concentrações adequadas de estradiol circulante estejam presentes antes da IATF para aumentar o transporte de gametas e aumentar tanto a capacidade de luteinização das células da granulosa quanto a população do receptor de progesterona no útero pós-ovulatório. Após a ovulação, a transformação do folículo em um corpo lúteo funcional para secretar quantidades adequadas de progesterona é essencial para o estabelecimento da prenhez. O status fisiológico do folículo pré-ovulatório, antes da IATF, afeta grandemente os conceitos discutidos acima e tem um impacto importante no estabelecimento e manutenção da prenhez em bovinos.

**Palavras-chave:** bovinos, prenhez, folículo, oócito, sincronização da ovulação

### Introdução

A sincronização do estro/ovulação e a inseminação artificial (IA) são técnicas poderosas para o melhoramento genético e manejo reprodutivo em bovinos de corte (Seidel, 1995). No entanto, o tempo e o trabalho associados com a

detecção de estro têm sido empecilhos para a adoção da IA em rebanhos de corte. Portanto, esforços significativos têm sido direcionados para o desenvolvimento de protocolos de IA em tempo fixo (IATF) que permitem que novilhas e vacas sejam inseminadas em tempo pré-determinado e alcancem taxas de prenhez semelhantes às observadas após a detecção do estro e IA. Além disso, protocolos de IATF aumentam a proporção de novilhas e vacas que concebem no início da estação reprodutiva, o que traz benefícios importantes para o manejo reprodutivo e produção de carne bovina. Progressos significativos foram feitos para o desenvolvimento de protocolos de IATF que controlem precisamente o momento da ovulação. Por conseguinte, um maior esforço tem sido direcionado para a compreensão dos mecanismos ovariano, uterino e embrionário que controlam o estabelecimento e a manutenção da prenhez (ver revisões de Pohler et al, 2012; Bridges et al, 2013; Geary et al, 2013), com o objetivo de desenvolver estratégias para aumentar a taxa de prenhez em uma única inseminação. O objetivo deste artigo é revisar o efeito do tamanho do folículo ovulatório no momento da IATF, nas taxas de prenhez e na sobrevivência embrionária/fetal, para discutir porque folículos fisiologicamente imaturos podem estar presentes na IATF e discutir mecanismos pelos quais a maturidade fisiológica de um folículo dominante pode afetar o estabelecimento e a manutenção da prenhez em bovinos de corte.

### Visão geral da sincronização da ovulação

Mecanismos ovarianos controlando a expressão do estro, a ovulação do oócito competente e o estabelecimento de um ambiente ovidutal/uterino propício para o desenvolvimento embrionário é provavelmente otimizado quando uma fêmea expressa o estro e ovula espontaneamente. No entanto, quando os eventos precedentes são artificialmente manipulados com protocolos de IATF, as taxas de prenhez podem ser reduzidas. Bovinos têm ondas foliculares recorrentes, iniciando antes da puberdade e continuando até o final da gestação e o desenvolvimento de protocolos de IATF requerem tanto a sincronização das ondas foliculares quanto a indução da luteólise. Consequentemente, os protocolos de IATF para bovinos frequentemente envolvem a seguinte sequência fisiológica: 1) *Turnover* do folículo dominante para iniciar uma nova onda de crescimento folicular. Isto é conseguido através da administração de hormônio liberador de gonadotrofina exógeno (GnRH; por

exemplo, EUA) ou estradiol na presença de progesterona (por exemplo, Brasil) para induzir a ovulação ou o *turnover* do folículo dominante, respectivamente (ver revisões de Bo et al, 1995; Diskin et al., 2002), 2) Indução da luteólise, cinco a sete dias mais tarde, por administração de prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF), e 3) Administração de estradiol ou GnRH para induzir a ovulação seguinte a inseminação. Essencialmente, todos os protocolos de IATF nos EUA são variações da sequência de injeção GnRH-PGF-GnRH precedente, com algumas diferenças no momento da inseminação e alguns protocolos incluem uma progestina entre a primeira injeção de GnRH e PGF para controlar melhor a expressão do estro. Para os protocolos de IATF, o momento da inseminação está programado para resultar em uma sobreposição entre o período de viabilidade do oócito após a ovulação e a disponibilidade dos espermatozoides capacitados na ampola do oviduto. No entanto, no momento da IATF, há uma população mista de novilhas ou vacas que manifestaram ou não o estro. Os animais que não tenham manifestado estro no momento da IATF requerem uma injeção de GnRH ou estradiol para induzir um pico pré-ovulatório de gonadotrofina e a ovulação de modo que todos os animais possam ser inseminados ao mesmo tempo. As fêmeas que exibem estro antes ou no momento da IATF, normalmente, têm um pico espontâneo de gonadotrofina e experimentam taxas de prenhez mais elevadas em comparação àquelas que não exibem estro (Perry et al, 2005; Larson et al., 2006). Portanto, um desafio com a IATF é manipular o ciclo estral ou a indução da ovulação tal que o microambiente folicular seja ideal para a aquisição da competência oocitária e programar o ambiente materno para o estabelecimento e manutenção da prenhez.

#### **Efeito do tamanho do folículo ovulatório na prenhez de novilhas e vacas de corte**

Em *Bos taurus* e *Bos indicus*, folículos antrais adquirem a capacidade de ovular em resposta a um pico pré-ovulatório de gonadotrofina endógena ou exógena em 7 ou 10 mm de diâmetro, respectivamente, a qual está associada com o tempo da divergência folicular entre o folículo dominante recém selecionado e os folículos subordinados (Sartori et al, 2001; Gimenes et al., 2008). Este tempo corresponde à aquisição de receptores de LH nas células da granulosa bovinas pelo folículo selecionado (ver revisão de Lucy, 2007). No entanto, foi necessária uma dose maior de LH para induzir a ovulação em um folículo de 10 milímetros versus os folículos de maiores dimensões (Sartori et al., 2001), sugerindo uma diferença na maturidade fisiológica de folículos dominantes pequenos versus folículos dominantes grandes.

Quando a ovulação é induzida, o tamanho ou a maturidade fisiológica do folículo pré-ovulatório influenciam a taxa de prenhez e a sobrevivência embrionária tardia em bovinos de corte e de leite (Lamb et al, 2001; Vasconcelos et al, 2001; Perry et al, 2005; Waldmann et al, 2006; Perry et al, 2007; Dias et al, 2009; Meneghetti et al, 2009; Sá Filho et al, 2009). Em um estudo de nosso laboratório, vacas de corte pós-parto induzidas a ovular folículos dominantes pequenos (menos de 11,3 mm de

diâmetro) registraram taxas de prenhez mais baixas e maior incidência de mortalidade embrionária tardia que aquelas induzidas a ovular folículos dominantes grandes (maior do que 11,3 mm de diâmetro). Curiosamente, o tamanho do folículo ovulatório não afetou o estabelecimento ou a manutenção da prenhez quando os animais exibiram estro e ovulação espontânea (Perry et al., 2005). Isto levou à hipótese de que a maturidade fisiológica, ao invés do diâmetro, de um folículo pré-ovulatório afeta o estabelecimento e manutenção da prenhez (Perry et al, 2005; Atkins et al, 2013).

#### **Por que novilhas e vacas têm folículos dominantes pequenos na inseminação em tempo fixo?**

Nossos laboratórios têm utilizado o protocolo de IATF CO-Synch (GnRH-1 sete dias antes da PGF e GnRH-2 na IATF 48 horas após PGF; Geary et al, 1998) para examinar o efeito do tamanho do folículo ovulatório no estabelecimento da prenhez em novilhas e vacas de corte pós-parto (Perry et al, 2005; Perry et al, 2007; Atkins et al, 2013). Embora esse protocolo tenha sido modificado para uso corrente na indústria, temos continuado a usá-lo, uma vez que ele resulta em variação significativa no tamanho do folículo dominante no GnRH-2. Aproximadamente 40 a 50% de novilhas (Atkins et al., 2008) e 66% de vacas de corte pós-parto (Geary et al., 2000) têm um folículo dominante capaz de responder o GnRH-1. É lógico que os folículos dominantes pequenos presentes no momento do GnRH-2 (IATF) poderiam resultar da incapacidade de ovular um folículo dominante e iniciar uma nova onda de crescimento folicular após a administração de GnRH-1. Consequentemente, no GnRH-2 haverá novilhas e vacas que terão ou não uma onda folicular sincronizada. Levantou-se a hipótese de que as vacas que não têm uma onda sincronizada no GnRH-2 podem ter um folículo dominante pequeno. Alternativamente, uma taxa de crescimento mais lenta do folículo dominante poderia resultar em um folículo dominante pequeno no GnRH-2. Para testar a hipótese precedente, administrou-se GnRH-1 nas novilhas de corte, vacas pós-parto cíclicas e vacas pós-parto em anestro em momentos nos quais elas teriam ou não um folículo capaz de ovular ao pico induzido de gonadotrofina (Atkins et al, 2008; Atkins et al., 2010a; b). A administração de GnRH-1 ocorreu nos dias 2, 5, 10, 15 e 18 ou 2, 5, 9, 13, e 18 após o estro (dia 0) em novilhas cíclicas e vacas pós-parto, respectivamente. Em novilhas de corte, o dia do ciclo de GnRH-1 e não a resposta ovulatória a GnRH-1 teve efeito sobre o tamanho do folículo dominante no GnRH-2. Novilhas que receberam GnRH-1 na última parte do ciclo (isto é, dias 15 e 18) tiveram maior incidência de luteólise espontânea antes da administração de PGF e início mais precoce do estro, independentemente da presença de um corpo lúteo acessório após a GnRH-1, o que resultou em folículos menores no GnRH-2. Consequentemente, uma estratégia para reduzir a presença de folículos pequenos, fisiologicamente imaturos em novilhas no GnRH-2 pode ser a pré-sincronização do desenvolvimento folicular, de tal modo que os folículos fiquem em uma fase anterior do ciclo estral ( $d \leq 10$ ) no GnRH-1. Em vacas cíclicas, o dia do ciclo em GnRH-1 não



afetou o tamanho do folículo dominante ou a proporção das vacas ovulando. No entanto, em ambos os grupos, cíclicas e em anestro, as vacas que ovularam em resposta ao GnRH-1 teve um folículo maior no GnRH-2 do que vacas que não ovularam. Em resumo, a indução da ovulação no GnRH-1 aumentou o tamanho do folículo pré-ovulatório no GnRH-2 nas vacas no pós-parto, mas não nas novilhas.

### **Determinantes foliculares para o estabelecimento da prenhez em vacas de corte**

A diminuição da taxa de prenhez e sobrevivência embrionária / fetal tardio (dias 28 a 70 pós-acasalamento) após a ovulação induzida por GnRH de folículos fisiologicamente imaturos é provavelmente devido a uma combinação de competência oocitária reduzida e (ou) uma preparação inadequada do ambiente materno para estabelecimento da prenhez. Atkins et al (2013) realizaram um experimento de transferência de embriões recíproco para distinguir entre os efeitos do microambiente folicular na competência oocitária versus o ambiente materno. Ovulações únicas induzidas por GnRH foram sincronizadas em vacas de corte pós-parto recipientes e doadoras. Os animais foram classificados em folículos grandes ( $\geq 12,5$  mm) e pequenos ( $<12,5$  mm) na ovulação induzida por GnRH e em nenhum dos animais foi detectado estro. Os animais doadores foram inseminados e embriões ou oócitos não fertilizados foram recuperados sete dias mais tarde. Embriões viáveis de doadoras com folículos pequenos ou grandes foram transferidos para as receptoras com folículos pequenos ou grandes para diferenciar entre os efeitos do microambiente folicular sobre a competência oocitária e (ou) o ambiente uterino. A evidência de competência oocitária inadequada e um ambiente uterino comprometido em fêmeas induzidas para ovular um folículo pequeno em comparação a um folículo ovulatório grande foi relatada e é discutida em mais detalhes abaixo.

### **Determinantes oocitários da fertilidade**

A competência oocitária é definida como a capacidade do oócito de retomar a meiose, clivar após a fertilização, desenvolver para o estágio de blastocisto e levar a termo uma prenhez bem-sucedida (Sirard et al., 2006). A competência de desenvolvimento é adquirida ao longo dos oócitos e crescimento folicular à medida que o oócito progride através da maturação meiótica, citoplasmática e molecular. Durante o período de crescimento oocitário, o oócito bovino aumenta em tamanho a partir de um diâmetro intrazonal menor que 30  $\mu$ m nos folículos primordiais para mais de 120  $\mu$ m nos folículos terciários (Hyttel et al., 1997). A competência oocitária bovina foi examinada avaliando-se taxa de fertilização, taxa de clivagem, a proporção de embriões que atingiram o estágio de blastocisto bem como a qualidade do embrião (Otoi et al, 1997; Hendricksen et al, 2000; Atkins et al, 2013), observando-se o aumento da competência em oócitos de maior tamanho (Otoi et al, 1997) e provenientes de folículos maiores (Arlotto et al, 1996; Hendricksen et al, 2000; Atkins et al, 2013).

A aquisição da competência oocitária pode ser dividida em três grandes eventos: 1) A aquisição da capacidade de passar por maturação meiótica, 2) Aquisição da maturação citoplasmática e 3) Acumulação e armazenamento de transcritos de RNAm e proteínas (isto é, maturação molecular). Na vida fetal, a síntese de DNA duplica o conteúdo de cromatina no oócito. A cromatina entra na fase de diplóteno da meiose I e é detida em um estado de condensação intermediária, o que permite que a transcrição de RNAm possa ser armazenada no oócito por semanas devido à poliadenilação da região 3' não traduzida (Sirard, 2001). Os oócitos permanecem em diplóteno até que sejam removidos de suas células foliculares circundantes ou expostos ao pico pré-ovulatório de gonadotrofina. À medida que o oócito adquire competência meiótica, ele adquire a capacidade de ser liberado da fase de diplóteno, de condensar a sua cromatina completamente, de expulsar o corpo polar e progredir para metáfase II (MII). É comumente aceito que os oócitos em crescimento ativo sejam meioticamente incompetentes e a aquisição da competência meiótica é uma progressão que acontece à medida que o oócito cresce (Sirard, 2001). Em um diâmetro intrazonal de 100  $\mu$ m, o oócito bovino adquire a capacidade de retomar a meiose, mas a competência meiótica total para alcançar MII não é adquirida até que o oócito atinja o diâmetro de 110  $\mu$ m, o que é normalmente observado em um folículo de 3 mm (Hyttel et al., 1997).

Enquanto oócitos de folículos bovinos maiores que 3 mm são competentes para retomar a meiose, eles podem progredir através de maturação citoplasmática ou capacitação oocitária para atingir a completa competência do desenvolvimento. Alterações precoces na ultraestrutura do oócito ocorreram durante o estágio secundário de desenvolvimento folicular à medida que a zona pelúcida e os grânulos corticais foram sintetizados (Sirard, 2001). No entanto, poucas mudanças na ultraestrutura oocitárias foram observadas a partir deste ponto até o folículo alcançar o tamanho de 8-9 mm (Hendrickson et al., 2000). Na medida em que o folículo progrediu para o tamanho ovulatório, alterações morfológicas nas mitocôndrias, ribossomos, retículo endoplasmático, complexo de Golgi e grânulos corticais ocorreram na transição do oócito de vesícula germinal (VG) para a fase MII (revisado por Ferreira et al., 2009). A reorganização precedente de organelas é presumivelmente regulada por microfilamentos do citoesqueleto e microtúbulos e é essencial para a viabilidade dos oócitos (por exemplo, fornecimento de ATP para o núcleo para a maturação meiótica e fertilização, tradução adequada de proteínas, produção de gradiente de cálcio e liberação de grânulos corticais para bloquear polispermia; revisado por Ferreira et al, 2009).

Em bovinos, os transcritos produzidos e armazenados pelo oócito são essenciais para a subsequente maturação oocitária e início do desenvolvimento embrionário até a ativação do genoma embrionário (revisado por Sirard et al., 2006). A maturação molecular refere-se à transcrição do RNAm (isto é, transcriptoma) bem como o armazenamento de transcritos através da incorporação e extensão da cauda 3' poli-A (Brevini-Gandolfi et al., 1999). Os RNAm maternos são rapidamente transcritos e

armazenados, iniciando-se no estágio de folículo secundário (Fair et al., 1997) e ao longo do período de rápido crescimento oocitário até o tamanho folicular de 2 mm (Fair et al., 1995). Passado esse ponto, a atividade transcricional continua, em uma taxa inferior, até a condensação dos cromossomos seguinte ao rompimento da vesícula germinativa (GVBD; Fair et al, 1995; Mourot et al, 2006; Mamo et al, 2011).

A maturação molecular do oócito bovino é também influenciada pelas células foliculares circundantes onde a camada mais interna das células do cumulus, a coroa radiada, possui projeções celulares (isto é, projeções transzonais) que penetram na zona pelúcida e contatam diretamente o oolema (Macaulay et al., 2014). Embora seja bem conhecido que moléculas pequenas (por exemplo, cAMP) possam ser levadas das células do cumulus para o oócito via processos transzonais, foi recentemente reportado o transporte de RNAm para o oócito e os transcritos transportados aumentam à medida que o oócito progride da metáfase I (MI) para MII e está associado com polirribossomos (Macaulay et al, 2014; Macaulay et al, 2016). O transporte de RNAm é declaradamente encerrado após a exposição ao pico de gonadotrofina e subsequente rompimento das projeções transzonais (Macaulay et al., 2014).

A ovulação induzida de folículos pré-ovulatórios pequenos, em vacas que não manifestaram estro, pode impactar negativamente a aquisição de competência oocitária. Enquanto a competência meiótica se completa praticamente no momento em que o folículo bovino atinge 3 mm, a maturação citoplasmática e (ou) molecular inadequada poderia comprometer a competência oocitária em folículos pré-ovulatórios pequenos na ovulação induzida por GnRH. Um transcriptoma inadequado pode ser observado em oócitos de folículos pré-ovulatórios pequenos, os quais são induzidos a ovular prematuramente, uma vez que a transcrição termina na GVBD e não retoma até a ativação do genoma embrionário. A análise do transcriptoma de oócitos bovinos provenientes dos folículos dominantes de vacas de corte pós-parto que diferiam em tamanho (menor que 11,7 mm versus maior que 15,5 mm) ou status fisiológico (expressão do estro versus não expressão do estro) revelou uma lista de transcritos diferencialmente abundantes que poderiam regular vias associadas com a aquisição da competência oocitária (Dickinson, 2016).

**Requisitos endócrinos para o estabelecimento da prenhez:** Protocolos para a sincronização precisa em vacas de corte e leite têm sido desenvolvidos e são amplamente utilizados pela indústria (Binelli et al, 2014; Bo e Baruselli, 2014; Colazo e Mapletoft, 2014). O próximo desafio no desenvolvimento de protocolos é o de aumentar a taxa de prenhez após a IATF. Realizar esse objetivo exigirá uma maior compreensão dos mecanismos endócrinos e fisiológicos que controlam a aquisição da competência oocitária, ovulação, fertilização, transporte de gametas, desenvolvimento embrionário inicial, reconhecimento materno da prenhez e placentação. Binelli et al (2014) identificaram três princípios biológicos dos protocolos de IATF que governam o sucesso da prenhez: 1) Regulação das concentrações de progesterona circulante para aumentar a

competência oocitária e a eficácia da luteólise induzida pela PGF antes da IATF, 2) *Priming* de estradiol adequado durante o proestro e 3) *Priming* de progesterona adequado durante o início da fase luteínica. Em vacas de corte pós-parto, a ovulação induzida por GnRH de folículos dominantes pequenos resultou na diminuição das concentrações circulantes de estradiol na IATF e diminuiu as concentrações de progesterona pós-ovulatória (Perry et al, 2005; Busch et al, 2008; Atkins et al, 2010a; b; Atkins et al, 2013). Estes conceitos são discutidos em mais detalhes abaixo.

**Papel de proestro e estradiol pré-ovulatório:** O proestro compreende o período entre a luteólise e o início do estro e é caracterizado pelo aumento da secreção pulsátil de LH, aumento das concentrações circulantes de estradiol, alterações estrogênicas no trato reprodutor (por exemplo, colo do útero, útero e oviduto), crescimento folicular pré-ovulatório e maturação. As taxas de prenhez após a IATF foram positivamente associadas com a duração do proestro em vacas de corte (Mussard et al, 2007; Bridges et al, 2008; 2010; Geary et al, 2013) e de leite (Santos et al., 2010). Protocolos de sincronização da ovulação que aumentam a duração do proestro influenciam o ambiente esteroidogênico folicular e uterino aumentando as concentrações séricas de estradiol no estro e de progesterona durante a fase luteínica subsequente. Concentrações séricas de estradiol elevadas na IATF foram associadas com aumento nas taxas de prenhez (Jinks et al., 2013). Portanto, os efeitos do aumento do proestro sobre as taxas de prenhez foram provavelmente mais um efeito do estradiol elevado que uma função da idade folicular (Bridges et al., 2008).

As taxas de prenhez elevadas associadas com o aumento do estradiol circulante na IATF podem ser devido a um efeito direto do estradiol no complexo cumulus-oócito, oviduto e ambiente uterino e (ou) um efeito indireto sobre o transporte de gametas. O oócito bovino e as células do cumulus circundantes contêm RNAm do receptor de estradiol (Draincourt et al, 1998; Beker-van Woudenberg et al, 2004) e oócitos, provenientes de folículos bovinos pré-ovulatórios contendo concentrações intrafoliculares de estradiol aumentadas, eram mais propensos a se desenvolver em blastocistos (Mermillod et al., 1999). No entanto, a adição de estradiol no meio de maturação *in vitro* não apresentaram qualquer efeito ou efeito negativo sobre a maturação nuclear de oócitos bovinos (Beker-van Woudenberg et al, 2004; 2006). Curiosamente, o tratamento de vacas de corte com cipionato de estradiol, durante o período pré-ovulatório, aumentou as taxas de prenhez em vacas após a ovulação induzida por GnRH de folículos ovulatórios pequenos, mas não de folículos grandes (Jinks et al., 2013). Concentrações circulantes de estradiol podem afetar o estabelecimento e a manutenção da prenhez de uma forma independente da competência oocitária. Por exemplo, o aumento da secreção folicular de estradiol pode aumentar as taxas de prenhez através de modulação do pH uterino (Perry e Perry, 2008a, b), alterando o transporte e a longevidade do esperma (Allison e Robinson, 1972; Hawk, 1983), induzindo secreções no oviduto (por exemplo, glicoproteína ovidutal; revisada por Buhi, 2002), através da

modulação da ação da progesterona via indução dos receptores de progesterona no útero (Stone et al, 1978; Zelinski et al, 1982; Ing e Tornesi, 1997) e (ou) aumentando a secreção de progesterona pelo corpo lúteo. Madsen et al (2015) demonstraram a necessidade de estradiol pré-ovulatório na sobrevivência do embrião e na fixação da placenta em vacas de corte usando um modelo de vaca ovariectomizada. Em relação ao último efeito do estradiol, Atkins et al (2013) relataram que a concentração circulante de estradiol na IATF (dia 0) foi positivamente associada com as concentrações séricas de progesterona no dia 7 e independente do tamanho do folículo ovulatório. A capacidade das células da granulosa luteinizadas humanas para secretar progesterona aumentou quando as células foram coletadas de folículos com concentrações de estradiol aumentadas no fluido folicular (McNatty, 1979). Além disso, ovelhas tratadas com um inibidor de aromatase antes da ovulação induzida tiveram um aumento retardado de progesterona sérica (Benoit et al., 1992). Consequentemente, o estradiol pode desempenhar um papel na preparação das células foliculares para a luteinização.

**Papel da progesterona pós-ovulatória:** O pico pré-ovulatório de gonadotrofina induz a luteinização e a transformação do folículo ovulatório em um corpo lúteo, o qual serve como a principal fonte de progesterona durante o estabelecimento e manutenção da prenhez em bovinos (Smith et al., 1994). O desenvolvimento luteínico é uma continuação da maturação folicular; consequentemente, um microambiente folicular inadequado (por exemplo, estimulação gonadotrófica diminuída e [ou] a produção de estradiol) pode prejudicar a função luteínica subsequente (Garverick e Smith, 1986). Em novilhas e vacas de corte pós-parto, a ovulação induzida por GnRH de folículos dominantes pequenos foi associada com a diminuição das concentrações pós-ovulatórias de progesterona (Perry et al, 2005; Atkins et al, 2008; Atkins et al, 2010a, b) e menores taxas de prenhez em vacas de corte pós-parto (Atkins et al., 2013). Mecanismos potenciais que diminuem as concentrações circulantes de progesterona, durante o início da fase luteínica, devem resultar em menores taxas de prenhez são discutidos abaixo.

Nos ruminantes, o conceito depende da produção de fatores de crescimento estimulada por progesterona e secreções uterinas coletivamente conhecidas como histotrofo para nutrição (Geisert et al, 1992; Spencer e Bazer, 2002). Esteroides ovarianos podem ter efeito indireto sobre a função uterina através da indução dos receptores uterinos de progesterona por estradiol (Zelinski et al, 1982; Ing e Tornesi, 1997) e os efeitos da progesterona sobre a produção de histotrofo (Garrett et al., 1988). Alternativamente, a progesterona também pode ter efeito direto, uma vez que o embrião bovino possui RNAm do receptor de progesterona (Clemente et al., 2009) e pode responder diretamente a suplementação de progesterona em cultura (inconsistências revisadas por Lonergan, 2009).

Começando no dia 9 após a ovulação induzida por GnRH e IATF, as concentrações circulantes de progesterona foram maiores nas vacas de corte prenhas que nas vacas pós-parto não prenhas (Perry et al., 2005). O aumento retardado

na progesterona circulante pode comprometer o estabelecimento da prenhez devido à diminuição do tamanho embrionário e da produção de interferon-tau (IFN-tau). A produção de IFN- $\tau$  pelo trofoblasto nos dias 14 a 20, aproximadamente, é um mecanismo de sinalização essencial para o reconhecimento materno da prenhez e o IFN-tau tem sido demonstrado reduzir a secreção pulsátil da PGF uterina pelo bloqueio da expressão de receptores endometriais de ocitocina (revisado por Spencer et al., 2007). O aumento retardado de progesterona, após a ovulação, foi associado com menores taxas de desenvolvimento embrionário bovino e produção reduzida de IFN-tau em embriões de 16 dias (Mann e Lamming, 2001). Em resumo, o aumento adequado na concentração pós-ovulatória de progesterona é necessário para o estabelecimento e manutenção da prenhez em bovinos.

### Conclusão

A ovulação de um oócito competente bem como a secreção pré-ovulatória adequada de estradiol e secreção pós-ovulatória de progesterona são essenciais para o estabelecimento e manutenção da prenhez. Quando a ovulação foi induzida com GnRH em vacas pós-parto em que o estro não foi detectado, associações positivas entre o tamanho do folículo ovulatório, concentrações circulantes de estradiol pré-ovulatório, taxas de fertilização, qualidade do embrião, concentrações circulantes de progesterona durante o período pós-ovulatório e taxa de prenhez foram relatadas (Atkins et al., 2013). No estudo precedente, o estradiol pré-ovulatório na ovulação induzida por GnRH e a progesterona pós-ovulatória, sete dias após, foram os dois fatores mais importantes que afetaram o estabelecimento da prenhez. A pesquisa continuada dos protocolos de IATF em sistemas modernos de produção de carne e leite deve concentrar-se em estratégias para aumentar o estradiol pré-ovulatório, a progesterona pós-ovulatória e a competência oocitária para aumentar as taxas de prenhez em uma única inseminação.

### Referências

- Allison AJ, Robinson TJ. 1972. The recovery of spermatozoa from the reproductive tract of the spayed ewe treated with progesterone and oestrogen. *J Reprod Fertil*, 31:215-224.
- Arlotto T, Schwartz JL, First NL, Leibfried-Rutledge ML. 1996. Aspects of follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology*, 45:943-956.
- 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.
- Atkins JA, Smith MF, Wells KJ, Geary TW. 2010a. Factors affecting preovulatory follicle diameter and ovulation rate after gonadotropin-releasing hormone in postpartum beef cows. Part I: Cycling cows. *J Anim Sci*, 88:2300-2310.
- Atkins JA, Smith MF, Wells KJ, Geary TW. 2010b. Factors affecting preovulatory follicle diameter and

ovulation rate after gonadotropin-releasing hormone in postpartum beef cows. Part II: Anestrus cows. *J Anim Sci*, 88:2311-2320.

**Atkins JA, Busch DA, 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.

**Beker-van Woudenberg AR, van Tol HTA, Roelen BAJ, Colenbrander B, Bevers MM.** 2004. Estradiol and its membrane-impermeable conjugate (estradiol-bovine serum albumin) during in vitro maturation of bovine oocytes: Effects on nuclear and cytoplasmic maturation, cytoskeleton, and embryo quality. *Biol Reprod*, 70:1465-1474.

**Beker-van Woudenberg AR, Zeinstra EC, Roelen BAJ, Colenbrander B, Bevers MM.** 2006. Developmental competence of bovine oocytes after specific inhibition of MPF kinase activity: Effect of estradiol supplementation and follicle size. *Anim Reprod Sci*, 92:231-240.

**Benoit AM, Inskeep EK, Dailey RA.** 1992. Effect of a nonsteroidal aromatase inhibitor on in vitro and in vivo secretion of estradiol and on the estrous cycle in ewes. *Domest Anim Endocrinol*, 9:313-327.

**Binelli M, Sartori R, Vasconcelos JLM, Monteiro Jr. PLJ, Pereira MHC, Ramos RS.** 2014. Evolution in fixed-time: from synchronization of ovulation to improved fertility. 2014 Proceedings 9th International Ruminant Reproduction Symposium Context Products Ltd, England, pp 493-506.

**Bo GA, Baruselli PS.** 2014. Synchronization of ovulation and fixed-time artificial insemination in beef cattle. *Animal*, 8(Suppl 1):144-150.

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

**Brevini-Gandolfi TAL, Favetta LA, Mauri L, Luciano AM, Cillo F, Gandolfi F.** 1999. Changes in poly(A) tail length of maternal transcripts during in vitro maturation of bovine oocytes and their relation with developmental competence. *Mol Reprod Dev*, 52:427-433.

**Bridges GA, Helser LA, Grum DE, Mussard ML, Gasser CL, Day ML.** 2008. Decreasing the interval between GnRH and PGF2 $\alpha$  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, 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.

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

**Busch DC, Atkins JA, Bader JF, Schafer DJ, Patterson DJ, Geary TW, Smith MF.** 2008. Effect of ovulatory follicle size and expression of estrus on progesterone secretion in beef cows. *J Anim Sci*, 86:553-563.

**Clemente M, de La Fuente J, Fair T, Al Naib A, Gutierrez-Adan A, Roche JF, Rizos D, Lonergan P.** 2009. Progesterone and conceptus elongation in cattle: a direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium? *Reproduction*, 138(3):507-517.

**Colazo MG, Mapletoft RJ.** 2014. A review of current timed-AI (TAI) programs for beef and dairy cattle. *Can Vet J*, 55:772-780.

**Dias CC, Wechsler FS, Day ML, Vasconcelos JLM.** 2009. Progesterone concentrations, exogenous equine chorionic gonadotropin, and timing of prostaglandin F2 $\alpha$  treatment affect fertility in postpubertal Nelore heifers. *Theriogenology*, 72:378-385.

**Dickinson SE.** 2016. Effect of pre-ovulatory follicle size on oocyte transcript abundance in beef cows. University of Missouri. Thesis.

**Diskin MG, Austin EJ, Roche JF.** 2002. Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle. *Domest Anim Endocrinol*, 23:211-228.

**Driancourt MA, Thuel B, Mermillod P, Lonergan P.** 1998. Relationship between oocyte quality (measured after IVM, IVF, and IVC of individual oocytes) and follicle function in cattle. *Theriogenology*, 49:345 (Abstr).

**Fair T, Hulschof SCJ, Hyttel P, Greve T, Boland M.** 1997. Nucleus ultrastructure and transcriptional activity of bovine oocytes in preantral and early antral follicles. *Mol Reprod Dev*, 1:208-215.

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

**Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles FV, Ferriani RA, Navarro PA.** 2009. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*, 71:836-848.

**Garrett JE, Geisert RD, Zavy MT, Morgan GL.** 1988. Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. *J Reprod Fertil*, 84:437-446.

**Garverick HA, Smith MF.** 1986. Mechanisms associated with subnormal luteal function. *J Anim Sci*, 62 (Suppl 2):92-105.

**Geary TW, Whittier JC, Lefever DG.** 1998. Effect of calf removal on pregnancy rates of cows synchronized with the Ovsynch or CO-Synch protocol. *J Anim Sci*, 81(Suppl. 1):278. (Abstr.).

**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 Scient*, 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.

**Geisert RD, Morgan GL, Short EC, Zavy MT.** 1992. Endocrine events associated with endometrial function and conceptus development in cattle. *Reprod Fertil Dev*, 4:301-305.

**Gimenes LU, Sá Filho MF, Carvalho NAT, Torres-Junior JRS, Souza AH, Madureira EH, Trinca LA, Sartorelli ES, Carvalho JBP, Mapletoft RJ, Baruselli PS.** 2008. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. *Theriogenology*, 67: 852-858.

**Hawk HW.** 1983. Sperm survival and transport in the female reproductive tract. *J Dairy Sci*, 66:2645-2660.

**Hendricksen PJM, Vos PLAM, Steenweg WNM, Bevers MM, Dieleman SJ.** 2000. Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. *Theriogenology*, 53:11-20.

**Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T.** 1997. Oocyte growth, capacitation, and final maturation in cattle. *Theriogenology*, 47:23-32.

**Ing NH, Tornesi MB.** 1997. Estradiol up-regulates estrogen receptor and progesterone receptor gene expression in specific ovine uterine cells. *Biol Reprod*, 56:1205-1215.

**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.

**Lamb GC, Stevenson JS, Kesler DJ, Garverick HA, Brown DR, Salfen BE.** 2001. Inclusion of an intravaginal progesterone insert plus GnRH and Prostaglandin F2a for ovulation control in postpartum suckled beef cows. *J Anim Sci*, 79:2253-2259.

**Larson JE, Lamb GC, Stevenson JS, Johnson SK, Day ML, Geary TW, Kesler DJ, Dejarnette JM, Schrick FN, DiCostanzo A, Arseneau JD.** 2006. Synchronization of estrus in suckled beef cows for detected estrus and artificial insemination and timed artificial insemination using gonadotropin-releasing hormone, prostaglandin F2a, and progesterone. *J Anim Sci*, 84:332-342.

**Loneragan P.** 2009. Embryonic loss in cattle: a cow or embryo-induced phenomenon? In Proc. European Embryo Transfer Society 25<sup>th</sup> Annual Meeting POZNAN, Poland, pp 119-125.

**Lucy MC.** 2007. The bovine dominant ovarian follicle. *J Anim Sci*, 85(E. Suppl.), E89-E99.

**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(4):90,1-12.

**Macaulay AD, Gilbert I, Scantland S, Fournier E, Ashkar F, Bastien A, Saadi HA, Gagne D, Sirard MA, Khandjian EW, Richard FJ, Hyttel P, Robert C.** 2016. Cumulus cell transcripts transit to the bovine oocyte in preparation for maturation. *Biol Reprod*, 94:16,1-11.

**Madsen C A, Perry GA, Mogck CL, Daly RF, MacNeil MD, Geary TW.** 2015. Effects of preovulatory estradiol on embryo survival and pregnancy establishment in beef cows. *Anim Reprod Sci*, 158:96-103.

**Mamo S, Carter F, Loneragan P, Leal CL, Al Naib A, McGettigan P, Mehta JP, Evans AC, Fair T.** 2011. Sequential analysis of global gene expression profiles in immature and in vitro matured bovine oocytes: potential molecular markers of oocyte maturation. *BMC Genomics*, 12:151.

**Mann GE, Lamming GE.** 2001. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction*, 121:175-180.

**McNatty KP.** 1979. Follicular determinants of corpus luteum function in the human ovary. *Adv Exp Med Biol*, 112:465-481.

**Meneghetti M, Sá Filho OG, Peres RFG, Lamb GC, Vasconcelos JLM.** 2009. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I: Basis for development of protocols. *Theriogenology*, 72:179-189.

**Mermillod P, Oissaid B, Cognie Y.** 1999. Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. *J Reprod Fertil*, Suppl, 54:449-460.

**Mourot M, Dufort I, Gravel C, Algriany O, Dieleman S, Sirard MA.** 2006. The influence of follicle size, FSH-enriched maturation medium, and early cleavage on bovine oocyte maternal mRNA levels. *Mol Reprod Dev*, 73:1367-1379.

**Mussard ML, Burke CR, Behlke EJ, Gasser CL, Day ML.** 2007. Influence of premature induction of a luteinizing hormone surge with gonadotropin-releasing hormone on ovulation, luteal function, and fertility in cattle. *J Anim Sci*, 85:937-943.

**Otoi T, Yamamoto K, Koyamal N, Tachikawal S, Suzuki T.** 1997. Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. *Theriogenology*, 48:769-774.

**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 Natl 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.

**Perry GA, Perry BL.** 2008a. Effect of preovulatory concentrations of estradiol and initiation of standing estrus on uterine pH in beef cows. *Domest Anim Endocrinol*, 34:333-338.

**Perry GA, Perry BL.** 2008b. Effects of standing estrus and supplemental estradiol on changes in uterine pH during a fixed-time artificial insemination protocol. *J Anim Sci*, 86:2928-2935.

**Pohler KG, Geary TW, Atkins JA, Perry GA, Jinks EM, Smith MF.** 2012. Follicular determinants of pregnancy establishment and maintenance. *Cell Tissue Res*, 349:649-664.

**Sá Filho OG, Meneghetti M, Peres RFG, Lamb GC, Vasconcelos JLM.** 2009. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II: Strategies and factors affecting fertility. *Theriogenology*, 72:210-218.

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

**Seidel GE.** 1995. Reproductive biotechnologies for profitable beef production. In Proc. Beef Improvement Federation. P 28 Sheridan, WY.

**Sirard MA.** 2001. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology*, 1:1241-1254.

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

**Smith MF, McIntush EW, Smith GW.** 1994. Mechanisms associated with corpus luteum development. *J Anim Sci*, 72:1857-1872.

**Spencer TE, Bazer FW.** 2002. Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy. *Front Biosci*, 7:1879-1898.

**Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW, Burghardt RC.** 2007. Fetal-maternal interactions during the establishment of pregnancy in ruminants. *Soc Reprod Fertil Suppl*, 64:379-396.

**Stone GM, Murphy L, Miller BG.** 1978. Hormone receptor levels and metabolic activity in the uterus of the ewe: regulation by oestradiol and progesterone. *Aust J Biol Sci*, 31:395-403.

**Vasconcelos JLM, Sartori R, Oliveira HN, Guenther JG, Wiltbank MC.** 2001. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology*, 56:307-314.

**Waldmann A, Kurykin J, Jaakma U, Kaart T, Aidnik M, Jalakas M, Majas L, Padrik P.** 2006. The effects of ovarian function on estrus synchronization with PGF in dairy cows. *Theriogenology*, 66:1364-1374.

**Zelinski MB, Noel P, Weber DW, Stormshak F.** 1982. Characterization of cytoplasmic progesterone receptors in the bovine endometrium during proestrus and diestrus. *J Anim Sci*, 55:376-383.

## Manutenção ou regressão do corpo lúteo durante vários períodos decisivos da prenhez bovina

M.C. Wiltbank<sup>1,\*</sup>, R. Median<sup>2</sup>, J. Ochoa<sup>3</sup>, G.M. Baez<sup>1</sup>, J.O. Giordano<sup>4</sup>, J.C.P.Ferreira<sup>3</sup>, R. Sartori<sup>5</sup>

Endereços: <sup>1</sup>Departamento de Ciência do Leite, Universidade de Wisconsin- Madison, WI53706, EUA

<sup>2</sup>Universidade Hebraica de Jerusalém, Rehovot 76100, Israel

<sup>3</sup>Departamento de Produção Animal, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP 18168-000, Brasil

<sup>4</sup>Departamento de Ciência Animal, Universidade de Cornell, Ithaca, NY 14853, EUA

<sup>5</sup>Departamento de Ciência Animal, ESALQ, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP 13418-900, Brasil

Título curto: Quatro períodos decisivos para a regressão do CL

\*Autor para correspondência; e-mail: [wiltbank@wisc.edu](mailto:wiltbank@wisc.edu); 1675, Madison, WI, 53706

Telefone: +1(608)263-9413; Fax: +1(608)263-9412.

### Resumo

Em ruminantes, há momentos específicos durante o ciclo estral ou prenhez quando o corpo lúteo (CL) pode sofrer regressão. Esta revisão tentou resumir os mecanismos fisiológicos e celulares envolvidos na regressão ou manutenção do CL durante quatro períodos distintos. O primeiro período é próximo ao dia 7, em animais ovulando após um período de baixa progesterona circulante (P4), como a primeira ovulação puberal ou a primeira ovulação pós-parto, onde o risco de ter um aumento prematuro de prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF) secretada a partir do útero, resulta na regressão precoce do CL e um ciclo estral curto. O segundo período é quando ocorre a luteólise normal no dia 18 a 25 do ciclo ou quando o CL é resgatado pelo interferon-tau secretado pelo embrião em alongamento. Os mecanismos uterinos que determinam o momento desta luteólise ou a prevenção da luteólise foram definidos nesta revisão. Indução e ativação de receptores endometriais de E2 resultam na indução de receptores de ocitocina endometrial que podem ser ativados por pulsos normais de ocitocina. De particular importância é a observação de que os principais mecanismos são ativados somente localmente (ipsilateral) e não por uma rota sistêmica devido à transferência de PGF da veia uterina para a artéria ovariana. Além disso, em nível de CL, estudos estão fornecendo definições para os mecanismos celulares e moleculares que são ativados em resposta a pulsos de PGF uterinos ou pela prenhez. O terceiro período que é discutido ocorre no segundo mês de prenhez (dia 28-60) quando mecanismos indefinidos resultam na manutenção de um CL acessório ipsilateral à gestação, mas de regressão do CL contralateral (lado oposto da prenhez). O período final que é discutido é a regressão do CL pouco antes do parto. Embora, o cortisol do feto parece ser o iniciador primário da luteólise, a PGF parece ser o último sinal que provoca a regressão do CL. Assim, em todos os quatro períodos, a regressão do CL é susceptível de ser causada pelas ações diretas de PGF secretadas pelo útero. Os mecanismos uterinos que resultam na secreção de PGF parecem ser normalmente inibidos durante a fase lútea precoce, tornando a fase lútea curta em um evento atípico e alterado durante o início da prenhez (dia 18-25) resultando na prevenção da luteólise. Durante grande parte da prenhez, os mecanismos que causam a secreção de PGF do útero em resposta a ocitocina estão intactos, mas a luteólise

normalmente não ocorre, talvez devido à falta da transferência eficiente de PGF do útero para o ovário.

**Palavras-chave:** Luteólise, Interferon-tau, prostaglandina F2 $\alpha$

### Introdução

Alterações no desenvolvimento, função e regressão do corpo lúteo (CL) é uma característica primária do ciclo reprodutivo e prenhez de mamíferos. O principal papel do CL nestes processos é devido à secreção do hormônio progesterona (P4). De uma perspectiva histórica, a primeira descrição detalhada do CL foi por Regnier de Graaf (1641-1673) quando ele descreveu os "glóbulos" e explicou que em coelhos "o número de glóbulos é igual ao número de descendentes de um determinado acasalamento" (de Graaf, 1672; Jocelyn e Setchell, 1972). Mais tarde, Gustav Born (1851-1900), um excelente histologista, encaminhou a idéia de que era uma glândula de secreção interna, baseado na alta vascularização e falta de ductos, e especulou que poderia estar envolvido na prenhez [veja excelentes revisões por Simmer (1971); Magnus e Simmer (1972)]. Dois de seus alunos, Ludwig Fraenkel e Vilhelm Magnus, independentemente testaram esta hipótese em seus próprios laboratórios usando métodos experimentais ligeiramente diferentes. Na Alemanha, Ludwig Fraenkel realizou ovariectomia bilateral ou eletrocautério de todos os CLs de coelhos acasalados e eles não mantiveram a prenhez (Fraenkel e Cohn, 1901). Na Noruega, Vilhelm Magnus realizou galvano-cauterização de todos os CLs, bem como a remoção do ovário bilateral de coelhos acasalados e também relatou que a prenhez não foi mantida (Magnus, 1901). Ambos os investigadores chegaram à mesma conclusão que o CL era essencial para a manutenção da prenhez. Magnus mais tarde chamou a secreção endócrina de manutenção da prenhez do CL de "differentierungsstofe" (diferenciando coisas), o primeiro nome dado ao hormônio conhecido mais tarde como progesterona (P4) (Magnus, 1901). Os relatórios iniciais foram recebidos com algum ceticismo. Fraenkel obstinadamente continuou sua pesquisa durante a próxima década em mais de 160 coelhos eventualmente, concluindo que "assim pelo poder de um grande número de minha tese é comprovado: O ovário, em particular o CL, regula a implantação e o desenvolvimento inicial do embrião" (Fraenkel, 1910).



Possivelmente, as mais interessantes propriedades biológicas do CL estão relacionadas com a incrível dinâmica deste tecido. Nos restos do folículo ovulado, uma nova estrutura distinta nasce (Smith et al., 1994). Após a diferenciação, o CL é composto de vários tipos de células (Wiltbank, 1994). As células da teca e da granulosa do folículo diferenciam-se em pequenas e grandes células esteroidogênicas do CL. Essa transformação envolve uma mudança esteroidogênica e enzimática para produzir quantidades enormes de P4. Numa perspectiva de massa, a célula da granulosa tem apenas 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro, antes do aumento de LH, mas aumenta para 38  $\mu\text{m}$  quando se desenvolve dentro da célula luteínica grande totalmente funcional em bovinos. Neste cálculo há um aumento no volume de cerca de 500  $\mu\text{m}^3$  na célula da granulosa a quase 30.000  $\mu\text{m}^3$  na célula luteínica grande, um aumento de 50 vezes do volume celular (Wiltbank et al., 2012). Além disso, há uma rápida e extensa angiogênese de remodelamento do antro folicular avascular em uma estrutura altamente vascularizada com todas as células grandes lúteais adjacentes aos múltiplos capilares (Ellinwood et al., 1978) e um maior fluxo de sangue por grama de tecido (Wiltbank et al., 1989). Então, abruptamente, em momentos específicos e críticos durante o ciclo estral ou prenhez, a estrutura é submetida à regressão. Por exemplo, o CL bovino passa de uma estrutura totalmente funcional de 4 a 6 g, para uma estrutura com pequena produção de P4, baixo fluxo sanguíneo (Zalman et al., 2012) e estruturalmente < 20% do volume original, em um processo conhecido como luteólise ou regressão do CL.

Há quatro períodos que serão discutidos neste artigo quando à regressão do CL em gado de corte e leiteiro (Figura 1). O primeiro período potencial de luteólise que será discutido é ao redor de 7 dias do ciclo. Na maioria dos bovinos de corte e em muitas vacas leiteiras, o primeiro ciclo estral pós-parto e raramente outros ciclos estrais, tem uma

duração curta de ~ 10 d, devido à regressão precoce do CL em ~ 7 dias. A luteólise nesta fase não é impedida pela prenhez, mas mecanismos específicos evitam esta regressão precoce durante a maioria dos ciclos estrais. O segundo período é o tempo clássico para luteólise em vacas não prenhes, próximo ao dia 18-25. Na prenhez, a manutenção do CL durante este período foi denominada "Reconhecimento materno da gestação". Há uma grande quantidade de informações disponíveis sobre os fatores, eventos e mecanismos relacionados à luteólise e prevenção da luteólise durante este período. Por exemplo, há um papel primordial da prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF) uterina, atuando de forma local, como iniciadora da luteólise durante este período clássico da luteólise, com muitos dos mecanismos uterinos e luteínicos que determinam esse processo como sendo claramente definidos. Além disso, o papel primordial do interferon-tau (IFNT) embrionário na prevenção da luteólise tem sido claramente demonstrado, mas este mecanismo ainda precisa de mais pesquisa na área. O terceiro período é durante o segundo mês de prenhez ou dia 30 a 60 quando a regressão do CL pode ocorrer, mas geralmente é impedida por mecanismos que permanecem indefinidos. O período final da luteólise ocorre perto do final da prenhez, com o aumento de estradiol (E2), seguido por um aumento na circulação de PGF que está associada com uma diminuição abrupta da P4 circulante devido à regressão do CL. A regressão do CL neste momento é fundamental para o processo de parto normal. O CL é a principal fonte de P4 durante todo o ciclo estral e prenhez, embora durante os meados finais da prenhez, a placenta secreta uma quantidade variável de P4 (Figura 1). Esta revisão vai enfatizar as semelhanças e diferenças durante estes períodos de luteólise, em termos de origem da PGF e mecanismos intra-uterinos e intraluteais que fundamentam cada ocorrência de luteólise.

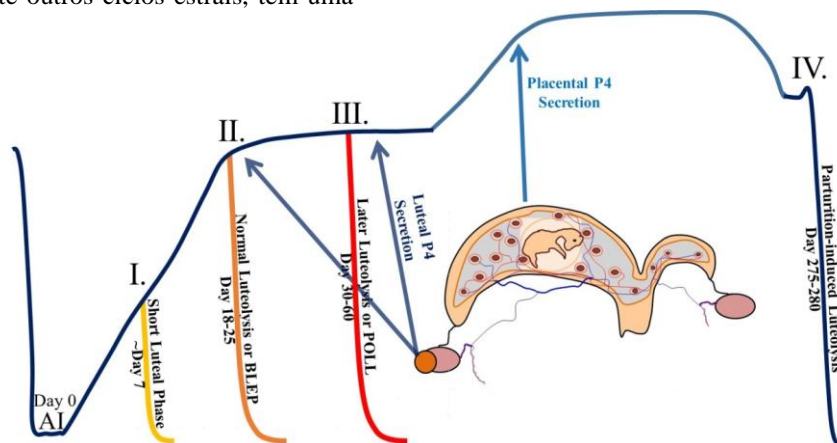


Figura 1: Diagrama teórico das concentrações circulantes de progesterona (P4) durante a prenhez em bovino, enfatizando os quatro períodos chave quando se pode ocorrer a luteólise. Período I – luteólise acontece próximo ao dia 7, e isso leva a uma fase lútea curta. Prenhez não protege contra a luteólise precoce. Período II – tempo normal da luteólise no dia 18-25 quando os pulsos de prostaglandina F2 $\alpha$  do útero regridem o corpo lúteo. Durante a prenhez, a secreção de interferon-tau do útero leva ao bloqueio da luteólise na prenhez precoce (BLEP) e manutenção da função e estrutura do CL. Período III – luteólise posterior que pode ocorrer durante o segundo mês de prenhez, levando à perda da prenhez. Durante esses estágios de prenhez, existem ainda indefinidos mecanismos que causam a prevenção da luteólise tardia (enquete) estendendo a vida do CL na prenhez posterior. Período IV – luteólise induzida por parto ocorre cerca de 2 d antes do parto e permite a continuação da cascata de eventos que produzem o parto.



### Período: fase lútea curta e regressão precoce do CL - dia 5-7

Em ruminantes, ciclos curtos, devido a uma fase lútea inadequada, ocorrem em algumas situações fisiológicas específicas. Por exemplo, ciclos curtos têm sido documentados em bovinos e ovinos seguindo a primeira ovulação após a puberdade (Berardinelli e Butcher, 1979; Berardinelli et al., 1979), após a primeira ovulação pós-parto em bovinos leiteiros e de corte (Garverick et al., 1992b), e depois da primeira ovulação na estação de monta em ovelhas que não estavam anteriormente ciclando (Hunter, 1991). Por exemplo, em bovinos de corte que foram induzidos a ovular por remoção do bezerro ou tratamento com um agente indutor da ovulação, tais como gonadotrofina coriônica humana (hCG) ou o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), há geralmente uma incidência muito elevada de ciclos curtos (~ 80%). Em gado leiteiro, a primeira ovulação pós-parto pode ser seguida por um ciclo curto, mas uma incidência muito mais baixa tem sido relatada (Tabela 1; ~ 27%). A ocorrência de ciclos curtos pode reduzir a fertilidade uma vez que a prenhez é improvável de ocorrer, porque o embrião ainda não sofreu alongamento e não secreta ainda substâncias anti-luteolíticas. Assim, a fertilidade está ausente nestas vacas, ou não houve a fertilização ou um desenvolvimento embrionário de forma adequada.

É também claro que o ciclo curto ocorre devido a um reduzido tempo de vida do CL. Nesse caso, em bovinos, o CL regride em 6-7 d após o cio anterior. A vaca, em seguida, mostra um estro subsequente 8-11 d após o estro. Como evidenciado pelas condições fisiológicas que resultam em ciclos curtos, um dos fatores de risco principais para o

tempo de vida reduzido do CL é um período prolongado sem P4 circulante antes da ovulação.

Para compreender os mecanismos fisiológicos que produzem o ciclo estral curto, diferentes modelos experimentais em ruminantes foram utilizados. Um modelo que tem sido utilizado é a ovelha na estação não-reprodutiva que é induzida a ovular com o tratamento de GnRH (Hunter, 1991) (0,25 µg a cada 2 h durante 18-24 h, seguido por uma dose ovulatória de GnRH, 125 µg). O pré-tratamento por 36 h com P4 resultou em 100% de ovelhas com um CL de vida normal, enquanto que, a indução da ovulação com este protocolo, sem pré-tratamento com P4 resultou em ~ 70% de fases luteínicas reduzidas. Em ovelhas, a regressão do CL ocorre entre o dia 4 e 6 após a indução do pico de LH (Robinson et al., 2008). Em gado de corte, a indução da primeira ovulação pós-parto pelo desmame precoce ou remoção temporária de bezerros ou o uso de tratamentos hormonais, tais como GnRH ou hCG, resulta em uma elevada porcentagem de vacas com ciclos curtos, ao passo que o pré-tratamento com P4 ou progestágenos antes desses processos de indução impeçam esses ciclos curtos (Copelin et al., 1988; Salfen et al., 1995). Finalmente, em novilhas leiteiras ou vacas cíclicas, uma elevada porcentagem de ciclos curtos é induzida se as vacas recebem um tratamento precoce com GnRH após a indução da luteólise com PGF (0 ou 24 h após a PGF dada no dia 6 ou 7 do ciclo estral) (Peters e Pursley, 2003; Rantala et al., 2009). Cada um destes modelos é caracterizado por inadequada circulação de E2 durante o período de proestro, geralmente a ovulação de um folículo menor, a produção de uma CL com uma vida útil reduzida, e um ciclo estral curto.

Tabela 1. Incidência de fases lúteas curtas ou ciclos curtos em vacas de leite.

Tipo de Vaca	Ciclo curto (%)	Referência
Vaca de leite		
Holstein lactante	76/281 (27.1%)	Fallon (1958)
Holstein lactante	16/118 (13.6%)	Hinshelwood <i>et al.</i> (1982)
Holstein lactante	9/27 (33.0%)	Stevenson and Britt (1979)
Friesian lactante	5/18 (27.8)	Savio <i>et al.</i> (1990)
Holstein lactante	21/39 (53.8%)	Staples <i>et al.</i> (1990)
Holstein lactante	176/645 (27.3%)	Royal <i>et al.</i> (2000)
<b>Total</b>	<b>303/1,128 (26.9%)</b>	

Utilizando estes modelos animais, os mecanismos que produzem regressão precoce do CL em geral foram divididos em efeitos relacionados com: 1) o folículo pré-ovulatório, 2) o CL, e / ou 3) o útero. Relacionado com o folículo, existem claras diferenças entre o folículo pré-ovulatório de ovelhas ou bovinos que têm uma fase luteal curta incluindo: diminuição dos receptores de LH em células da granulosa e diminuição da produção de E2 folicular, como evidenciado por uma diminuição de E2 circulante ou diminuição de E2 no fluido folicular (Hunter et al., 1986; White et al., 1987; Inskip et al., 1988; Braden et al., 1989a; Braden et al., 1989b). Assim, a função folicular antes de

ciclos estrais curtos é claramente defeituosa, e concentrações circulantes de E2 pré-ovulatórias são reduzidas em cada uma das situações fisiológicas que resultam na redução da fase luteínica.

Relacionado com o CL, o desenvolvimento inicial e função do CL foram semelhantes até 4 d após o pico de LH em ovelhas com fases luteínicas normais ou reduzidas. Após esse tempo, o CL é regredido rapidamente, de forma que se assemelha muito ao tempo de regressão do CL no final da fase lútea (Hunter et al., 1989). Em gado de corte, os padrões de P4 foram semelhantes até o dia 5 após o estro e, posteriormente, houve uma diminuição rápida na P4

circulante como a regressão do CL (Copelin et al., 1987). Uma sugestão foi que o curto tempo de vida do CL seja devido a falta de gonadotrofina ou a capacidade de resposta gonadotrófica. Contrariamente a esta ideia, não houve diferenças nos receptores de LH ou na atividade da adenilato ciclase no início de desenvolvimento do CL que foram destinados ao curto período de vida vs. ao longo período de vida (Smith et al., 1996). Além disso, não houve diferença detectável na secreção de LH durante a fase luteal precoce para estes dois tipos de animais (Garverick et al., 1988). Além disso, tratamento com luteotrópicos, tais como o tratamento com pulsos de GnRH ou hCG, não foram capazes de resgatar o tempo de vida luteal normal (Smith et al., 1999). Além disso, não há nenhuma diferença na resposta à PGF em CLs tenham uma vida útil normal ou curta (Copelin et al., 1988). Assim, embora o CL regrida prematuramente em vacas ou ovelhas com um ciclo curto, não há nenhuma evidência de que o CL é funcionalmente incompetente ou que regrida devido aos mecanismos que são internos a ele.

Finalmente, maior evidência é para o papel principal do útero no ciclo luteal de ruminantes. Os experimentos mais definitivos utilizaram bovinos ou ovelhas histerectomizadas que foram induzidos a ovular. Vacas intactas tinham um ciclo estral de 8,8 d, enquanto que, vacas histerectomizadas que foram tratadas de forma semelhante tinham um CL funcional prolongado e não retornaram ao estro (Copelin et al., 1987). De forma semelhante, a histerectomia resultou em uma função normal do CL em ovelhas destinadas a ter curta duração do CL (Southey et al., 1988). Assim, parece claro que o tempo de vida luteal é devido a um efeito direto do útero. A imunização ativa contra PGF (Copelin et al., 1989), ou a inibição da secreção de PGF foram ambos eficazes no prolongamento da vida útil e aumentaram a secreção de P4 pelo CL, indicando que PGF uterina é a causa primária da luteólise. Consistente com esta ideia, vacas destinadas a ter um CL de vida curta têm secreção precoce de PGF uterina (Zollers et al., 1991) e um aumento precoce no metabólito da PGF circulante que começa junto dos primeiros aumentos de E2 circulante durante a primeira onda folicular (Southey et al., 1988; Hunter et al., 1989; Cooper et al., 1991; Hunter, 1991; Garverick et al., 1992c). Além disso, infusão intra-uterina de IFNT, a proteína que normalmente causa a manutenção do CL durante a prenhez nos ruminantes, pode impedir ciclo curto (Garverick et al., 1992a). Pelo menos parte da ação de IFNT é de redução da secreção uterina de PGF. Assim, todos estes diversos tipos de evidências apontam claramente para a secreção prematura de PGF do útero como um iniciador direto da luteólise prematura na vaca com um CL de curta duração.

Parece também haver um papel crítico do E2 do folículo em desenvolvimento nos mecanismos associados à reduzida vida do CL. Concentrações circulantes baixas de E2 pré-ovulatório podem levar a uma vida útil curta do CL (Vasconcelos et al., 2001; Peters e Pursley, 2003; Rantala et al., 2009), mesmo em animais com elevadas concentrações de P4 anteriores ao período pré-ovulatório. No entanto, a suplementação de bovinos de corte no pós-parto recente com E2, por si só não foi suficiente para

restabelecer fases luteínicas normais, mas exigiram tanto P4 elevada antes do período pré-ovulatório, quanto elevado E2 durante o período pré-ovulatório para haver um CL de duração fisiológica (Sa et al., 2009). Assim, elevada P4 circulante, seguida por uma diminuição na P4 e um aumento de E2 circulante são componentes importantes que regulam o desenvolvimento da capacidade de resposta à ocitocina durante a fase luteal precoce e previne CL de curta duração, em situações fisiológicas normais (Hunter et al., 1989; Hunter, 1991; Beard e Hunter, 1996). Além disso, há um papel crítico para o E2 do folículo dominante na primeira onda folicular após a ovulação nos mecanismos que estão subjacentes à secreção prematura de PGF em fases luteínicas curtas (Beard e Hunter, 1994). Isto é evidenciado pelo fato de que o tratamento com fluido folicular livre de esteroides inibiu o crescimento do folículo dominante e desenvolvimento prematuro da resposta à ocitocina em ovelhas destinadas a ter um CL de vida curta. Assim, parece claro que a P4 elevada seguida por elevado E2 na ausência de P4 são críticos para a prevenção da prematura resposta à ocitocina induzida por E2 durante a fase luteal inicial e indução da luteólise precoce.

A Figura 2 mostra um modelo teórico, simplificado comparando as alterações nas células endometriais uterinas durante a fase lútea inicial em animais destinados a ter um CL com tempo de vida normal ou reduzido. Em animais destinados a ter um período normal, nos dias 5 a 7 do ciclo as células endometriais não respondem ao E2, devido à ação de P4 e E2 antes da ovulação. Por conseguinte, mesmo que haja um aumento no E2 durante a primeira onda folicular, este E2 não tem um efeito sobre as células endometriais uterinas, que impedem a indução dos receptores de ocitocina, e impede a luteólise prematura. No entanto, nos animais que terão ciclo curto, a capacidade de resposta ao E2 está presente nas células de endométrio e o aumento no E2 circulante durante a primeira onda folicular permite a indução de receptores de ocitocina, com a subsequente secreção de PGF induzida pela ocitocina, e luteólise prematura. Estes eventos assemelham-se aos eventos que ocorrem nos dias 17-20 nas células do endométrio uterino de animais destinados a ter um tempo de vida normal do CL.

## **Período II: luteólise normal: Papel do útero e PGF - Dias 18-25 do ciclo estral**

Sob condições normais, se nenhuma fecundação ocorrer durante o ciclo estral, o CL regressa ~18-19 d após o estro anterior. Este processo é referido como luteólise normal, e envolve uma diminuição na P4 (luteólise funcional), bem como uma diminuição no volume do CL e do fluxo sanguíneo (luteólise estrutural). A luteólise funcional ocorre ao longo de um período de ~24 h em vacas ou ovelhas, se a luteólise é designada pela P4 circulante <1 ng/ml, ou em ~32 h se a concentração circulante de P4 <0,5 ng/ml for utilizada para denominar luteólise funcional (Ginther et al., 2007).

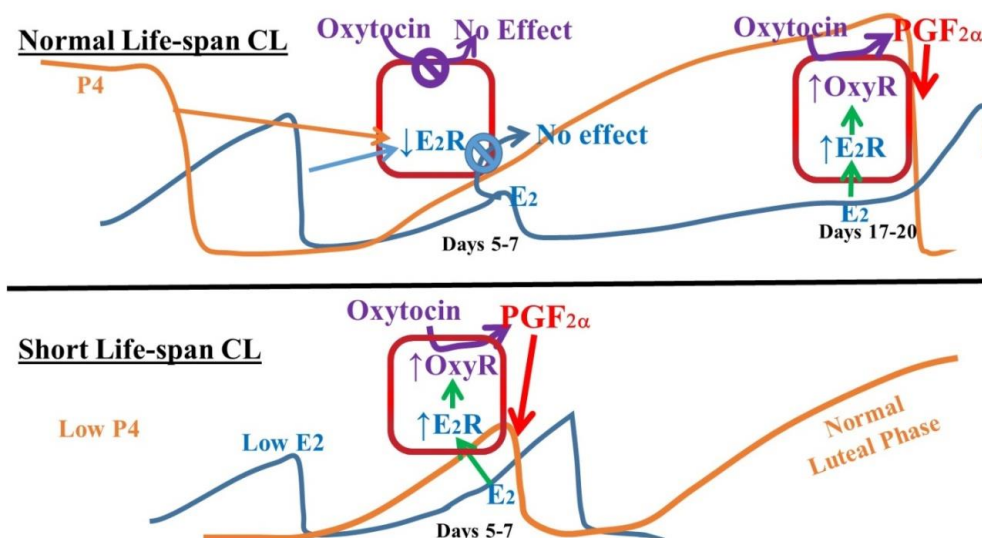


Figura 2. Propõe-se um modelo fisiológico para os mecanismos que produzem um CL com uma duração curta ou normal. A célula que é mostrada é a célula endometrial uterina em 5-7 d ou no d 17-20 durante a expectativa de vida normal do CL. O texto discute os mecanismos mostrados na figura. E2R = receptor de estradiol; OxyR = Receptor de ocitocina; P4 = progesterona; E2 = estradiol-17 $\beta$ ; PGF $_{2\alpha}$  = prostaglandina F $_{2\alpha}$ .

O papel do útero na determinação do tempo de vida do CL foi primeiramente demonstrado em cobaias, mostrando que o CL foi mantido após a histerectomia (Loeb, 1927). Em ruminantes, uma demonstração clara do papel do útero na luteólise foi publicado em 1956 usando a histerectomia em ovinos e bovinos (Wiltbank e Casida, 1956). Os ovinos e bovinos que tiveram remoção completa do útero não retornaram ao cio e a vida útil do CL foi prolongada. Por exemplo, em ovelhas os CLs marcados com tinta nanquim ainda estavam presentes em 52, 53, 76, 98 e 107 d após a histerectomia. Da mesma forma, as vacas que tiveram histerectomia total tiveram CL marcado com tinta em 27, 98 e 154 d após a histerectomia (Wiltbank e Casida, 1956). Assim, a remoção completa do útero levou a uma manutenção prolongada do CL. Curiosamente, quando parte do útero (ipsilateral ao CL) permaneceu após a histerectomia, ocorreu a regressão do CL e os animais voltaram ao estro. Numerosos estudos de histerectomia total ou histerectomia unilateral foram realizados e o papel do útero na luteólise se encontra claramente delimitado (Collins et al., 1966). Além disso, a histerectomia ipsilateral (corno uterino no mesmo lado do CL) invariavelmente prolongou o tempo de vida do CL, enquanto histerectomia contralateral falhou consistentemente a afetar o tempo de vida do CL (Inskeep e Butcher, 1966).

Logo se percebeu que a luteolisina derivada do útero que regrediu o CL foi capaz de chegar ao CL ipsilateral através de um caminho de transferência local veno-arterial. A artéria ovariana em ruminantes é extremamente enovelada e em estreita justaposição à veia uterina, permitindo assim a transferência da luteolisina uterina, PGF, para a artéria ovariana (Ginther e Delcampo, 1974; Mapletoft et al., 1976b). Em um experimento em que a artéria ovariana foi separada da veia uterina, três das quatro ovelhas mantiveram o CL até o abate no dia 25 (Barrett et al., 1971). Experimentos envolvendo histerectomia unilateral e

subsequente anastomose cruzada das veias uterinas, forneceram fortes evidências para a transferência local de uma luteolisina uterina para a artéria ovariana (Mapletoft et al., 1976b). Quando a veia do corno uterino intacto se junta com a veia uterina do lado histerectomizado do CL, o CL regride no tempo normal, demonstrando claramente o envolvimento da via útero-ovário e veno-arterial na luteólise durante este período (Mapletoft et al., 1976b).

A possibilidade de que a PGF fosse o agente luteolítico foi sugerida pela primeira vez durante um workshop reprodutivo em 1965 (Hansel, 1966). Evidências foram posteriormente comprovadas em ratos com tratamento com PGF $_{2\alpha}$  que causou a luteólise (Gutknecht et al., 1969; Pharriss e Wyngarde 1969). Em seguida, uma série de experimentos usando ovários transplantados por McCracken, demonstrou o efeito luteolítico da PGF em ovelhas (Goding et al., 1967; McCracken, 1971). Existem atualmente várias evidências que demonstram convincentemente que a PGF é a causa de luteólise uterina em ruminantes (Knickerbocker et al., 1988). Em primeiro lugar, a PGF é abundantemente produzida no útero de ruminantes não prenhes (McCracken et al., 1972) e não são aumentadas as concentrações do PGF na drenagem venosa uterina, em lavados uterinos e no tecido uterino próximo ao momento da luteólise (Wilson et al., 1972). Em segundo lugar, os pulsos de PGF nas veias uterinas e as concentrações circulantes do metabolito da PGF (PGFM) (15-ceto-13,14-di-hidro-PGF $_{2\alpha}$ ) correspondem ao tempo de P4 decrescente em novilhas não prenhes (Kindahl et al., 1976; Ginther et al., 2007). Em terceiro lugar, a inibição da produção de PGF uterina impede a luteólise espontânea em ovelhas e novilhas (Lewis e Warren, 1977). Em quarto lugar, a imunização passiva com anticorpos que são específicos para PGF, prolongou o tempo de vida do CL (Fairclough et al., 1981). Em quinto lugar, existe boa evidência de que a PGF pode ser transportada de forma eficiente a partir da veia uterina para a artéria ovariana em quantidades suficientes para tornar os

mecanismos locais fisiologicamente viáveis (Lamond et al., 1973; McCracken et al., 1981). Finalmente, o tratamento com pulsos de PGF que mimetizam os pulsos naturais de PGF podem induzir luteólise completa semelhante à luteólise natural (Schramm et al., 1983; Ginther et al., 2009; Atli et al., 2012). Assim, há evidências convincentes de que a luteólise em ruminantes é iniciada pela PGF proveniente do útero não-prenhe.

O padrão de secreção de PGF foi claramente demonstrado como pulsátil. A Figura 3 mostra um padrão típico de PGFM, ocitocina e P4 durante a luteólise em uma vaca entre os dias 18 e 20. Como se mostra, as concentrações

de P4 diminuem rapidamente e maior parte da redução ocorre num período de 24 h. A diminuição da P4 está associada a quatro pulsos distintos de PGF, que se refletem nos pulsos de PGFM circulantes mostrados na Figura 3. Finalmente, os pulsos de ocitocina circulante ocorrem rotineiramente antes da luteólise com pouco efeito sobre a circulação de PGFM. No entanto, durante o tempo de luteólise, cada pulso de ocitocina é associado a um pulso de PGFM. Este padrão enfatiza o papel crítico para a capacidade de resposta à ocitocina, aos receptores de ocitocina, ou seja, na produção de pulsos de PGFM e, finalmente, a luteólise.

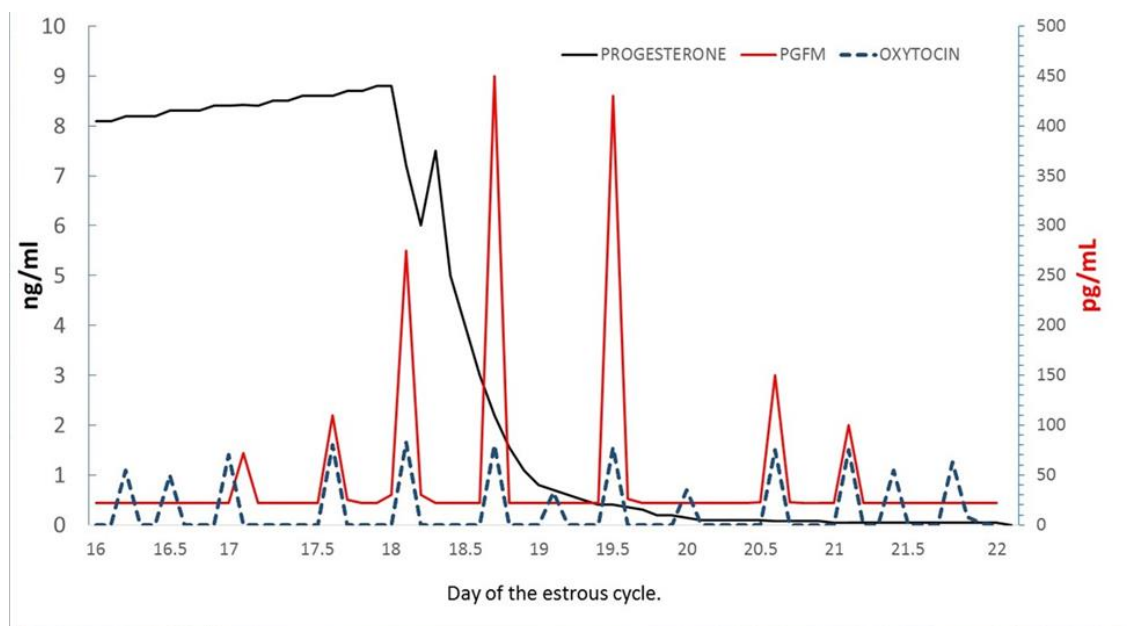


Figura 3. Diagrama dos padrões de progesterona, a ocitocina e as concentrações de PGFM em circulação durante o período da luteólise em bovinos. Como as abordagens da luteólise, pulsos de ocitocina agem sobre as células do endométrio uterino para causar a produção de pulsos de PGF, detectado como PGFM na circulação periférica, e esses pulsos causam a diminuição da circulação da P4 e luteólise.

Os mecanismos no interior das células do endométrio que produzem os pulsos de PGF foram mostrados de forma simplificada na Figura 2 e são mostrados em maior detalhe em outras publicações (McCracken et al., 1999; Spencer e Hansen, 2015). Claramente, a indução de receptores de E2 tem um papel central nos mecanismos que iniciam estes pulsos. Durante a maior parte da fase luteínica normal, a expressão dos receptores de E2 em células endometriais é inibida pela ação da P4 circulante elevada sobre os receptores de P4 nestas células. Perto do final da fase luteínica, a P4 elevada começa a causar “downregulation” nos receptores de P4 e isso permite a expressão do receptor de E2 perto do momento da luteólise (Spencer e Bazer, 1995; Spencer et al., 1995). O início da luteólise é dependente da ativação dos receptores de E2 pelo aumento do E2 circulante que acompanha o desenvolvimento de um folículo dominante na onda. Isto é ilustrado pelo atraso na luteólise que é causado por eliminação do E2 circulante por *ablação folicular guiada por ultrassom* (Araújo et al., 2009) ou inibição do crescimento do folículo por tratamento com fluido folicular

livre de esteróide (Salfen et al., 1996). Este atraso na luteólise é impedido pelo tratamento com baixas doses de E2 (Salfen et al., 1996; Araujo et al., 2009). Uma das principais ações do E2 nas células do endométrio é a indução de receptores de ocitocina (Robinson et al., 2001). Após a indução de receptores de ocitocina, as células endometriais uterinas produzem pulsos de PGF em resposta aos pulsos naturais de ocitocina que ocorrem durante o dia (Ginther et al., 2012).

Assim, a luteólise natural é ligada aos distintos pulsos de PGF a partir das células do endométrio que são induzidas por pulsos de ocitocina. Estudos utilizando [<sup>3</sup>H]-PGF indicaram que, durante o pico de um pulso de PGF, ~10% da PGF secretada é transportada da veia uterina para a artéria ovariana (Lamond et al., 1973; McCracken et al., 2010). Como a PGF é transportada entre os sistemas vasculares tem sido mostrado em estudos recentes que demonstram a expressão de um transportador específico de PG nas três camadas, túnica íntima, túnica média e túnica adventícia, tanto da veia uterina quanto da artéria ovariana (Lee et al., 2010; McCracken et al., 2011). O transportador principal de PG é um membro da família do transportador de

soluto orgânico que possui os domínios 12-transmembrana que é denominado SLC02A1, também conhecido como OATP2A1 (Kanai et al., 1995; Schuster, 1998; Schuster, 2002). Um inibidor específico do transportador de PG, DIDS, foi capaz de bloquear a luteólise, mas não alterou a expressão do receptor de E2, receptor da ocitocina, COX-2, transportador de PG, ou produção uterina de PGF (Lee et al., 2013). Assim, todos os mecanismos luteolíticos estavam intactos, mas ainda eficientes no transporte de PGF, neste caso, para fora das células endometriais, que é necessário para o processo luteolítico.

Uma vez que a PGF atinge o CL, alguns dos processos celulares e moleculares são ativados, o que resulta no processo luteolítico completo. Embora muitos estudos avaliaram os processos que estão envolvidos na ação biológica da PGF no CL, a maioria desses estudos tem

utilizado doses supra-fisiológicas de PGF. Estudos recentes tem monitorado os mecanismos que seguem os pulsos naturais de PGF (Ginther e Beg, 2009) ou usado pulsos mais fisiológicos de PGF em uma tentativa de mimetizar e sincronizar os mecanismos que ocorrem durante a luteólise natural (Ginther et al., 2009; McCracken et al., 2012). Nosso laboratório tem usado infusões intra-uterinas com baixas doses de PGF, a fim de avaliar a expressão gênica em resposta a pulsos sincronizados de PGF (Atli et al., 2012). A Figura 4 mostra uma visão simplificada de algumas das mudanças de expressão de genes que ocorrem no CL após cada pulso de PGF. Embora apenas uma única célula seja mostrada, nesse caso, uma célula luteal grande, que contém a maioria dos receptores de PGF, devemos entender que vários tipos de células e complexos processos estão ocorrendo durante a luteólise.

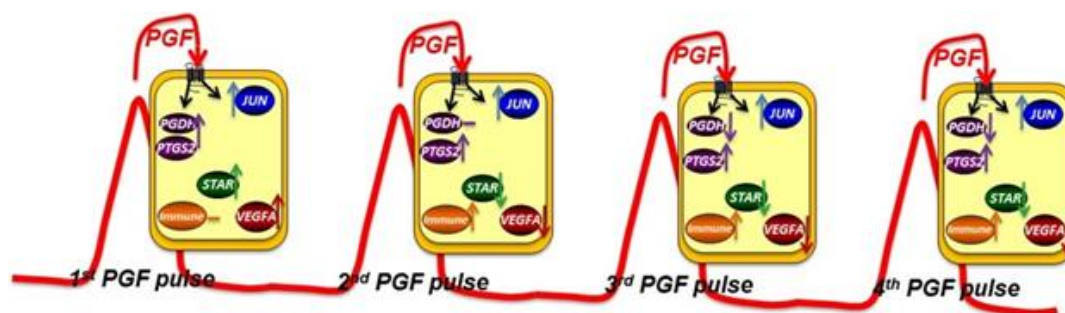


Figura 4. Modelo fisiológico das alterações na expressão gênica dentro do CL durante a injeção intra-uterina de baixas doses de PGF, projetado para imitar os pulsos fisiológicos de PGF ocorridos durante a luteólise. Veja o texto para os detalhes.

Os cinco tipos principais de eventos da expressão gênica são ilustrados em resposta a cada pulso de PGF. O gene de resposta precoce, Jun, que aumenta em resposta a cada pulso de PGF, é representativo de muitos genes de resposta precoce (Atli et al., 2011). As vias de síntese de PGF são complexas, mas são mostrados dois genes, um envolvido na produção de PGF, a prostaglandina G/H sintase-2 (PTGS2), e um envolvido no metabolismo de PGF, a prostaglandina desidrogenase (PGDH). Depois do primeiro pulso de PGF ambos os genes são estimulados, apesar do fato de que PGDH acabará por ser inibido durante o processo de luteólise, após o terceiro pulso. A indução das vias da síntese da PGF e a eventual inibição das vias metabólicas da PGF irão permitir a produção de PGF intraluteal e uma via de auto amplificação para produção de PGF (Tsai e Wiltbank, 1996; Tsai e Wiltbank, 1997). A produção de P4 é, eventualmente, inibida, mas, semelhante ao PGDH, a proteína reguladora aguda esteroidogênica ou StAR, é estimulada pelo primeiro pulso de PGF, mas, em seguida, inibida pelo pulso 2, 3 e 4. Eventualmente, todos os genes da via esteroidogênicos são inibidos, mas a StAR é a forma mais agudamente regulada.

Muitos genes que estão associados com a função imunológica são estimulados durante o processo luteolítico. Alguns podem ser devido à produção de moléculas imunomoduladoras das células lúteas e, eventualmente, o aumento da expressão é devido ao influxo de células imunes no CL durante o processo luteolítico. Assim, os genes relacionados ao sistema imunológico começam a ser

estimulados principalmente após o 2º pulso de PGF e continuam a aumentar depois do 3º e 4º pulso. Alterações na vias angiogênicas são parte fundamental no processo de luteólise. A expressão de VEGFA é mostrada como um exemplo de alterações na angiogênese durante os pulsos de PGF. Depois do primeiro pulso existe um aumento paradoxal da expressão de mRNA de VEGF e, em seguida, todos os pulsos subsequentes produzem uma inibição nos genes que estão envolvidos na estimulação da formação e função dos vasos sanguíneos.

Assim, este diagrama simples ilustra algumas das vias principais que são ativadas durante o processo luteolítico. As vias de transcrição, tais como aquelas reguladas por alguns dos genes de resposta precoce, são ativadas e são susceptíveis às mudanças subsequentes na expressão do gene. A esteroidogênese é diminuída quando se prossegue a luteólise funcional. A luteólise estrutural prossegue quando os vasos sanguíneos começam a desagregação e células do sistema imune estão envolvidas em alterações estruturais e funcionais importantes que ocorrem durante a luteólise. Finalmente, embora os pulsos de PGF do útero sejam os iniciadores da luteólise, a produção intraluteal de PGF é importante provavelmente para a expressão de vias luteolíticas completas.

## Período II. Bloqueio da luteólise no início da prenhez - Dia 18-25 de gestação



A prenhez provoca um bloqueio da luteólise que por vezes tem sido chamado de "reconhecimento materno da gestação". Em ruminantes, a prenhez protege o CL da regressão através de vias locais e não sistêmicas. Isto foi claramente demonstrado em uma série de experimentos isolados com cornos ou anastomoses vasculares. Por exemplo, a transferência de embriões no corno uterino cirurgicamente isolado resultou na regressão do CL se o embrião foi transferido contralateral ao CL, mas o CL foi mantido, se o embrião foi transferido ipsilateral à prenhez em vacas (Del Campo et al., 1977) e ovelhas (Moor, 1968). Em cornos cirurgicamente isolados, a anastomose cirúrgica da veia principal uterina do lado prenhe para a veia uterina do lado não-prenhe resultou na manutenção do CL no lado não-prenhe em ovelhas (Mapletoft et al., 1975) e vacas (DEL Campo et al., 1980). Isto demonstrou que o sinal de prenhez foi local e não sistêmico, e ocorreu na veia uterina local. Da mesma forma, a anastomose da artéria do ovário a partir do lado prenhe para o lado não-prenhe resultou na manutenção do CL (Mapletoft e Ginther, 1975; Mapletoft et al., 1976c) demonstrando que o sinal transmitido a partir da veia uterina para a artéria ovariana é apenas no mesmo lado e não o lado oposto da prenhez. Assim, é evidente que embora alguns sinais de prenhez podem ser de fora do útero, o sinal crítico de prenhez que protege o CL em ruminantes durante a prenhez inicial atua localmente através da passagem da veia uterina para a artéria ovariana e não através da circulação sistêmica. Além disso, estes estudos demonstraram que a manutenção da prenhez não é apenas a ausência de um sinal, tal como a ausência de pulsos de PGF, mas o bloqueio ativo da luteólise. Isto é evidente uma vez que o sangue da veia uterina do corno não-prenhe, que ainda está presente quando o sangue da veia da trompa uterina prenhe é adicionado e o CL está protegido. As duas ovelhas que tiveram coágulos na anastomose apresentaram regressão normal do CL.

Experimentos com transferência de embriões mostraram que, quando o embrião foi colhido no dia 13 ou antes, na ovelha (Moor e Rowson, 1966; Moor et al., 1969) ou no dia 16 ou antes na vaca (Northey e French, 1980) houve regressão do CL em tempo normal. Em contrapartida se o embrião foi colhido após este "período crítico", a expectativa de vida do CL foi prorrogada, demonstrando o tempo que o sinal de prenhez começou a ser emitido pelo embrião. Em ovelhas cíclicas, infusão intra-uterina de homogeneizados ou proteínas secretadas por embriões a partir do dia 14-15 estendeu a vida do CL, enquanto que, os homogeneizados de embriões com 21-25 d não alteraram a vida útil do CL (Rowson e Moor 1967; Godkin et al., 1984b), demonstrando o intervalo limitado durante a prenhez, quando o sinal é secretado pelo conceito. O princípio ativo dos homogeneizados foi uma protease-termolábil, que tinha propriedades consistentes com uma proteína de baixo peso molecular (Rowson e Moor, 1967; Martal et al., 1979; Godkin et al., 1982). Estudos posteriores mostraram que uma única proteína, denominada inicialmente proteína trofoblástica bovina ou ovina do tipo 1, e posteriormente IFNT, era a única responsável pela manutenção do CL durante a prenhez em ruminantes (Godkin et al., 1984a; Thatcher et al., 1984; Godkin et al., 1997).

Assim, durante o período crítico nos dias 17 a 25, em bovino, o embrião sofre um alongamento muito acelerado, alimentado pela secreção do lúmen uterino. O trofotoderma de ruminantes secreta IFNT durante o alongamento inicial do embrião e o IFNT tem demonstrado ser o sinal para a manutenção definitiva do CL durante a prenhez precoce (Roberts, 1996; Bazer et al., 1997). Além do útero, o IFNT atua de um modo parácrino para evitar a expressão do receptor de E2 alfa e do receptor de ocitocina no epitélio luminal do endométrio e do epitélio glandular superficial, alterando assim a libertação de pulsos luteolíticos de PGF (Spencer et al., 2007b). O IFNT também estimula a expressão de genes específicos, denominados genes estimulados por interferon (Antoniazzi et al., 2013), no útero (Johnson et al., 1999) e nos tecidos periféricos tais como o CL (Oliveira et al., 2008; Bott et al., 2010) e células do sangue periférico (Gifford et al., 2007; Shirasuna et al., 2012). Assim, o IFNT que escapa do lúmen uterino pode impedir a regressão atuando diretamente sobre o CL e esta ação na circulação poderia ser independente ou em sinergia com as ações do IFNT na secreção da PGF uterina.

Estudos anteriores indicaram também que o CL da prenhez tem reduzida sensibilidade à PGF (Silvia et al., 1984a; Silvia e Niswender, 1984; Silvia e Niswender, 1986). Grande parte dessa resistência à ação da PGF é atribuída a ações de prostaglandina E2 e E1 (PGE) proveniente do útero prenhe. Com efeito, a PGE pode bloquear a luteólise natural ou induzida pela PGF quer *in vivo* ou *in vitro* (Michael et al., 1993; Miyamoto et al., 1993; Fortier et al., 2004; Weems et al., 2011). Além disso, estudos recentes mostraram que infusão de IFNT ovino recombinante, na veia uterina ou jugular, protegeu o CL ovino das ações luteolíticas da PGF, mantendo a P4 intraluteal e circulante e o volume do CL (Antoniazzi et al., 2013).

Sabe-se que a P4 do CL é essencial para a manutenção da prenhez e que o IFNT produzido pelo embrião em alongamento é o sinal definitivo para a manutenção do CL durante a prenhez inicial (Roberts, 1996; Bazer et al., 1997; Spencer et al., 2007b; Dorniak et al., 2013). Neste momento, ainda há uma controvérsia substancial sobre as vias endócrinas precisas envolvidas na manutenção do CL por IFNT, com três possíveis caminhos. Em primeiro lugar, o mecanismo clássico é que o IFNT altera a expressão gênica uterina, resultando em pulsos reduzidos de PGF e, assim, ausência de luteólise (Thatcher et al., 1984; Knickerbocker et al., 1986; Danet-Desnoyers et al., 1994; Spencer et al., 2007a; Dorniak et al., 2013). Em segundo lugar, o IFNT aumenta a produção uterina de PGEs (PGE1 e PGE2) e PGE bloqueia a ação da PGF no CL, mantendo a função luteal (Ottobre et al., 1984; Silvia et al., 1984a; Silvia et al., 1984b; Wiltbank e Ottobre, 2003; Krishnaswamy et al., 2009; Weems et al., 2011; Lee et al., 2012b; Weems et al., 2012). A terceira convincente evidência recente demonstra que o IFNT sai do lúmen uterino e interage diretamente com o CL e pode bloquear diretamente a ação da PGF no CL (Gifford et al., 2007; Oliveira et al., 2008; Bott et al., 2010; Hansen et al., 2010; Antoniazzi et al., 2013).

Apesar de não ser possível neste manuscrito selecionar definitivamente qual deste(s) mecanismo(s)

endócrino é o mais importante na manutenção do CL durante a prenhez inicial, alguma perspectiva pode ser instigante. Embora a saída do IFNT a partir do útero para a circulação sistêmica seja um fato, o mecanismo sistêmico necessário para esta via não é consistente com a maior parte dos estudos mais antigos que definitivamente mostraram efeito local e não um mecanismo sistêmico envolvido na manutenção de CL em ruminantes. Assim, o terceiro mecanismo é pouco provável que seja o único mecanismo anti-luteolítico, embora, estudos recentes mostraram que a infusão na circulação do IFNT, no útero ou na veia jugular, protegeu o CL ovino das ações luteolíticas da PGF, mantendo a P4 circulante e intraluteal e o volume do CL (Antoniazzi et al., 2013). Independente disso, parece ser possível que a liberação do IFNT endócrino pode ainda estar atuante sobre as células do endométrio uterino. Relacionado com o primeiro mecanismo, a PGF circulante é geralmente mais encontrada em ruminantes prenhes do que em ruminantes não-prenhes (Lewis et al., 1977; Vicente e Inskeep 1986; Arosh et al., 2004), embora pulsos de PGF podem diferir em ruminantes prenhes e não prenhes. Finalmente, estudos anteriores indicaram que o CL da prenhez é menos sensível à PGF (Silvia et al., 1984a; Silvia e Niswender, 1984; Silvia e Niswender, 1986). Grande parte dessa resistência à ação da PGF é atribuída a ações de PGE proveniente do útero prenhe. Além disso, PGE<sub>2</sub>, mas não o IFNT, é transportado através do plexo útero-ovariano consistente com um sinal local que ocorre durante a prenhez inicial (Lee et al., 2012a). Além disso, a relação PGE<sub>2</sub>:PGF<sub>2α</sub> na veia útero-ovariana era ~ 72 vezes superior, e, na artéria ovariana, foi de ~ 115 vezes maior no dia 16 de prenhez versus no ciclo estral de ovelhas não gestantes, que indica a eficiência do útero no transporte de PGE<sub>2</sub> no ovário. Com base em todos estes resultados, parece provável que a PGE uterina secretada em resposta ao IFNT produzido pelo embrião em alongamento, tem um papel fundamental na proteção do CL da luteólise durante a prenhez inicial (dia 18-25 em bovino).

### **Período III. Prevenção da luteólise tardia durante a prenhez - Dia 30-60 da prenhez**

O segundo mês da prenhez não é um tempo típico a se pensar em luteólise. No entanto, é provável que o IFNT deixe de ser um fator importante na manutenção do CL durante o segundo mês de prenhez, uma vez que os picos de IFNT aumentam no conceito em desenvolvimento até o dia 23 de gestação e depois diminuem drasticamente durante as próximas semanas (Godkin et al., 1988; Stojkovic et al., 1995). Isto provoca uma pergunta óbvia: o que mantém o CL após o dia 30 de prenhez, quando o IFNT não está mais presente? Relacionada a esta pergunta sabe-se que há perda de prenhez entre 30 e 60 d de gestação. Por exemplo, recentemente resumiu-se resultados de 46 estudos recentes e de ~25.000 prenhez que foram avaliadas por ultrassom no Dia 32 e novamente no Dia 60, onde foi observado 11,95% de perda de prenhez durante este período (Wiltbank et al., 2016). A perda da prenhez durante este período de tempo é ainda maior para embriões/fetos clones. A principal causa da perda de prenhez durante este período poderia ser a morte inicial embrionária e luteólise posterior ou, alternativamente,

poderia ser iniciada por luteólise durante este período seguido de perda de prenhez (Giordano et al., 2010).

Nós nos tornamos mais interessados no processo de luteólise durante este período de tempo, baseado em observações recentes que fizemos no tempo de regressão do CL e do CL acessório que é contralateral à prenhez (Wiltbank et al., 2016). Neste experimento, induziu-se CL acessório em vacas em lactação por tratamento com GnRH no dia 5 após a IA. Vacas prenhes podem, portanto, ter um CL acessório presente em ambos os lados, do mesmo lado da prenhez (ipsilateral) ou no ovário oposto (contralateral). Curiosamente, embora o CL ipsilateral raramente regrida, quase todos os CLs contralaterais regridem durante a prenhez. De interesse particular, a maioria dos CLs acessórios regride durante o segundo mês de prenhez. Assim, os mecanismos estão presentes no mesmo lado que a prenhez, permitindo a manutenção do CL ipsilateral, enquanto que, no corno contralateral, há mecanismos que resultam na regressão luteal. Este resultado também demonstra que mecanismos locais e não sistêmicos são responsáveis pela manutenção ou regressão do CL durante este período.

Quais são os mecanismos locais que resultam na manutenção do CL durante o segundo mês de prenhez, mas que não estão presentes, pelo menos, em quantidade suficiente, para manter o CL no ovário contralateral? Há algumas coisas a considerar. Em primeiro lugar, parece provável que o CL contralateral regride devido à secreção de PGF do corno uterino contralateral, uma vez que o CL não sofre regressão espontânea em ruminantes com o útero removido (Wiltbank e Casida, 1956; Mapletoft et al., 1976a.). Relacionado a esta ideia, a capacidade de resposta à ocitocina e a capacidade do útero de sintetizar e secretar PGF persiste durante toda a prenhez com o aumento das concentrações de PGFM de aproximadamente 6 vezes quando a ocitocina é administrada em vacas entre o dia 50 e 280 da prenhez (Schallenberger et al., 1989; Fuchs et al., 1996). Em segundo lugar, os cornos uterinos não foram isolados em nosso experimento e, portanto, qualquer que seja o agente local que esteja envolvido neste processo deve ter uma diferença de ação no ovário contralateral e ipsilateral. Assim, pode haver uma substância protetora que está presente em concentrações maiores no ipsilateral do que no lado contralateral. No entanto, a explicação mais provável, em nossa opinião, é que o corno uterino ipsilateral tem maior fluxo de sangue do que o corno contralateral, como previamente relatado (Ford et al., 1979; Ford e Chenault, 1981; Panarace et al., 2006). Assim, neste cenário, o fluxo arterial uterino não permitiria a transferência eficiente de PGF secretado da veia uterina à artéria ovariana no lado ipsilateral, mas o transporte eficiente de PGF continua a ocorrer no lado contralateral, potencialmente devido ao menor fluxo sanguíneo uterino (Ford et al., 1979). Assim, a hipótese do fluxo sanguíneo é a explicação mais simples para diferenciar a regressão do CL entre os ovários ipsilateral e contralateral, embora a secreção diferencial de PGF ou de uma substância protetora lútea não possa ser excluída neste momento.

Um tópico a considerar é se a regressão do CL contralateral pode representar uma condição que é pertinente

para a questão prática da perda da prenhez durante o segundo mês de gestação. Uma vez que a perda de prenhez pode ser iniciada por morte do embrião ou, alternativamente, por meio da regressão do CL (Kastelic et al., 1991; Giordano et al., 2012), parece provável que quaisquer perdas devidas a regressão do CL utilizam mecanismos semelhantes, como observado com a regressão do CL contralateral durante este tempo. Assim, em uma prenhez em que não haja aumento do fluxo sanguíneo uterino suficiente entre 30 e 60 d de gestação, seria susceptível à perda devido à PGF uterina. Especulamos que a PGF seja secretada pelos cornos uterinos durante a prenhez, mas o fluxo sanguíneo uterino elevado não permite que esta PGF seja transferida para a artéria ovariana. Obviamente, mais pesquisas precisam ser feitas para explicar completamente este período potencialmente crítico para a regressão ou manutenção do CL.

#### **Período IV. Luteólise induzida pré parto - Dia - 270-290 da prenhez**

Nos ruminantes, o sinal para iniciar o processo de parto surge do feto. Parece que o tempo de parto é codificado no genoma fetal e os mecanismos são ativados por eventos de desenvolvimento específicos que ocorrem no feto em desenvolvimento (Jenkins e Young, 2004). O sinal do feto para iniciar o parto em ruminantes está relacionado ao cortisol, um glicocorticoide, proveniente do amadurecimento do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. As concentrações de cortisol circulante aumentam exponencialmente durante as últimas semanas de gestação, produzindo o que é denominado "pico de cortisol" (Poore et al., 1998). Quando o aumento do cortisol é imitado pelo tratamento do cordeiro com betametasona (glicocorticoide), uma consistente mudança na expressão gênica acontece em tempos específicos após tratamento: o mRNA da aromatase da placenta aumentada por 14 h, as células do epitélio luminal do endométrio tem aumento drástico na expressão do receptor de E2 por 28 h, e aumenta o mRNA da ocitocina e a ligação da ocitocina em 28 h, com um aumento consistente na atividade eletromiográfica contrátil do útero em 48-50 h, com início definitivo das dores de parto ocorrendo em  $56,6 \pm 0,8$  h após o tratamento (Wathes et al., 1996). Assim, uma sequência de eventos pode ocorrer no útero durante o parto semelhante ao que ocorre no tempo normal de luteólise (dia 18-20), com, primeiramente, expressão do receptor de E2, então a ativação dos receptores de E2 por E2 circulante, e a indução rápida dos receptores de ocitocina. A ligação da ocitocina a receptores de ocitocina pode levar a contrações do miométrio durante o trabalho de parto, e a indução de receptores de ocitocina foi observada durante o parto natural (Wathes et al., 1996), mas não durante o parto induzido por betametasona (Leung et al., 1999). Parece provável que a ativação de receptores de ocitocina por pulsos de ocitocina seja responsável pela grande secreção de PGF e regressão do CL antes do parto.

A Figura 5 mostra as alterações nas concentrações hormonais perto do momento do parto em bovinos da raça Holandesa [adaptado de Rasmussen et al. (1996) e Mattos et al. (2004)]. As concentrações de P4 permanecem elevadas, cerca de 36 h antes do parto e então diminuem para menos

da metade das concentrações às 24 h antes do parto e atingem concentrações basais em 12 h antes do parto (Rasmussen et al., 1996). As concentrações circulantes de PGFM seguem um padrão oposto com a concentração basal até cerca de 48 h antes do parto quando PGFM circulante começa a aumentar dramaticamente (Mattos et al., 2004), muito provavelmente devido a um aumento da secreção das células do útero. Após o parto, as concentrações de PGFM permanecem elevadas, consistente com a secreção do útero uma vez que a placenta foi perdida em 24 h após o parto. As concentrações de PGFM próximas deste período são mais do que 5 vezes maiores (2000 pg/ml) do que as concentrações do pico de PGFM em de um pulso luteolítico (300-400 pg/ml durante o pico de luteólise) na luteólise normal entre os dias 18 e 20 (Ginther et al., 2010). As concentrações circulantes de E2 também aumentam drasticamente acima de 600 pg/mL ou cerca de 100 vezes maior do que o pico de concentrações circulantes pré-ovulatórias de E2 (Sartori et al., 2004). Este E2 é proveniente da placenta, evidenciado pela diminuição dramática em vacas com eliminação normal da placenta após o parto, mas com E2 ainda elevado em vacas com retenção de placenta (Rasmussen et al., 1996).

Há mudanças dramáticas na produção de PG perto do parto em diferentes tecidos e devido a diferentes mecanismos de regulação. Durante os últimos 15-20 d de gestação, há um aumento em PGE2 na circulação fetal, que segue o aumento lento do cortisol fetal durante este período. Há também o aumento dramático na secreção de PGF refletida no aumento de PGFM circulante, no entanto, este é um evento tardio que ocorre dentro de 2 d do parto. A PGE2 tem origem a partir da placenta devido à indução de células da placenta em PGH2 pelas baixas quantidades de cortisol que começam a vir do feto em desenvolvimento. Este aumento na secreção de PGE2 não é dependente de E2 circulante, uma vez que tratamento com um inibidor da aromatase não altera o aumento de PGE2 na circulação fetal (Whittle et al., 2000). Curiosamente, esta PGE2 pode ser importante para a indução da aromatase perto do período do parto, a qual aciona o aumento drástico da produção de E2 pela placenta. Subsequentemente, subindo o cortisol, combinado com o aumento das concentrações de E2, induz a expressão em células de PGH2 uterinas maternas e isso faz com que o aumento dramático na secreção do PGF seja observado imediatamente antes do parto. Para isso, o E2 e o cortisol são necessários para o aumento de PGFM que é demonstrado pelo aumento dramático em PGFM ( $> 500$  pg/ml) em resposta ao cortisol na presença de concentrações fisiológicas de E2, mas nenhum aumento de cortisol é dado na ausência de E2 devido ao tratamento simultâneo com um inibidor de aromatase (Whittle et al., 2000).

Há provas substanciais de que a PGF tem um papel obrigatório na luteólise pré parto, como visto pelos padrões de PGFM discutidos acima. Tratamentos que iniciam o parto prematuro, também induzem o aumento característico da secreção de PGF do útero antes da luteólise e do parto (Wu et al., 2004). A inibição da produção de PGF por tratamento com medicamentos anti-inflamatórios não-esteróides (AINEs) atrasam ou impedem a luteólise perto do parto (Jenkin, 1992; Sugimoto et al., 1998; Jenkin e Young, 2004). Finalmente, ratas que têm um nocaute do receptor da PGF



não tem luteólise e, portanto, não entram em trabalho de parto normal, a menos que os ovários/CL sejam removidos (Sugimoto et al., 1997; Tsuboi et al., 2003).

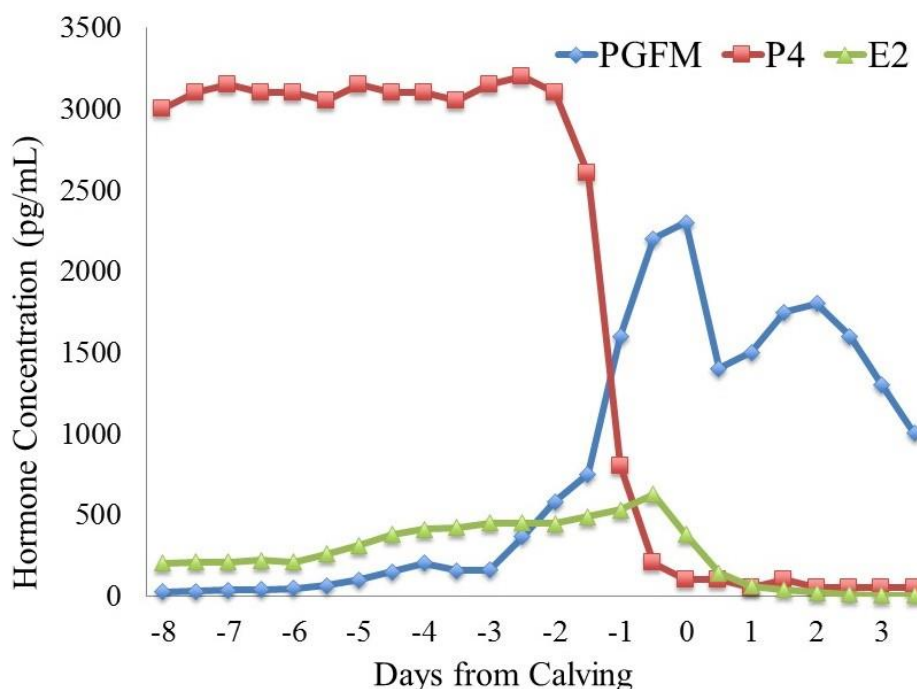


Figura 5. Concentrações de progesterona (P4), estradiol (E2) e PGFM, de circulação normalizada para o tempo do parto em vacas leiteiras Holstein. De Rasmussen et al. (1996) e Mattos et al. (2004).

### Conclusões

Os três dos quatro períodos de tempo de luteólise têm sido bem caracterizados. Em cada caso, existe um papel claro dos receptores de E2 na indução dos receptores de ocitocina. Isto acontece prematuramente no caso dos ciclos curtos, durante o processo luteolítico normal por volta do dia 18-20 em bovinos, e durante a luteólise que resulta o parto. Depois que os receptores de ocitocina estão presentes, a ocitocina induz a secreção do PGF a partir das células do endométrio em cada um desses eventos luteolíticos. Assim, a secreção uterina da PGF é uma parte essencial de cada momento da luteólise. No ciclo curto e na luteólise normal, a PGF uterina produzida é transferida por contra-corrente via veno-arterial e eventualmente chega ao ovário PGF suficiente para resultar em luteólise, após vários pulsos do PGF. Durante o parto, há quantidades tão elevadas do PGF sendo secretadas pelo útero (PGFM circulante 10-vezes mais alta) que possivelmente fazem PGF atingir o CL via circulação sistêmica. Depois de concluir esta revisão da literatura, os autores não encontraram situação fisiológica convincente que demonstre regressão espontânea do CL em ruminantes na ausência de PGF derivada do útero ou PGF exógena. Assim, o conceito de que a PGF causa luteólise em todos os casos em ruminantes é fortemente apoiado por cada tipo de evento luteolítico bem investigado.

A questão-chave que nos intriga depois desta revisão de literatura é como é que o CL é protegido da luteólise

durante a prenhez, após o período em que o IFNT deixa de ser secretado pelo embrião em ruminantes. Durante a maior parte da prenhez, o útero responde a ocitocina com pulsos de PGF (Schallenberger et al., 1989; Fuchs et al., 1996), mas não ocorre a luteólise. Para nós, as duas respostas mais lógicas para esta questão fisiológica são: 1) Há uma substância protegendo o CL da ação da PGF durante grande parte da duração da prenhez ou 2) a PGF não atinge o CL durante a maior parte da prenhez, talvez devido à falta de transporte da PGF pelas vias.

### Agradecimentos

Pela concessão do apoio da Estação Experimental de Wisconsin, FAPESP e CNPq do Brasil, e BARD.

### Referências

- Antoniazzi AQ, Webb BT, Romero JJ, Ashley RL, Smirnova NP, Henkes LE, Bott RC, Oliveira JF, Niswender GD, Bazer FW, Hansen TR. 2013. Endocrine delivery of interferon tau protects the corpus luteum from Prostaglandin F2 alpha-induced luteolysis in ewes. *Biol Reprod*, 88:1-12.
- Araujo RR, Ginther OJ, Ferreira JC, Palhao MM, Beg MA, Wiltbank MC. 2009. Role of follicular estradiol-17beta in timing of luteolysis in heifers. *Biol Reprod*, 81:426-437.

- Arosh JA, Banu SK, Chapdelaine P, Madore E, Sirois J, Fortier MA.** 2004. Prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling in corpus luteum: a basis for autoregulation of luteal function. *Endocrinology*, 145:2551-2560.
- Atli MO, Bender RW, Mehta V, Bastos MR, Luo WX, Vezina CM, Wiltbank MC.** 2012. Patterns of gene expression in the bovine corpus luteum following repeated intrauterine infusions of low doses of prostaglandin F2alpha. *Biol Reprod*, 86:130:1-13.
- Atli MO, Mehta V, Baruah KK, Bender RW, Bastos MR, Guenther JN, Luo W, Vezina CM, Wiltbank MC.** 2011. Induction and localization of five immediate early genes (IEGs) in the bovine corpus luteum (CL) at 30 min after prostaglandin F2 alpha (PGF) treatment. *Reprod Domest Anim*, 46:87-88.
- Barrett S, Blockey MAD, Brown JM, Cumming IA, Goding JR, Mole BJ, Obst JM.** 1971. Initiation of oestrous cycle in ewe by infusions of PGF-2alpha- to autotransplanted ovary. *J Reprod Fertil*, 24:136-137.
- Bazer FW, Spencer TE, Ott TL.** 1997. Interferon tau: a novel pregnancy recognition signal. *Am J Reprod Immunol*, 37:412-420.
- Beard AP, Hunter MG.** 1994. Effects of bovine follicular fluid and exogenous oestradiol on the GnRH-induced short luteal phase in anoestrous ewes. *J Reprod Fertil*, 100:211-217.
- Beard AP, Hunter MG.** 1996. Effects of exogenous oxytocin and progesterone on GnRH-induced short luteal phases in anoestrous ewes. *J Reprod Fertil*, 106:55-61.
- Berardinelli JG, Butcher RL.** 1979. Source of progesterone in prepuberal ewes. *Biol Reprod*, 20, A114-A115.
- Berardinelli JG, Dailey RA, Butcher RL, Inskeep EK.** 1979. Source of progesterone prior to puberty in beef heifers. *J Anim Sci*, 49:1276-1280.
- Bott RC, Ashley RL, Henkes LE, Antoniazzi AQ, Bruemmer JE, Niswender GD, Bazer FW, Spencer TE, Smirnova NP, Anthony RV, Hansen TR.** 2010. Uterine vein infusion of interferon Tau (IFNT) extends luteal life span in ewes. *Biol Reprod*, 82:725-735.
- Braden TD, King ME, Odde KG, Niswender GD.** 1989a. Development of preovulatory follicles expected to form short-lived corpora lutea in beef cows. *J Reprod Fertil*, 85:97-104.
- Braden TD, Sawyer HR, Niswender GD.** 1989b. Functional and morphological characteristics of the first corpus luteum formed after parturition in ewes *J Reprod Fertil*, 86:525-533.
- Collins WE, Inskeep EK, Howland BE, Pope AL, Casida LE.** 1966. Effect of hysterectomy and corpus luteum induction on pituitary-ovarian relationships in ewes. *J Anim Sci*, 25:87-96.
- Cooper DA, Carver DA, Villeneuve P, Silvia WJ, Inskeep EK.** 1991. Effects of progestagen treatment on concentrations of prostaglandins and oxytocin in plasma from the posterior vena cava of post-partum beef cows. *J Reprod Fertil*, 91:411-421.
- Copelin JP, Smith MF, Garverick HA, Youngquist RS.** 1987. Effect of the uterus on subnormal luteal function in anestrous beef-cows. *J Anim Sci*, 64:1506-1511.
- Copelin JP, Smith MF, Garverick HA, Youngquist RS, Mcvey WR, Inskeep EK.** 1988. Responsiveness of bovine corpora-lutea to prostaglandin-F2-alpha - comparison of corpora-lutea anticipated to have short or normal lifespans. *J Anim Sci*, 66:1236-1245.
- Copelin JP, Smith MF, Keisler DH, Garverick HA.** 1989. Effect of active immunization of pre-partum and post-partum cows against prostaglandin F-2 alpha on lifespan and progesterone secretion of short-lived corpora lutea. *J Reprod Fertil*, 87:199-207.
- Danet-Desnoyers G, Wetzels C, Thatcher WW.** 1994. Natural and recombinant bovine interferon-tau regulate basal and oxytocin-induced secretion of prostaglandins F2a and E2 by epithelial cells and stromal cells in the endometrium. *Reprod Fertil Dev*, 6:193-202.
- Del Campo MR, Rowe RF, French LR, Ginther OJ.** 1977. Unilateral relationship of embryos and the corpus luteum in cattle. *Biol Reprod*, 16:580-585.
- Delcampo MR, Maplettoft RJ, Rowe RF, Critser JK, Ginther OJ.** 1980. Unilateral utero-ovarian relationship in pregnant cattle and role of uterine vein. *Theriogenology*, 14:185-193.
- Dorniak P, Bazer FW, Spencer TE.** 2013. Physiology and endocrinology symposium: Biological role of interferon tau in endometrial function and conceptus elongation. *J Anim Sci*, 91:1627-1638.
- Ellinwood WE, Nett TM, Niswender GD.** 1978. Ovarian vasculature: structure and function. *Plenum*, New York.
- Fairclough RJ, Smith JF, McGowan LT.** 1981. Prolongation of the estrous-cycle in cows and ewes after passive-immunization with PGF antibodies. *J Reprod Fertil*, 62:213-219.
- Fallon GR.** 1958. Some aspects of oestrus in cattle, with reference to fertility on artificial insemination. I. The pattern of oestrous cycles. *Queens J Agric Anim Sci*, 15:25-34.
- Ford SP, Chenault JR.** 1981. Blood-flow to the corpus luteum-bearing ovary and ipsilateral uterine horn of cows during the estrous-cycle and early-pregnancy. *J Reprod Fertil*, 62:555-562.
- Ford SP, Chenault JR, Echternkamp SE.** 1979. Uterine blood-flow of cows during the estrous-cycle and early-pregnancy - effect of the conceptus on the uterine blood-supply. *J Reprod Fertil*, 56:53-62.
- Fortier MA, Arosh JA, Banu S, Madore E, Parent J, Chapdelaine P.** 2004. A novel integrated view of the role of prostaglandins for recognition and establishment of pregnancy in ruminants. *J Endocrinol Reprod*, 8:45-68.
- Fraenkel L.** 1910. Neue experiment zur function des corpus luteum. *Archiv fur Gynakologie*, 91:705-730.
- Fraenkel L, Cohn F.** 1901. Experimentelle untersuchungen des corpus luteum auf die insertion des eies (Theorie von Born). *Anat Anz*, 20:294-300.
- Fuchs AR, Rollyson MK, Meyer M, Fields MJ, Minix JM, Randel RD.** 1996. Oxytocin induces prostaglandin F-2 alpha release in pregnant cows: Influence

of gestational age and oxytocin receptor concentrations. *Biol Reprod*, 54:647-653.

**Garverick HA, Moser MT, Keisler DH, Hamilton SA, Roberts RM, Smith MF.** 1992a. Luteal function after intrauterine infusion of recombinant bovine interferon alpha-1 into postpartum beef cows expected to have short or normal luteal phases. *J Reprod Fertil*, 94:319-325.

**Garverick HA, Parfet JR, Lee CN, Copelin JP, Youngquist RS, Smith MF.** 1988. Relationship of pre-ovulatory and post-ovulatory gonadotropin concentrations to subnormal luteal function in postpartum beef-cattle. *J Anim Sci*, 66:104-111.

**Garverick HA, Zollers WG, Smith MF.** 1992b. Mechanisms associated with corpus-luteum life-span in animals having normal or subnormal luteal function. *Anim Reprod Sci*, 28:111-124.

**Garverick HA, Zollers WG, Smith MF.** 1992c. Mechanisms associated with corpus luteum life span in animals having normal or subnormal luteal function. *Anim Reprod Sci*, 28:111-124.

**Gifford CA., Racicot K, Clark DS, Austin KJ, Hansen TR, Lucy MC, Davies CJ, Ott TL.** 2007. Regulation of interferon-stimulated genes in peripheral blood leukocytes in pregnant and bred, nonpregnant dairy cows. *J Dairy Sci*, 90:274-280.

**Ginther OJ, Araujo RR, Palhao MP, Rodrigues BL, Beg MA.** 2009. Necessity of sequential pulses of prostaglandin F2alpha for complete physiologic luteolysis in cattle. *Biol Reprod*, 80:641-648.

**Ginther OJ, Beg MA.** 2009. Concentrations of circulating hormones normalized to pulses of a prostaglandin F-2 alpha metabolite during spontaneous luteolysis in mares. *Theriogenology*, 72:1111-1119.

**Ginther OJ, Delcampo CH.** 1974. Vascular anatomy of uterus and ovaries and unilateral luteolytic effect of uterus - cattle. *Am J Vet Res*, 35:193-203.

**Ginther OJ, Khan FA, Hannan MA, Beg MA.** 2012. Temporal interrelationships at 15-min intervals among oxytocin, LH, and progesterone during a pulse of a prostaglandin F2 alpha metabolite in heifers. *Anim Reprod Sci*, 133:63-70.

**Ginther OJ, Shrestha HK, Fuenzalida MJ, Shahiduzzaman AKM, Beg MA.** 2010. Characteristics of pulses of 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F2alpha before, during, and after spontaneous luteolysis and temporal intrapulse relationships with progesterone concentrations in cattle. *Biol Reprod*, 82:1049-1056.

**Ginther OJ, Silva LA, Araujo RR, Beg MA.** 2007. Temporal associations among pulses of 13,14-dihydro-15-keto-PGF(2alpha), luteal blood flow, and luteolysis in cattle. *Biol Reprod*, 76:506-513.

**Giordano JO, Guenther JN, Lopes G, Fricke PM.** 2012. Changes in serum pregnancy-associated glycoprotein, pregnancy-specific protein B, and progesterone concentrations before and after induction of pregnancy loss in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, 95:683-697.

**Giordano JO, Guenther JN, Lopes G, McGrath MF, Fricke PM.** 2010. Serum pregnancy-associated glycoprotein (PAG) and progesterone concentrations after

induction of pregnancy loss at day 39 of gestation in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, 93:81-82.

**Godkin JR, McCracken JA, Baird DT.** 1967. Study of ovarian function in ewe by means of a vascular autotransplantation technique. *J. Endocrinol*, 39:37-52.

**Godkin JD, Bazer FW, Moffatt J, Sessions F, Roberts RM.** 1982. Purification and properties of a major, low molecular weight protein released by the trophoblast of sheep blastocysts at day 13-21. *J Reprod Fertil*, 65:141-150.

**Godkin JD, Bazer FW, Roberts RM.** 1984a. Ovine trophoblast protein 1, an early secreted blastocyst protein, binds specifically to uterine endometrium and affects protein synthesis. *Endocrinology*, 114:120-130.

**Godkin JD, Bazer FW, Thatcher WW, Roberts RM.** 1984b. Proteins released by cultured Day 15-16 conceptuses prolong luteal maintenance when introduced into the uterine lumen of cyclic ewes. *J Reprod Fertil*, 71:57-64.

**Godkin JD, Lifsey BJ, Gillespie BE.** 1988. Characterization of bovine conceptus proteins produced during the periattachment and postattachment periods of early pregnancy. *Biol Reprod*, 38, 703-711.

**Godkin JD, Smith SE, Johnson RD, Dore JJ.** 1997. The role of trophoblast interferons in the maintenance of early pregnancy in ruminants. *Am J Reprod Immunol*, 37:137-143.

**Gutknecht GD, Cornette JC, Pharriss BB.** 1969. Antifertility properties of prostaglandin F 2. *Biol Reprod*, 1:367-371.

**Hansel W.** 1966. Luteotrophic and luteolytic mechanisms in bovine corpora lutea. *J Reprod Fertil S*, 33-&.

**Hansen TR, Henkes LK, Ashley RL, Bott RC, Antoniazzi AQ, Han H.** 2010. Endocrine actions of interferon-tau in ruminants. *Society of Reproduction and Fertility* supplement 67.

**Hinshelwood MM, Hansen PJ, Hauser ER.** 1982. Short estrous cycles in postpartum cows as influenced by level of milk-production, suckling, diet, season of calving and interval to 1st estrus. *Theriogenology*, 18:383-392.

**Hunter MG.** 1991. Characteristics and causes of the inadequate corpus luteum. *J Reprod Fertil*, 91-99.

**Hunter MG., Ayad VJ, Gilbert CL, Southee JA, Wathes DC.** 1989. Role of prostaglandin-F-2-alpha and oxytocin in the regression of GnRH-induced abnormal corpora lutea in anestrus ewes. *J Reprod Fertil*, 85:551-561.

**Hunter MG, Southee JA, Mcleod BJ, Haresign W.** 1986. Progesterone pretreatment has a direct effect on GnRH-induced preovulatory follicles to determine their ability to develop into normal corpora lutea in anestrus ewes. *J Reprod Fertil*, 76:349-363.

**Inskeep EK, Braden TD, Lewis PE, Garcawinder M, Niswender GD.** 1988. Receptors for luteinizing-hormone and follicle-stimulating-hormone in largest follicles of postpartum beef-cows. *Biol Reprod*, 38:587-591.

**Inskeep EK, Butcher RL.** 1966. Local component of utero-ovarian relationships in ewe. *J Anim Sci*, 25:1164-1168.

- Jenkin G.** 1992. Oxytocin and prostaglandin interactions in pregnancy and at parturition. *J Reprod Fertil Suppl*, 45:97-111.
- Jenkin G, Young IR.** 2004. Mechanisms responsible for parturition; the use of experimental models. *Anim Reprod Sci*, 82-83:567-581.
- Jocelyn HD, Setchell BP.** 1972. An annotated translation of Regnier deGraaf's new treatise concerning the generative organs of women (1672). *J Reprod Fertil Suppl*, 17:77-206.
- Johnson GA, Austin KJ, Collins AM, Murdoch WJ, Hansen TR.** 1999. Endometrial ISG17 mRNA and a related mRNA are induced by interferon-tau and localized to glandular epithelial and stromal cells from pregnant cows. *Endocrine*, 10:243-252.
- Kanai N, Lu R, Satriano JA, Bao Y, Wolkoff AW, Schuster VL.** 1995. Identification and characterization of a prostaglandin transporter. *Science*, 268:866-869.
- Kastelic JP, Northey DL, Ginther OJ.** 1991. Spontaneous embryonic death on Days 20 to 40 in heifers. *Theriogenology*, 35:351-363.
- Kindahl H, Edqvist LE Bane A, Granstrom E.** 1976 Blood-levels of progesterone and 15-keto-13,14-dihydro-prostaglandin-F(alpha-2) during normal estrous-cycle and early-pregnancy in heifers. *Acta Endocrinologica*, 82:134-149.
- Knickerbocker JJ, Thatcher WW, Bazer FW, Barron DH, Roberts RM.** 1986. Inhibition of uterine prostaglandin-F2 alpha production by bovine conceptus secretory proteins. *Prostaglandins*, 31:777-793.
- Knickerbocker JJ, Wiltbank MC, Niswender GD.** 1988. Mechanisms of luteolysis in domestic livestock. *Domest Anim Endocrinol*, 5:91-107.
- Krishnaswamy N, Chapdelaine P, Tremblay JP, Fortier MA.** 2009. Development and characterization of a simian virus 40 immortalized bovine endometrial stromal cell line. *Endocrinology*, 150:485-491.
- Lamond DR, Drost M, McCracken JA, Lamond DR.** 1973. Countercurrent transfer of prostaglandin in ewe. *Prostaglandins*, 3:691-702.
- Lee J, McCracken JA., Banu SK, Arosh JA.** 2013. Intrauterine inhibition of prostaglandin transporter protein blocks release of luteolytic PGF2alpha pulses without suppressing endometrial expression of estradiol or oxytocin receptor in ruminants. *Biol Reprod*, 89.
- Lee J, McCracken JA, Banu SK, Rodriguez R, Nithy TK, Arosh JA.** 2010. Transport of prostaglandin F-2 alpha pulses from the uterus to the ovary at the time of luteolysis in ruminants is regulated by prostaglandin transporter-mediated mechanisms. *Endocrinology*, 151:3326-3335.
- Lee J, McCracken JA, Stanley JA, Nithy TK, Banu SK, Arosh JA.** 2012a. Intraluteal prostaglandin biosynthesis and signaling are selectively directed towards PGF2alpha during luteolysis but towards PGE2 during the establishment of pregnancy in sheep. *Biol Reprod*, 87:97.
- Lee J, McCracken JA, Stanley JA, Nithy TK, Banu SK, Arosh JA.** 2012b. Intraluteal prostaglandin biosynthesis and signaling are selectively directed towards PGF(2alpha) during luteolysis but towards PGE(2) during the establishment of pregnancy in sheep. *Biol Reprod*, 87.
- Leung ST, Wathes DC, Young IR, Jenkin G.** 1999. Effect of labor induction on the expression of oxytocin receptor, cytochrome P450 aromatase, and estradiol receptor in the reproductive tract of the late-pregnant ewe. *Biol Reprod*, 60:814-820.
- Lewis GS, Wilson L, Jr, Wilks JW, Pexton JE, Fogwell RL, Ford SP, Butcher RL, Thayne WV, Inskip EK.** 1977. PGF2 alpha and its metabolites in uterine and jugular venous plasma and endometrium of ewes during early pregnancy. *J Anim Sci*, 45:320-327.
- Lewis PE, Warren JE.** 1977. Effect of indomethacin on luteal function in ewes and heifers. *J Anim Sci*, 45:763-767.
- Loeb L.** 1927. The effects of hysterectomy on the system of sex organs and on the periodicity of the sexual cycle in the guinea pig. *Am J Physiol*, 83:202-208.
- Magnus V.** 1901 Ovariets betydning for svangerskabet med saerligt hensyntil corpus luteum. *Norsk Magazin for Laegevidenskaben*, 62:1138-1142.
- Magnus V, Simmer HH.** 1972. The first experiments to demonstrate an endocrine function of the corpus luteum. II. Ludwig Fraenkel versus Vilhelm magnus. *Sudhoffs Archiv*, 56:76-99.
- Mapletoft RJ, Del Campo MR, Ginther OJ.** 1976a. Local venoarterial pathway for uterine-induced luteolysis in cows. *Proc Soc Exp Biol Med*, 153:289-294.
- Mapletoft RJ, Delcampo MR, Ginther OJ.** 1975. Unilateral luteotropic effect of uterine venous effluent of a gravid uterine horn in sheep. *Proc Soc Exp Biol Med*, 150:129-133.
- Mapletoft RJ, Delcampo MR, Ginther OJ.** 1976b. Local utero-ovarian venoarterial pathway in cows. *J Anim Sci*, 43:295-296.
- Mapletoft RJ, Ginther OJ.** 1975. Adequacy of main uterine vein and ovarian artery in local venoarterial pathway for uterine-induced luteolysis in ewes. *Am J Vet Res*, 36:957-963.
- Mapletoft RJ, Lapin DR, Ginther OJ.** 1976c. Ovarian artery as final component of local luteotropic pathway between a gravid uterine horn and ovary in ewes. *Biol Reprod*, 15:414-421.
- Martal J, Lacroix MC, Loudes C, Saunier M, Wintenberger-Torres S.** 1979. Trophoblastin, an antiluteolytic protein present in early pregnancy in sheep. *J Reprod Fertil*, 56:63-73.
- Mattos R, Staples CR, Artech A, Wiltbank MC, Diaz FJ, Jenkins TC, Thatcher WW.** 2004. The effects of feeding fish oil on uterine secretion of PGF(2 alpha), milk composition, and metabolic status of periparturient Holstein cows. *J Dairy Sci*, 87:921-932.
- McCracken JA.** 1971. Prostaglandin-F2-Alpha and corpus luteum regression. *Ann NY Acad Sci*, 180:456-472.
- McCracken JA, Custer EE, Lamsa JC.** 1999. Luteolysis: A neuroendocrine-mediated event. *Physiol Rev*, 79:263-323.
- McCracken JA, Custer EE, Schreiber DT, Tsang PCW, Keator CS, Arosh JA.** 2012. A new in vivo model

for luteolysis using systemic pulsatile infusions of PGF(2 alpha). *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 97:90-96.

**McCracken JA, Lee J, Banu SK, Rodriguez R, Nithy TK, Arosh JA.** 2010. The countercurrent transfer of PGF(2 alpha) from the uterus to the ovary at the time of luteolysis in ruminants is controlled by a prostaglandin transporter-mediated mechanism. *Soc Reprod Fertil*, 67:569-569.

**McCracken JA, Lee J, Yang B, Nithy TK, Banu SK, Bazer FW, Arosh JA.** 2011. Inhibition of the prostaglandin transporter protein suppresses luteolytic pulses of PGF2alpha from the ovine uterus. *Biol Reprod*, 85.

**McCracken JA., Samuelss B, Goding JR, Glew ME, Green K, Carlson JC, Baird DT.** 1972. Prostaglandin-F2-alpha identified as a luteolytic hormone in sheep. *Nature-New Biology*, 238:129-134.

**McCracken JA., Schramm W, Barcikowski B, Wilson Jr L.** 1981. The identification of prostaglandin F2 alpha as a uterine luteolytic hormone and the hormonal control of its synthesis. *Acta Vet Scand Suppl*, 77:71-88.

**Michael AE, Abayasekara DRE, Webley GE.** 1993. The luteotrophic actions of prostaglandins E2 and F2alpha on dispersed marmoset luteal cells are differentially mediated by cyclic AMP and protein kinase C. *J Endocrinol*, 138:291-298.

**Miyamoto A, Vonlutzow H, Schams D.** 1993. Acute actions of prostaglandin F-2alpha, prostaglandin E2, and prostaglandin I2 in microdialyzed bovine corpus luteum in vitro. *Biol Reprod*, 49:423-430.

**Moor RM.** 1968. Effect of embryo on corpus luteum function. *J Anim Sci(Suppl1)*, 27:97-118.

**Moor RM, Rowson LE.** 1966. The corpus luteum of the sheep: functional relationship between the embryo and the corpus luteum. I, 34:233-239.

**Moor RM, Rowson LEA, Hay MF, Caldwell BV.** 1969. The corpus luteum of the sheep: effect of the conceptus on luteal function at several stages during pregnancy. *J Endocrinol*, 43:301-307.

**Northey DL, French LR.** 1980. Effect of embryo removal and intrauterine infusion of embryonic homogenates on the lifespan of the bovine Corpus Luteum. *J Anim Sci*, 50:298-302.

**Oliveira JF, Henkes LE, Ashley RL, Purcell SH, Smirnova NP, Veeramachaneni DNR, Anthony RV, Hansen TR.** 2008. Expression of interferon (IFN)-stimulated genes in extrauterine tissues during early pregnancy in sheep is the consequence of endocrine IFN-tau release from the uterine vein. *Endocrinology*, 149.

**Ottobre JS, Vincent DL, Silvia WJ, Inskeep EK.** 1984. Aspects of regulation of uterine secretion of prostaglandins during the estrous cycle and early pregnancy. *Anim Reprod Sci*, 7:75-100.

**Panarace M, Garnil C, Marfil M, Jauregui G, Lagioia J, Luther E, Medina M.** 2006. Transrectal Doppler sonography for evaluation of uterine blood flow throughout pregnancy in 13 cows. *Theriogenology*, 66:2113-2119.

**Peters MW, Pursley JR.** 2003. Timing of final GnRH of the Ovsynch protocol affects ovulatory follicle size, subsequent luteal function, and fertility in dairy cows. *Theriogenology*, 60:1197-1204.

**Pharriss BB, Wyngarde LJ.** 1969. Effect of prostaglandin F2alpha on progesterone content of ovaries of pseudopregnant rats. *Proc Soc Exp Biol Med*, 130:92-94.

**Poore KR, Young IR, Canny BJ, Thorburn GD.** 1998. Studies on the role of ACTH in the regulation of adrenal responsiveness and the timing of parturition in the ovine fetus. *J Endocrinol*, 158:161-171.

**Rantala MH, Katila T, Taponen J.** 2009. Effect of time interval between prostaglandin F2[alpha] and GnRH treatments on occurrence of short estrous cycles in cyclic dairy heifers and cows. *Theriogenology*, 71:930-938.

**Rasmussen FE, Wiltbank MC, Christensen J.O, Grummer RR.** 1996. Effects of fenprostalene and estradiol-17 beta benzoate on parturition and retained placenta in dairy cows and heifers. *J Dairy Sci*, 79:227-234.

**Roberts RM.** 1996. Interferon-tau and pregnancy. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 16:271-273.

**Robinson RS, Hammond AJ, Wathes DC, Hunter MG, Mann GE.** 2008. Corpus luteum-endometrium-embryo interactions in the dairy cow: Underlying mechanisms and clinical relevance. *Reprod Domest Anim*, 43:104-112.

**Robinson RS, Mann GE, Lamming GE, Wathes DC.** 2001. Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. *Reproduction*, 122:965-979.

**Rowson LE, Moor RM.** 1967. The influence of embryonic tissue homogenate infused into the uterus, on the life-span of the corpus luteum in the sheep. *J Reprod Fertil*, 13:511-516.

**Royal MD, Darwash AO, Flint APE, Webb R, Woolliams JA, Lamming GE.** 2000. Declining fertility in dairy cattle: changes in traditional and endocrine parameters of fertility. *Anim Sci*, 70:487-501.

**Sa OG, Thatcher WW, Vasconcelos JLM.** 2009. Effect of progesterone and/or estradiol treatments prior to induction of ovulation on subsequent luteal lifespan in anestrous Nelore cows. *Anim Reprod Sci*, 112:95-106.

**Salfen BE, Cresswell JR, Xu ZZ, Bao B, Garverick HA.** 1996. Effects of presence of a dominant follicle and estradiol on length of luteal phases in estrous cycles with two or three waves of follicular development. *Biol Reprod*, 54:235-235.

**Salfen BE, Keisler DH, Smith MF, Zollers WG, Keiborzloos KR, Garverick HA.** 1995. Effect of intrauterine infusion of recombinant alpha(I)1 on luteal-phase duration and oxytocin-induced release of 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin f2-alpha in postpartum beef-cows. *Anim Reprod Sci*, 40:193-201.

**Sartori R, Haughian JM, Shaver RD, Rosa GJM, 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.

**Savio JD, Boland MP, Roche JF.** 1990. Development of dominant follicles and length of ovarian cycles in postpartum dairy cows. *J Reprod Fertil*, 88:581-591.

**Schallenberger E, Schams D, Meyer HHD.** 1989. Sequences of pituitary, ovarian and uterine hormone

secretion during the first 5 weeks of pregnancy in dairy cattle. *J Reprod Fertil* (Suppl), 37:277-286.

**Schramm W, Bovaird L, Glew ME, Schramm G & Mccracken JA.** 1983. Corpus-luteum regression induced by ultralow pulses of prostaglandin-F2-alpha. *Prostaglandins* 26, 347-364.

**Schuster VL.** 1998. Molecular mechanisms of prostaglandin transport. *Annu Rev Physiol*, 60:221-242.

**Schuster VL.** 2002. Prostaglandin transport. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 68-69:633-647.

**Shirasuna K, Matsumoto H, Kobayashi E, Nitta A, Haneda S, Matsui M, Kawashima C, Kida K, Shimizu T, Miyamoto A.** 2012. Upregulation of interferon-stimulated genes and interleukin-10 in peripheral blood immune cells during early pregnancy in dairy cows. *J Reprod Dev*, 58.

**Silvia WJ, Fitz TA, Mayan MH, Niswender GD.** 1984a. Cellular and molecular mechanisms involved in luteolysis and maternal recognition of pregnancy in the ewe. *Anim Reprod Sci*, 7:57-74.

**Silvia WJ, Niswender GD.** 1984. Maintenance of the corpus luteum of early pregnancy in the ewe. 3. Differences between pregnant and nonpregnant ewes in luteal responsiveness to prostaglandin F2-alpha. *J Anim Sci*, 59:746-753.

**Silvia WJ, Niswender GD.** 1986. Maintenance of the corpus luteum of early pregnancy in the ewe. 4. Changes in luteal sensitivity to prostaglandin F2-alpha throughout early pregnancy. *J Anim Sci*, 63:1201-1207.

**Silvia WJ, Ottobre JS, Inskeep EK.** 1984b. Concentrations of prostaglandin E2, prostaglandin F2-alpha, and 6-keto prostaglandin F1-alpha in the utero-ovarian venous plasma of nonpregnant and early pregnant ewes. *Biol Reprod*, 30:936-944.

**Simmer HH.** 1971. The first experiments to demonstrate an endocrine function of the corpus luteum. On the occasion of the 100th birthday of Ludwig Fraenkel (1870-1951). *Sudhoffs Archiv*, 55:392-417.

**Smith GD, Sawyer HR, Mirando MA, Griswold MD, Sadhu A, Reeves JJ.** 1996. Steady-state luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid levels and endothelial cell composition in bovine normal- and short-lived corpora lutea. *Biol Reprod*, 55:902-909.

**Smith MF, McIntush EW, Smith GW.** 1994. Mechanisms associated with corpus luteum development. *J Anim Sci*, 72:1857-1872.

**Southee JA, Hunter MG, Law AS, Haresign W.** 1988. Effect of hysterectomy on the short life-cycle corpus luteum produced after GnRH-induced ovulation in the anestrous ewe *J Reprod Fertil*, 84:149-155.

**Spencer TE, Bazer FW.** 1995. Temporal and spatial alterations in uterine estrogen receptor and progesterone receptor gene expression during the estrous cycle and early pregnancy in the ewe. *Biol Reprod*, 53:1527-1543.

**Spencer TE, Becker WC, George P, Mirando MA, Ogle TF, Bazer FW.** 1995. Ovine interferon-tau inhibits estrogen-receptor up-regulation and estrogen-induced luteolysis in cyclic ewes. *Endocrinology*, 136:4932-4944.

**Spencer TE, Hansen TR.** 2015. Implantation and establishment of pregnancy in ruminants. *Adv Anat Embryol Cel*, 216:105-135.

**Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW, Burghardt RC.** 2007a. Fetal-maternal interactions during the establishment of pregnancy in ruminants. *Soc Reprod Fertil* (Suppl), 64:379-396.

**Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW, Burghardt RC, Palmarini M.** 2007b. Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: Roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. *Reprod Fertil Dev*, 19:65-78.

**Staples CR, Thatcher WW, Clark JH.** 1990. Relationship between ovarian activity and energy status during the early postpartum period of high producing dairy cows. *J Dairy Sci*, 73:938-947.

**Stevenson JS, Britt JH.** 1979. Relationships among luteinizing hormone, estradiol, progesterone, glucocorticoids, milk yield, body weight and postpartum ovarian activity in Holstein cows. *J Anim Sci*, 48:570-577.

**Stojkovic M, Wolf E, Buttner M, Berg U, Charpigny G, Schmitt A, Brem G.** 1995. Secretion of biologically-active interferon-tau by in-vitro-derived bovine trophoblastic tissue. *Biol Reprod*, 53:1500-1507.

**Sugimoto Y, Segi E, Tsuboi K, Ichikawa A, Narumiya S.** 1998. Female reproduction in mice lacking the prostaglandin F receptor - Roles of prostaglandin and oxytocin receptors in parturition. *Vasopressin and Oxytocin*, 449:317-321.

**Sugimoto Y, Yamasaki A, Segi E, Tsuboi K, Aze Y, Nishimura T, Oida H, Yoshida N, Tanaka T, Katsuyama M, Hasumoto K, Murata T, Hirata M, Ushikubi F, Negishi M, Ichikawa A, Narumiya S.** 1997. Failure of parturition in mice lacking the prostaglandin F receptor. *Science*, 277:681-683.

**Thatcher WW, Bartol FF, Knickerbocker JJ, Curl JS, Wolfenson D, Bazer FW, Roberts RM.** 1984. Maternal recognition of pregnancy in cattle. *J Dairy Sci*, 67:2797-2811.

**Tsai SJ, Wiltbank MC.** 1996. Prostaglandin F-2 alpha upregulates expression of mRNA for prostaglandin G/H synthase-2 in ovine large luteal cells. *Biol Reprod*, 54:179-179.

**Tsai SJ, Wiltbank MC.** 1997. Prostaglandin F-2 alpha induces expression of prostaglandin G/H synthase-2 in the ovine corpus luteum: A potential positive feedback loop during luteolysis. *Biol Reprod*, 57:1016-1022.

**Tsuboi K, Iwane A, Nakazawa S, Sugimoto Y, Ichikawa A.** 2003. Role of prostaglandin H-2 synthase 2 in murine parturition: Study on ovariectomy-induced parturition in prostaglandin F receptor-deficient mice. *Biol Reprod*, 69:195-201.

**Vasconcelos JLM, Sartori R, Oliveira HN, Guenther JG, Wiltbank MC.** 2001. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology*, 56:307-314.

**Vincent DL, Inskeep EK.** 1986. Role of progesterone in regulating uteroovarian venous concentrations of PGF2 alpha and PGE2 during the estrous

cycle and early pregnancy in ewes. *Prostaglandins*, 31:715-733.

**Wathes DC, Smith HF, Leung ST, Stevenson KR, Meier S, Jenkin G.** 1996. Oxytocin receptor development in ovine uterus and cervix throughout pregnancy and at parturition as determined by in situ hybridization analysis. *J Reprod Fertil*, 106:23-31.

**Weems YS, Arreguin-Arevalo JA, Nett TM, Vann RC, Ford SP, Bridges PJ, Welsh TH, Jr, Lewis AW, Neuendorff DA, Randel RD, Weems CW.** 2011. In vivo intra-luteal implants of prostaglandin (PG) E-1 or E-2 (PGE(1), PGE(2)) prevent luteolysis in cows. I. Luteal weight, circulating progesterone, mRNA for luteal luteinizing hormone (LH) receptor, and occupied and unoccupied luteal receptors for LH. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 95:35-44.

**Weems YS, Bridges PJ, Jeoung M, Arreguin-Arevalo JA., Nett TM, Vann RC, Ford SP., Lewis AW, Neuendorff DA, Welsh TH, Jr, Randel RD, Weems CW.** 2012. In vivo intra-luteal implants of prostaglandin (PG) E-1 or E-2 (PGE(1), PGE(2)) prevent luteolysis in cows. II: mRNA for PGF(2 alpha), EP1, EP2, EP3 (A-D), EP3A, EP3B, EP3C, EP3D, and EP4 prostanoid receptors in luteal tissue. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 97:60-65.

**White LM, Keisler DH, Dailey RA, Inskeep EK.** 1987. Characterization of ovine follicles destined to form subfunctional corpora-lutea. *J Anim Sci*, 65:1595-1601.

**Whittle WL, Holloway AC, Lye SJ, Gibb W, Challis JRG.** 2000. Prostaglandin production at the onset of ovine parturition is regulated by both estrogen-independent and estrogen-dependent pathways. *Endocrinology*, 141:3783-3791.

**Wilson L, Inskeep EK, Butcher RL, CenedellRJ.** 1972. Levels of prostaglandins in uterine endometrium during ovine estrous-cycle. *J Anim Sci*, 34:93-&.

**Wiltbank JN, Casida LE.** 1956. Alteration of ovarian activity by hysterectomy. *J Anim Sci*, 15:134-140.

**Wiltbank MC.** 1994. Cell types and hormonal mechanisms associated with mid-cycle corpus luteum function. *J Anim Sci*, 72:1873-1883.

**Wiltbank MC, Baez GM, Garcia-Guerra A, Toledo MZ, Monteiro PL, Melo LF, Ochoa JC, Santos JE, Sartori R.** 2016. Pivotal periods for pregnancy loss during the first trimester of gestation in lactating dairy cows. *Theriogenology*, 86:239-253.

**Wiltbank MC, Gallagher KP, Dysko RC, Keyes PL.** 1989. Regulation of blood flow to the rabbit corpus luteum - Effects of estradiol and human chorionic gonadotropin. *Endocrinology*, 124:605-611.

**Wiltbank MC, Ottobre JS.** 2003. Regulation of intraluteal production of prostaglandins. *Reprod Biol Endocrinol*, 1:91.

**Wiltbank MC, Salih SM, Atli MO, Luo W, Bormann CL, Ottobre JS, Vezina CM, Mehta V, Diaz FJ, Tsai SJ, Sartori R.** 2012. Comparison of endocrine and cellular mechanisms regulating the corpus luteum of primates and ruminants. *Anim Reprod*, 9:242-259.

**Wu WX, Ma XH, Coksaygan T, Chakrabarty K, Collins V, Rose J, Nathanielsz PW.** 2004. Prostaglandin mediates premature delivery in pregnant sheep induced by

estradiol at 121 days of gestational age. *Endocrinology*, 145:1444-1452.

**Zalman Y, Klipper E, Farberov S, Mondal M, Wee G, Folger JK, Smith GW, Meidan R.** 2012. Regulation of angiogenesis-related prostaglandin f2alpha-induced genes in the bovine corpus luteum. *Biol Reprod*, 86:1-10.

**Zollers WG, Garverick HA, Youngquist RS, Ottobre JS, Silcox RW, Copelin JP, Smith MF.** 1991. Invitro secretion of prostaglandins from endometrium of postpartum beef-cows expected to have short or normal luteal phases. *Biol Reprod*, 44:522-526.



## Dinâmica de metilação do DNA durante o desenvolvimento do oócito e do embrião e sua associação com alterações induzidas pelo ambiente

T. Fair\*

School of Agriculture and Food Sciences, University College Dublin, Dublin 4, Irlanda

Título curto: Programação epigenética do desenvolvimento do oócito e do embrião

\*Autor para correspondência: [trudee.fair@ucd.ie](mailto:trudee.fair@ucd.ie); School of Agriculture and Food Sciences, University College Dublin, Room 239, Agricultural Sciences Building, Belfield, Dublin 4, Irlanda

### Resumo

Mecanismos epigenéticos são fundamentais para um desenvolvimento e gametogênese de sucesso. O ovo fertilizado passa por uma demetilação global do DNA para facilitar o remodelamento dos gametas em dois estágios diferenciados para um estágio embrionário pluripotente. A manutenção de níveis apropriados de metilação do DNA durante o desenvolvimento da pre-implantação é essencial à viabilidade do embrião. Avanços recentes na pesquisa epigenética enfatizaram a susceptibilidade da programação epigenética fetal à saúde materna e status nutricional, particularmente no momento da concepção. Existem muitas evidências de que o estresse materno impacta a função ovariana, levando a oócitos comprometidos apresentados para fertilização num ambiente sub-ótimo. Similarmente, a fertilidade decrescente se tornou um problema em países ocidentais, onde é associada primariamente com idade média avançada durante a gestação. Então o uso de tecnologias de reprodução assistida (TRA) para vencer a baixa fertilidade está aumentando ao redor do mundo. Adicionalmente, o uso de cultura in vitro prolongada após a remoção e estocagem de oócitos e/ou tecido ovariano antes de tratamento de câncer, ou para prevenir envelhecimento ovariano, está crescendo rapidamente. TRA estão associadas ao comprometimento dos eventos pré e pós-natais, incluindo nascimento prematuro, baixo peso ao nascimento, anormalidades congênitas e elevado risco de distúrbios epigenéticos. Existem evidências extensivas a partir de estudos em bovinos que os embriões produzidos por TRA convencionais estão susceptíveis a erros de reprogramação epigenética. A presente revisão discute o impacto do status fisiológico intrínseco e ambiente externo sobre a metilação do DNA de oócitos e embriões a partir de dados obtidos em modelos murinos, humanos e bovinos.

### Introdução

O imprinting genômico é um processo epigenético, que permite a expressão de uma cohort de genes mamíferos de origem parental (Fowden et al., 2006). A correta dosagem da expressão de genes imprintados é crítica para o crescimento e desenvolvimento embrionário, função placentária assim como comportamento e metabolismo pós-natal (Davies et al., 2005; Reik and Walter, 2001; Smith et al., 2006). Expressão de genes imprintados de origem parental é facilitada por marcadores epigenéticos assimétricos no alelo materno ou

paterno. Geralmente, genes imprintados são agrupados em clusters contendo domínios ricos em CpG marcados diferencialmente, conhecidas como as regiões diferencialmente metiladas (DMRs); e a mais estudada destas marcações é a metilação do DNA (Lucifero et al., 2004). Os padrões de metilação do DNA de mamíferos requeridos para o imprinting genômico estão sujeitos a períodos dinâmicos de reprogramação durante o desenvolvimento e são estabelecidos em diferentes estágios do desenvolvimento, dependendo se sua transmissão ocorre pela via paterna ou materna. DMRs paternas adquirem suas marcas de metilação anteriormente ao nascimento na pré-espermatogônia (Davis et al., 2000; Li et al., 2004); enquanto as marcas de metilação do DNA do lado materno são estabelecidas no momento pós-natal no crescimento do oócito (Hiura et al., 2006). Reprogramação epigenética envolve apagar a metilação do DNA e re-estabelecer em dois pontos do ciclo de vida, primeiramente após a fertilização no zigoto e depois nas células tronco primordiais (PGCs), que são progenitoras diretas do espermatozoide ou oócito. Seguindo a fertilização, a demetilação global do DNA ocorre no zigoto para facilitar o remodelamento de dois estados de gameta específicos para o estado embrionário pluripotente (Hales et al., 2011; Torres-Padilla e Ciosk, 2013). A assinatura epigenética herdada dos gametas (exceto os imprints parentais) é apagada e a totipotência do desenvolvimento é restaurada. Nas PGCs, os imprints parentais são apagados e estabelecidos de novo em novo ambiente de metilação que é diferente entre células germinativas de machos e fêmeas para restaurar o potencial de desenvolvimento de células germinativas (Seisenberger et al., 2013). Existem evidências em bovinos, humanos e espécies de laboratório que o status fisiológico intrínseco e o ambiente externo, como as tecnologias de reprodução assistida (TRA), podem alterar dramaticamente o ambiente epigenético do gameta, de tecidos embrionários, fetais e adultos, levando à função distorcida ou saúde adversa na idade madura. Os mecanismos e implicações em relação aos dados disponíveis de modelos murinos, humanos e bovinos são revisados.

### Dinâmica de metilação de DNA durante a reprogramação epigenética de células germinativas e embriões pré-implantação

#### Deleção da metilação do DNA:

Estudos recentes começaram a elucidar como a demetilação global do zigoto e PGCs é orquestrada. Parece



que a demetilação ativa ocorre no genoma paterno de embriões de uma célula (Maher e Reik, 2000; Oswald et al., 2000) e demetilação passiva ocorre no genoma materno do embrião de duas células até o estágio de blastocisto (Reik et al., 2001). Parece que a maior onda de demetilação do genoma acontece entre a fertilização e o estágio de duas células em humanos com modificações sutis da metilação do DNA ocorrendo depois (Guo et al., 2014). Em camundongos, o período de demetilação ocorre no estágio de zigoto, seguido por demetilação gradual até o estágio de blastocisto (Smith et al., 2012). Em ambos, humanos e camundongos, a demetilação do genoma paterno ocorre muito mais rapidamente do que do materno (Guo et al., 2014; Smith et al., 2014). Muitos modelos para demetilação ativa do DNA foram propostos (Morgan et al., 2005; Wu and Zhang, 2010): demetilação ativa mediada pela translocação dez-onze (TET) do membro da família, Tet3, parece ser importante para ambos (Guo et al., 2014; Smith et al., 2014), enquanto o caminho para reparação por excisão de (BER) também deve ser importante (Xu e Walsh, 2014). A manutenção de níveis apropriados de metilação do DNA durante o desenvolvimento do embrião na pré-implantação é essencial para a viabilidade do embrião (Barton et al., 2001). Assim como o alelo marcado sendo resistente à demetilação, igualmente importante parece ser a habilidade do alelo não marcado de resistir à metilação de novo após a implantação (Proudhon et al., 2012; Rutledge et al., 2014).

PGCs derivam do epiblasto do embrião em desenvolvimento (Ginsburg et al., 1990), onde herdamos os traços epigenéticos presentes nas células do epiblasto nesta fase, incluindo níveis significativos de metilação global de DNA (Ohinata et al., 2009; Seki et al., 2005). Entretanto, PGCs necessitam de reprogramação de um perfil de célula somática naquele de células germinativas que originarão gametas, com a capacidade de formar um zigoto totipotente na próxima geração. A metilação de DNA é deletada globalmente durante a migração das PGCs em direção à crista genital. A reprogramação epigenética das PGCs requer remodelamento da estrutura de cromatina, mudanças globais nas paisagens transcricionais e o reajuste das marcas do imprint da metilação de DNA. É essencial para o desenvolvimento da próxima geração que os imprints parentais sejam deletados em PGCs e que o novo imprint estabelecido reflita o sexo do embrião. Estes imprints são então mantidos nos gametas derivados de PGCs e contribuirão para o epigenoma do futuro zigoto (Seisenberger et al., 2013).

Os mecanismos envolvidos na demetilação de PGC foram difíceis de elucidar, devido à natureza inacessível das PGCs. Até recentemente, estudos em camundongos focaram no período entre dia E11,5 e E13,5 (Hajkova et al., 2002; Reik et al., 2001). A curta duração deste período, especificamente o baixo número de ciclos celulares, levou ao consenso que a demetilação do DNA nas PGCs era um processo ativo. A ativação proteica induzida por deaminase The protein activation-induced deaminase (*Aid*), foi conclusivamente relacionada à demetilação global de DNA nas PGCs, enquanto as proteínas TDG, BER e TET estão relacionadas porém sem provas definitivas (Seisenberger et al., 2013). Existe alguma evidência para embasar a

possibilidade de que a deleção da metilação do DNA comece mais cedo, no momento da regulação negativa da maquinaria dos transcritos da metilação de DNA (Guibert et al., 2012; Kurimoto et al., 2008; Seki et al., 2005). Se o período de deleção global for estendido para este estágio, então a demetilação passiva também se torna uma possibilidade.

**Reprogramação da metilação do DNA:** Durante a espermatogênese e oogênese, são estabelecidas as modificações epigenéticas requeridas para a progressão embrionária normal (Bourc'his et al., 2001; O'Doherty et al., 2012; Rideout et al., 2001). Reprogramando o genoma materno, por meio da metilação adequada de regiões do DNA diferencialmente metiladas (DMRs), é central na regulação do imprint genômico (Li et al., 1993), um processo no qual um pequeno coorte de genes é expresso exclusivamente de um único alelo, de acordo com a origem parental (Preece e Moore 2000). DMRs de genes imprintados são estabelecidas ativamente durante a gametogênese de mamíferos (Reik et al., 2001), a vasta maioria dos quais adquire metilação do DNA das células germinativas maternas durante a fase de crescimento do oócito (Hiura et al., 2006; Lucifero et al., 2004; Lucifero et al., 2002; Ueda et al., 1992). Durante a oogênese pós-natal em camundongos, o estabelecimento do imprinting acontece assincronicamente em diferentes genes imprintados durante a transição dos estágios de folículo primordial e antral (Hiura et al., 2006a; Lucifero et al., 2004). As DMRs testadas em oócitos humanos e bovinos mostraram o esperado padrão de metilação (El Hajj et al., 2011; Geuns et al., 2003; Geuns et al., 2007; Heinzmann et al., 2011; O'Doherty et al., 2012; Urrego et al., 2014). Entretanto, parece haver diferenças nos mecanismos e timings do imprint entre mamíferos (veja revisão (Hanna e Kelsey, 2014)). Por exemplo, a fase de crescimento do oócito em humanos e bovinos é bem protraída durando meses (Fair, 2003; Fair et al., 1997). Aquisição do imprint materno começa no final da fase de crescimento do oócito e os imprints individuais parecem ser estabelecidos de uma maneira tamanho-específica (Arima e Wake, 2006; Geuns et al., 2003; Geuns et al., 2007; O'Doherty et al., 2012b; Sato et al., 2007). Em bovinos, por exemplo, a aquisição dos imprints maternos começa quando os oócitos atingem um diâmetro de aquisição 110 a 120 µm; SNRPN e MEST estão completamente metilados com 120 µm, enquanto IGF2R, PEG10 e PLAGL estão apenas parcialmente metilados com este tamanho (O'Doherty et al., 2012). Estudos recentes estabeleceram que a transcrição gênica determina o ambiente de metilação do DNA característico no oócito maduro murino. De fato, foi determinado que os eventos de transcrição poderiam contribuir em 85–90 % da metilação do DNA estabelecida no oócito, incluindo-se as ilhas CpG (CGIs) metiladas e as DMRs imprintados (Veselovska et al., 2015). Entretanto um pequeno número de genes expressos escapa da metilação do DNA, assim como um pequeno número de CGIs dentro das unidades transcricionais ativas. De fato, isto sugere que perturbações da expressão gênica durante o crescimento folicular do oócito deveria resultar em alterações da metilação do DNA em gametas maduros, incluindo CGIs. Desde que uma fração do metiloma do DNA do oócito seja

mantida em algum grau em embriões pré-implantação até o início da metilação de novo no embrião, mudanças da expressão gênica induzidas pelo ambiente nas células germinativas das fêmeas podem levar alterações do epigenoma na próxima geração com possíveis efeitos transgeracionais (Borgel et al., 2010; Smallwood et al., 2011). Então, fatores fisiológicos ou externos que desequilibrem o ambiente de transcrição durante o crescimento folicular do oócito poderiam resultar em alterações da metilação do DNA em gametas maduros.

Estudos abrangentes do genoma de gametas e embriões humanos revelaram muitos mecanismos similares da reprogramação da metilação do DNA entre humanos e camundongos (Guo et al., 2014; Smith et al., 2014). Marcas de imprinting devem ser mantidas durante a passagem sensível de oócito para embrião. Como este estágio de desenvolvimento está sob controle materno, o papel do efeito dos genes maternos na regulação do imprint genômico é de interesse. Muitos efeitos de proteínas-chave que protegem os sítios de metilação durante a pré-implantação foram identificados e incluem: PGC7 (também conhecido como STELLA ou DPPA3); em camundongo, PGC7 foi demonstrado como mantenedor de um subconjunto de locos imprintados, inclusive os domínios Peg1, Peg3, e Peg10 e os domínios imprintados paternalmente H19-Igf2 (H19DMR) e Rasgrf1 (Nakamura et al., 2007); proteína zinc finger 57 (ZFP57), que é necessária para a metilação do domínio Snrpn em oócitos de camundongos e pela manutenção da metilação após a fertilização em domínios Dlk1, Peg1, Peg3 e Nnat (Li et al., 2008); proteína 28 contendo o motivo tripartite (TRIM28; também conhecido como KAP1/TIF1b), TRIM28 pode regular a estabilidade epigenética em oócitos e embriões de camundongos protegendo contra a demetilação passiva (Messerschmidt et al., 2012) e finalmente, DNMT1 (Hirasawa et al., 2008). Duas isoformas DNMT1 estão presentes em oócitos maduros e embriões pré-implantação: isoforma oócito-específica (DNMT1o) e somática (DNMT1s). DNMT1o se acumula durante o crescimento do oócito (Bao et al., 2000), e representa a forma abundante presente em oócitos e embriões na fase de pré-implantação (Mertineit et al., 1998). Existem 5 membros conhecidos da família Dnmts (Dnmt1, Dnmt2, Dnmt3a, Dnmt3b e Dnmt3L), e acredita-se que sejam responsáveis por estabelecer e manter os padrões de metilação (Ooi et al., 2009). Estudos focados em genes murinos demonstraram que as metiltransferases Dnmt3a, Dnmt3b e Dnmt1 são indispensáveis para a sobrevivência embrionária (Li et al., 1992; Okano et al., 1999). Estes achados também são passíveis de aplicação em bovinos, como demonstramos na presença de DNMT3A, DNMT3B e DNMT3L em oócitos bovinos durante o período crítico de aquisição do imprint de metilação do DNA (O'Doherty et al., 2012). Apesar de não abordado aqui, deve ser reconhecido que modificações epigenéticas adicionais são estabelecidas nos oócitos, como modificações pós-transcricionais de histone, que sinalizada cromatina ativa e silenciada assim como elementos regulatórios, também impactam as decisões do embrião precoce e qualquer alteração ou falha poderia levar à pior qualidade epigenética do oócito, que por sua vez pode impactar o desenvolvimento embrionário e a saúde a longo

prazo.

### **Efeito epigenético do status fisiológico materno sobre a programação do embrião, oócito fetal e saúde da prole quando adulta**

A natureza protrática do crescimento do oócito bovino e humano poderia resultar em exposição repetida a desafios do ambiente, resultando em uma acumulação de insultos durante a vida da fêmea. Por exemplo, é mais provável que a maioria das fêmeas experiencie durante sua vida alterações em sua dieta e status nutricional, desenvolvimento de doenças metabólicas e/ou infecciosas, exposição a toxinas do ambiente e estresse e em alguns casos, a administração de terapias de reprodução assistida. Uma vez que uma fração importante do metiloma do DNA do oócito é mantida durante a embriogênese pré-implantação, mudanças na expressão gênica no oócito induzidas pelo ambiente poderiam levar a alterações do epigenoma na futura geração.

Existe evidência substancial que o ambiente materno pré-concepção e durante o desenvolvimento embrionário e fetal, incluindo-se nutrição inadequada ou super-nutrição, influencia o desenvolvimento e a futura saúde do indivíduo (Barker et al., 1989). A condição, status de saúde e idade da doadora de oócito (mãe) pode afetar a qualidade do oócito e a saúde da prole (Ashworth et al., 2009). Isto é especialmente relevante para a fertilidade de mulheres européias, para as quais a idade para o primeiro filho aumentou para quase 30 anos (<http://www.unpopulation.org>; (2014) United Nations Population Division Department of Economic and Social Affairs). O mecanismo por trás destes efeitos é desconhecido, mas a lateração da expressão gênica no oócito e células foliculares circundantes é provavelmente instrumental. Estudos em camundongos (Dahlhoff et al., 2014) e bovinos (O'Doherty et al., 2014), mostraram que a metilação do DNA nos oócitos é modificada pela dieta ou fisiologia materna. Vacas de leite lactantes no período pós-parto são frequentemente desafiadas tanto patogenicamente quanto metabolicamente devido ao desvio preferencial da energia para a produção de leite, levando a uma baixa performance reprodutiva dentro da janela crítica para nova gestação. O ambiente metabólico adverso induzido pela lactação altera os perfis metabólicos, esteroidogênicos e transcriptômico dos folículos ovarianos durante seu desenvolvimento nas vacas lactantes pós-parto comparadas a novilhas não-lactantes (Bender et al., 2010; Walsh et al., 2012a; Walsh et al., 2012b). As diferenças metabólicas incluem altas concentrações de ácidos graxos saturados e baixa de insaturados e perfil alterado de amino-ácidos em fluido folicular de vacas lactantes comparadas as novilhas secas (Bender et al., 2010). A esteroidogênese também está comprometida; a síntese de estradiol e progesterona no folículo dominante é reduzida durante a diferenciação e luteinização, respectivamente (Walsh et al., 2012b). No nível do transcriptoma, o perfil de expressão de transcritos associados à biossíntese de esteróides (Walsh et al., 2012b), função imune celular e quimiotaxia (Walsh et al., 2012b) também são diferentes. Nós analisamos o status de metilação de várias candidatas DMRs imprintadas em oócitos

maduros de vacas no pós-parto. Os dados resultantes revelaram hipometilação de DMRs e um número de genes maternos imprintados metilados (*PEG3*, *PLAGL1* e *SNRPN*), em oócitos recuperados de vacas pós-parto durante o período de balanço energético negativo mais agudo (NEB) e um grande estresse metabólico. A contribuição de um perfil inadequado de ácidos graxos no fluido folicular para o estatus aberrante de metilação foi investigado in vitro. Os achados confirmaram a sensibilidade do *PLAG1* para o ambiente folicular (O'Doherty et al., 2014). A situação comparativa mais famosa em humanos é o cohort da fome de inverno holandês; especificamente, indivíduos concebidos durante a fome apresentaram hipometilação de *IGF2*-DMR comparados aos seus pares não expostos quase seis anos após a exposição (Heijmans et al., 2008). Ademais, a análise global das DMRs no cohort detectou regiões de CpG diferencialmente metiladas, normalmente regiões regulatórias (Oger et al., 2014; Ravelli et al., 1998). Ainda, achados de um estudo adicional indicaram que as modificações de metilação nutrição-dependentes estavam restritas a genes ou tecidos (Veenendaal et al., 2012). Enquanto o NEB é uma questão importante para vacas leiteiras pós-parto de alta produção, a maioria das sociedades ocidentais não espera passar por um cenário como a fome de inverno holandesa; obesidade e dietas altamente glicêmicas são as questões mais significativas a serem superadas pelas mulheres ocidentais. A obesidade induz múltiplas modificações nos ovários, como resistência à leptina, lipotoxicidade e inflamação local, todas com possível impacto em processos que envolvem o estabelecimento do programa epigenético normal do oócito. Existe muita preocupação de que a obesidade materna e complicações associadas deixem um imprint nutricional na vida embrionária inicial com efeitos a longo prazo na promoção da obesidade e condições associadas na vida adulta (Ravelli et al., 1998). Dados de modelos animais nutridos com dietas hiperlipídicas embasam claramente a validade destas preocupações. O consumo de uma dieta hiperlipídica (HL) durante a gestação (35–60% das calorias provenientes de gordura) está associado à obesidade da prole, hipertensão, metabolismo anormal do colesterol e doença cardiovascular, para revisão veja Seki et al., (Seki et al., 2012). Vários modelos de roedores foram empregados para investigar as mudanças epigenéticas induzidas por uma dieta maternal HL. Resultados de alguns modelos selecionados demonstraram que a dieta HL durante a gestação pode induzir modificações epigenéticas, incluindo alterações na expressão de DNMT (Zhou e Pan, 2011) e (Liu et al., 2011), metilação alterada do DNA dos genes envolvidos com a obesidade, e homeostase energética (Mertineit et al. 1998), hipometilação do gene *Mc4r*, que desempenha papel na regulação do peso corporal em camundongos (L et al., 2010); e estatus alterado da transcrição e metilação do *IGF-2* no fígado fetal de ovelhas alimentadas com dieta HL (van Straten et al., 2010). Obviamente estudos em tecidos humanos são mais restritivos, entretanto, estudos recentes que empregaram análises epigenéticas globais também revelaram o potencial para a variação da metilação do DNA se espalhar para vários tecidos fetais expostos ao diabetes gestacional materno (Finer et al., 2015).

### **Fatores extra-ovarianos que afetam o desenvolvimento do oócito: o efeito da pesquisa em tecnologias de reprodução assistida**

Tecnologias de reprodução assistida (TRA) são responsáveis atualmente pelo nascimento de milhares de crianças anualmente e até 2% de todos os nascimentos em alguns países. Um número crescente de modelos animais e humanos a possível presença de consequências pós-natais relacionadas a TRA, infertilidade e algumas alterações epigenéticas em conceitos e placentas (Nelissen et al., 2014; Walter e Paulsen, 2003; Whitelaw et al., 2014). A hiperestimulação ovariana foi associada com alterações dos níveis de metilação global do DNA em embriões murinos de duas células e reduzido desenvolvimento pré-implantacional in vitro (Shi e Haaf, 2002). A maioria dos estudos em camundongos não relatou efeitos no estabelecimento do imprinting, apesar de vários relatos indicarem que a estimulação ovariana pode interferir com a capacidade de manutenção do imprinting durante o desenvolvimento pré-implantação, para revisão veja Anckaert e Fair (Anckaert e Fair, 2015). Na população humana existem relatos de aumento do risco para algumas alterações de imprinting após TRA (Huntriss e Picton, 2008). Estas envolvem as síndromes de Beckwith-Wiedemann, Silver-Russell e Angelman. Adicionalmente à localização dos defeitos epigenéticos localizados em genes específicos, alterações extras foram observadas em outros locos (Rossignol et al., 2006), sugerindo uma alteração epigenética mais global após TRA em humanos. Estas preocupações são reforçadas pelas detecções de alterações em ambos transcriptoma e epigenoma na prole fisiologicamente normal derivada de TRA (Batcheller et al., 2011).

Existe muito esforço para se expandir o leque de TRAs oferecidas aos pacientes que incluem criopreservação e subsequente transplante do cortex ovariano ou cultura in vitro para pacientes submetidos à quimioterapia tóxica para o ovário. Por um lado houve avanços (Laronda et al., 2014), mas atualmente não existem dados disponíveis para avaliar o impacto epigenético destes tratamentos sobre o oócito cultivado ou embrião resultante. Os achados de estudos em camundongos sugerem que sob as condições de cultivo in vitro o desenvolvimento do imprint no oócito acontece normalmente (Anckaert et al., 2009; Anckaert et al., 2013; Hiura et al., 2006; Lucifero et al., 2004; Lucifero et al., 2002; Trapphoff et al., 2010) e candidatos a imprint não foram perturbados em embriões de duas células obtidos após FIV de oócitos derivados do mesmo sistema de folículo in vitro (El Hajj et al., 2011), entretanto, cultivo in vitro do embrião resultante foi associado à perda do imprinting para muitos genes em tecidos fetais e placentário (Mann et al., 2004; Rivera et al., 2008). Isto pode indicar uma susceptibilidade diferente do oócito cultivado e maturado in vitro comparado ao embrião aos efeitos induzidos pela cultura. Ainda, deve-se tomar cuidado ao extrapolar dados de camundongos para embasar intervenções de TRA em humanos, como discutido acima, a natureza protrática do crescimento do oócito e a longa permanência do oócito no ovário humano, pode resultar em aumento de oportunidades ou sensibilidade à

programação epigenética aberrante.

Em bovinos, pesquisas em epigenética do desenvolvimento esteve focada primeiramente em embriões clonados, devido ao alto grau de perda gestacional subsequente à transferência de embriões derivados por transferência nuclear de células somáticas (SCNT) (Chavatte-Palmer et al., 2012). Entretanto, também existe evidência de que embriões produzidos por TRAs mais convencionais também são susceptíveis a programação epigenética errônea (Urrego et al., 2014), para revisão). O perfil de metilação global do embrião bovino revelou diferenças consideráveis com o padrão de metilação dos blastocistos em cultivo in vitro a depender do estágio de desenvolvimento alcançado. Ademais, padrões de metilação do DNA de ilhas CpG e elementos repetitivos também são afetados no blastocisto dependendo do estágio no qual o embrião foi submetido ao cultivo (Salilew-Wondim et al., 2015). Ainda, os dados de bovinos são embasados pelo grande número de trabalhos que descrevem diferenças morfológicas macroscópicas e ultraestruturais, fisiológicas, cromossômicas, transcricionais e de níveis de metabólitos de embriões cultivados in vitro comparados aos derivados in vivo (revisado em Anckaert e Fair, 2015; Lonergan e Fair 2008).

### Conclusion

A regulação do desenvolvimento do oócito e do embrião é um processo altamente orquestrado, multifacetado. A metilação do DNA é um mecanismo regulatório epigenético importante. As fases de crescimento e permanência prolongadas do oócito no ovário em grandes mamíferos significa que existem múltiplas oportunidades de acasos ambientais ocorrerem. Entretanto, é importante que sempre que possível, ambientes fisiológicos e externos ótimos sejam alcançados, por meio de manejo nutricional, cuidados com a saúde e intervenções de reprodução assistida ex vivo de caráter benigno.

### Referências

- Anckaert, E., Adriaenssens, T., Romero, S., Dremier, S., Smitz, J. 2009. Unaltered imprinting establishment of key imprinted genes in mouse oocytes after in vitro follicle culture under variable follicle-stimulating hormone exposure. *Int J Dev Biol* 53, 541-548.
- Anckaert, E., De Rycke, M., Smitz, J. 2013. Culture of oocytes and risk of imprinting defects. *Human Reprod Update* 19, 52-66.
- Anckaert, E., Fair, T. 2015. DNA methylation reprogramming during oogenesis and interference by reproductive technologies: Studies in mouse and bovine models. *Reprod Fertil and Devel* 27, 739-754.
- Arima, T., Wake, N. 2006. Establishment of the primary imprint of the HYMAI/PLAGL1 imprint control region during oogenesis. *Cytogenet Genome Res* 113, 247-252.
- Ashworth, C.J., Toma, L.M., Hunter, M.G. 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, 3351-3361.
- Bao, S., Obata, Y., Carroll, J., Domeki, I., Kono, T. 2000. Epigenetic Modifications Necessary for Normal Development Are Established During Oocyte Growth in Mice. *Biology of Reproduction* 62, 616-621.
- Barker, D.J.P., Osmond, C., Winter, P.D., Margetts, B., Simmonds, S.J. 1989. Originally published as Volume 2, Issue 8663: Weight In Infancy And Death From Ischaemic Heart Disease. *The Lancet* 334, 577-580.
- Barton, S.C., Arney, K.L., Shi, W., Niveleau, A., Fundele, R., Surani, M.A., Haaf, T. 2001. Genome-wide methylation patterns in normal and uniparental early mouse embryos. *Human Molecular Genetics* 10, 2983-2987.
- Batcheller, A., Cardozo, E., Maguire, M., DeCherney, A.H., Segars, J. 2011. Are there subtle, genome-wide epigenetic alterations in normal offspring conceived from Assisted Reproductive Technologies? *Fertility and Sterility* 96, 1306-1311.
- Bender, K., Walsh, S., Evans, A.C.O., Fair, T., Brennan, L. 2010. Metabolite concentrations in follicular fluid may explain differences in fertility between heifers and lactating cows. *Reproduction* 139, 1047-1055.
- Borgel, J., Guibert, S., Li, Y., Chiba, H., Schubeler, D., Sasaki, H., Forne, T., Weber, M. 2010. Targets and dynamics of promoter DNA methylation during early mouse development. *Nat Genet* 42, 1093-1100.
- Bourc'his, D., Xu, G.L., Lin, C.S., Bollman, B., Bestor, T.H. 2001. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science* 294, 2536-2539.
- Chavatte-Palmer, P., Camous, S., Jammes, H., Le Cleac'h, N., Guillomot, M., Lee, R.S. 2012. Review: Placental perturbations induce the developmental abnormalities often observed in bovine somatic cell nuclear transfer. *Placenta* 33 Suppl, S99-S104.
- Dahlhoff, M., Pfister, S., Blutke, A., Rozman, J., Klingenspor, M., Deutsch, M.J., Rathkolb, B., Fink, B., Gimpfl, M., Hrabě de Angelis, M., Roscher, A.A., Wolf, E., Ensenauer, R. 2014. Peri-conceptual obesogenic exposure induces sex-specific programming of disease susceptibilities in adult mouse offspring. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1842, 304-317.
- Davies, W., Isles, A., Smith, R., Karunadasa, D., Burrmann, D., Humby, T., Ojarikre, O., Biggin, C., Skuse, D., Burgoyne, P., Wilkinson, L. 2005. Xlr3b is a new imprinted candidate for X-linked parent-of-origin effects on cognitive function in mice. *Nat Genet* 37, 625-629.
- Davis, T.L., Yang, G.J., McCarrey, J.R., Bartolomei, M.S. 2000. The H19 methylation imprint is erased and re-established differentially on the parental alleles during male germ cell development. *Human Molecular Genetics* 9, 2885-2894.
- El Hajj, N., Trapphoff, T., Linke, M., May, A., Hansmann, T., Kuhtz, J., Reifenberg, K., Heinzmann, J., Niemann, H., Daser, A., Eichenlaub-Ritter, U., Zechner, U., Haaf, T. 2011. Limiting dilution bisulfite (pyro)sequencing reveals parent-specific methylation

patterns in single early mouse embryos and bovine oocytes. *Epigenetics* 6, 1176-1188.

**Fair, T.** 2003. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim Reprod Sci* 78, 203-216.

**Fair, T., Hulshof, S.C., Hyttel, P., Greve, T., Boland, M.** 1997. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. *Anat Embryol (Berl)* 195, 327-336.

**Finer, S., Mathews, C., Lowe, R., Smart, M., Hillman, S., Foo, L., Sinha, A., Williams, D., Rakyan, V.K., Hitman, G.A.** 2015. Maternal gestational diabetes is associated with genome-wide DNA methylation variation in placenta and cord blood of exposed offspring. *Human Molecular Genetics* 24, 3021-3029.

**Fowden, A.L., Sibley, C., Reik, W., Constancia, M.** 2006. Imprinted Genes, Placental Development and Fetal Growth. *Hormone Research in Paediatrics* 65(suppl 3), 50-58.

**Geuns, E., De Rycke, M., Van Steirteghem, A., Liebaers, I.** 2003. Methylation imprints of the imprint control region of the SNRPN-gene in human gametes and preimplantation embryos. *Human Molecular Genetics* 12, 2873-2879.

**Geuns, E., Hilven, P., Van Steirteghem, A., Liebaers, I., De Rycke, M.** 2007. Methylation analysis of KvDMR1 in human oocytes. *Journal Of Medical Genetics* 44, 144-147.

**Ginsburg, M., Snow, M.H., McLaren, A.** 1990. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development* 110, 521-528.

**Guibert, S., Forné, T., Weber, M.** 2012. Global profiling of DNA methylation erasure in mouse primordial germ cells. *Genome Research* 22, 633-641.

**Guo, H., Zhu, P., Yan, L., Li, R., Hu, B., Lian, Y., Yan, J., Ren, X., Lin, S., Li, J., Jin, X., Shi, X., Liu, P., Wang, X., Wang, W., Wei, Y., Li, X., Guo, F., Wu, X., Fan, X., Yong, J., Wen, L., Xie, S.X., Tang, F., Qiao, J.** 2014a. The DNA methylation landscape of human early embryos. *Nature* 511, 606-610.

**Hajkova, P., Erhardt, S., Lane, N., Haaf, T., El-Maarri, O., Reik, W., Walter, J., Surani, M.A.** 2002. Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mechanisms of Development* 117, 15-23.

**Hales, B.F., Grenier, L., Lalancette, C., Robaire, B.** 2011. Epigenetic programming: from gametes to blastocyst. *Birth Defects Research. Part A, Clinical And Molecular Teratology* 91, 652-665.

**Hanna, C.W., Kelsey, G.** 2014. The specification of imprints in mammals. *Heredity (Edinb)* 113, 176-183.

**Heijmans, B.T., Tobi, E.W., Stein, A.D., Putter, H., Blauw, G.J., Susser, E.S., Slagboom, P.E., Lumey, L.H.** 2008. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 17046-17049.

**Heinzmann, J., Hansmann, T., Herrmann, D., Wrenzycki, C., Zechner, U., Haaf, T., Niemann, H.** 2011. Epigenetic profile of developmentally important genes in bovine oocytes. *Molecular Reproduction And Development* 78, 188-201.

**Hirasawa, R., Chiba, H., Kaneda, M., Tajima, S., Li, E., Jaenisch, R., Sasaki, H.** 2008. Maternal and zygotic Dnmt1 are necessary and sufficient for the maintenance of DNA methylation imprints during preimplantation development. *Genes & Development* 22, 1607-1616.

**Hiura, H., Obata, Y., Komiyama, J., Shirai, M., Kono, T.** 2006a. Oocyte growth-dependent progression of maternal imprinting in mice. *Genes To Cells : Devoted To Molecular & Cellular Mechanisms* 11, 353-361.

**Huntriss, J., Picton, H.M.** 2008. Epigenetic consequences of assisted reproduction and infertility on the human preimplantation embryo. *Hum Fertil (Camb)* 11, 85-94.

**Kurimoto, K., Yabuta, Y., Ohinata, Y., Shigeta, M., Yamanaka, K., Saitou, M.** 2008. Complex genome-wide transcription dynamics orchestrated by Blimp1 for the specification of the germ cell lineage in mice. *Genes & Development* 22, 1617-1635.

**L, G., YX, P., H, C.** 2010. Gestational low protein diet in the rat mediates Igf2 gene expression in male offspring via altered hepatic DNA methylation. *Epigenetics* 5, 619-626.

**Laronda, M.M., Duncan, F.E., Hornick, J.E., Xu, M., Pahnke, J.E., Whelan, K.A., Shea, L.D., Woodruff, T.K.** 2014. Alginate encapsulation supports the growth and differentiation of human primordial follicles within ovarian cortical tissue. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 31, 1013-1028.

**Li, E., Beard, C., Jaenisch, R.** 1993. Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* 366, 362-365.

**Li, E., Bestor, T.H., Jaenisch, R.** 1992. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69, 915-926.

**Li, J.-Y., Lees-Murdock, D.J., Xu, G.-L., Walsh, C.P.** 2004. Timing of establishment of paternal methylation imprints in the mouse. *Genomics* 84, 952-960.

**Li, X., Ito, M., Zhou, F., Youngson, N., Zuo, X., Leder, P., Ferguson-Smith, A.C.** 2008. A Maternal-Zygotic Effect Gene, Zfp57, Maintains Both Maternal and Paternal Imprints. *Developmental Cell* 15, 547-557.

**Lonergan, P., Fair, T.** 2008. In vitro-produced bovine embryos: dealing with the warts. *Theriogenology* 69, 17-22.

**Lucifero, D., Mertineit, C., Clarke, H.J., Bestor, T.H., Trasler, J.M.** 2002. Methylation dynamics of imprinted genes in mouse germ cells. *Genomics* 79, 530-538.

**Lucifero, D., Mann, M.R., Bartolomei, M.S., Trasler, J.M.** 2004. Gene-specific timing and epigenetic memory in oocyte imprinting. *Human Molecular Genetics* 13, 839-849.

**Liu X., Wang, J., Li R., Sun, Q., Albrecht, E., Zhao, R.** 2011. Maternal dietary protein affects transcriptional regulation of myostatin gene distinctively at weaning and finishing stages in skeletal muscle of Meishan pigs. *Epigenetics* 6, 899-907.

**Maher, E.R., Reik, W.** 2000. Beckwith-Wiedemann syndrome: imprinting in clusters revisited. *The Journal Of Clinical Investigation* 105, 247-252.

- Mann, M.R., Lee, S.S., Doherty, A.S., Verona, R.I., Nolen, L.D., Schultz, R.M., Bartolomei, M.S.** 2004. Selective loss of imprinting in the placenta following preimplantation development in culture. *Development* 131, 3727-3735.
- Mertineit, C., Yoder, J.A., Taketo, T., Laird, D.W., Trasler, J.M., Bestor, T.H.** 1998. Sex-specific exons control DNA methyltransferase in mammalian germ cells. *Development* 125, 889-897.
- Messerschmidt, D.M., de Vries, W., Ito, M., Solter, D., Ferguson-Smith, A., Knowles, B.B.** 2012. Trim28 Is Required for Epigenetic Stability During Mouse Oocyte to Embryo Transition. *Science* 335, 1499-1502.
- Morgan, H.D., Santos, F., Green, K., Dean, W., Reik, W.** 2005. Epigenetic reprogramming in mammals. *Human Molecular Genetics* 14, R47-R58.
- Nakamura, T., Arai, Y., Umehara, H., Masuhara, M., Kimura, T., Taniguchi, H., Sekimoto, T., Ikawa, M., Yoneda, Y., Okabe, M., Tanaka, S., Shiota, K., Nakano, T.** 2007. PGC7/Stella protects against DNA demethylation in early embryogenesis. *Nat Cell Biol* 9, 64-71.
- Nelissen, E.C., Dumoulin, J.C., Busato, F., Ponger, L., Eijssen, L.M., Evers, J.L., Tost, J., van Montfoort, A.P.** 2014. Altered gene expression in human placentas after IVF/ICSI. *Hum Reprod* 29, 2821-2831.
- O'Doherty, A.M., O'Gorman, A., al Naib, A., Brennan, L., Daly, E., Duffy, P., Fair, T.** 2014. Negative energy balance affects imprint stability in oocytes recovered from postpartum dairy cows. *Genomics* 104, 177-185.
- O'Doherty, A.M., O'Shea, L.C., Fair, T.** 2012a. Bovine DNA Methylation Imprints Are Established in an Oocyte Size-Specific Manner, Which Are Coordinated with the Expression of the DNMT3 Family Proteins. *Biology of Reproduction* 86, 67.
- Oger, F., Dubois-Chevalier, J., Gheeraert, C., Avner, S., Durand, E., Froguel, P., Salbert, G., Staels, B., Lefebvre, P., Eeckhoutte, J.** 2014. Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  Regulates Genes Involved in Insulin/Insulin-like Growth Factor Signaling and Lipid Metabolism during Adipogenesis through Functionally Distinct Enhancer Classes. *Journal of Biological Chemistry* 289, 708-722.
- Ohinata, Y., Ohta, H., Shigeta, M., Yamanaka, K., Wakayama, T., Saitou, M.** 2009. A Signaling Principle for the Specification of the Germ Cell Lineage in Mice. *Cell* 137, 571-584.
- Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., Li, E.** 1999. DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development. *Cell* 99, 247-257.
- Ooi, S.K.T., O'Donnell, A.H., Bestor, T.H.** 2009. Mammalian cytosine methylation at a glance. *Journal of Cell Science* 122, 2787-2791.
- Oswald, J., Engemann, S., Lane, N., Mayer, W., Olek, A., Fundele, R., Dean, W., Reik, W., Walter, J.** 2000. Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Current biology : CB* 10, 475-478.
- Proudhon, C., Duffie, R., Ajjan, S., Cowley, M., Iranzo, J., Carbajosa, G., Saadeh, H., Holland, M.L., Oakey, R.J., Rakyan, V.K., Schulz, R., Bourc'his, D.** 2012. Protection against de novo methylation is instrumental in maintaining parent-of-origin methylation inherited from the gametes. *Mol Cell* 47, 909-920.
- Ravelli, A.C.J., van der Meulen, J.H.P., Michels, R.P.J., Osmond, C., Barker, D.J.P., Hales, C.N., Bleker, O.P.** 1998. Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *The Lancet* 351, 173-177.
- Reik, W., Dean, W., Walter, J.** 2001. Epigenetic Reprogramming in Mammalian Development. *Science* 293, 1089-1093.
- Reik, W., Walter, J.** 2001. Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet* 2, 21-32.
- Rideout, W.M., 3rd, Eggan, K., Jaenisch, R.** 2001. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science* 293, 1093-1098.
- Rivera, R.M., Stein, P., Weaver, J.R., Mager, J., Schultz, R.M., Bartolomei, M.S.** 2008. Manipulations of mouse embryos prior to implantation result in aberrant expression of imprinted genes on day 9.5 of development. *Human Molecular Genetics* 17, 1-14.
- Rossignol, S., Steunou, V., Chalas, C., Kerjean, A., Rigolet, M., Viegas-Pequignot, E., Jouannet, P., Bouc, Y.L., Gicquel, C.** 2006. The epigenetic imprinting defect of patients with Beckwith—Wiedemann syndrome born after assisted reproductive technology is not restricted to the 11p15 region. *Journal of Medical Genetics* 43, 902-907.
- Rutledge, C.E., Thakur, A., O'Neill, K.M., Irwin, R.E., Sato, S., Hata, K., Walsh, C.P.** 2014. Ontogeny, conservation and functional significance of maternally inherited DNA methylation at two classes of non-imprinted genes. *Development* 141, 1313-1323.
- Salilew-Wondim, D., Fournier, E., Hoelker, M., Saeed-Zidane, M., Tholen, E., Looft, C., Neuheff, C., Besenfelder, U., Havlicek, V., Rings, F., Gagné, D., Sirard, M.-A., Robert, C., A. Shojaei Saadi, H., Gad, A., Schellander, K., Tesfaye, D.** 2015. Genome-Wide DNA Methylation Patterns of Bovine Blastocysts Developed In Vivo from Embryos Completed Different Stages of Development In Vitro. *PLoS ONE* 10, e0140467.
- Sato, A., Otsu, E., Negishi, H., Utsunomiya, T., Arima, T.** 2007. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in superovulated oocytes. *Hum Reprod* 22, 26-35.
- Seisenberger, S., Peat, J.R., Hore, T.A., Santos, F., Dean, W., Reik, W.** 2013. Reprogramming DNA methylation in the mammalian life cycle: building and breaking epigenetic barriers. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 368, 20110330.
- Seki, Y., Hayashi, K., Itoh, K., Mizugaki, M., Saitou, M., Matsui, Y.** 2005. Extensive and orderly reprogramming of genome-wide chromatin modifications associated with specification and early development of germ cells in mice. *Developmental Biology* 278, 440-458.
- Seki, Y., Williams, L., Vuguin, P.M., Charron, M.J.** 2012. Minireview: Epigenetic Programming of Diabetes and Obesity: Animal Models. *Endocrinology* 153, 1031-1038.
- Shi, W., Haaf, T.** 2002. Aberrant methylation patterns at the two-cell stage as an indicator of early developmental failure. *Molecular Reproduction And Development* 63, 329-334.

- Smallwood, S.A., Tomizawa, S.-i., Krueger, F., Ruf, N., Carli, N., Segonds-Pichon, A., Sato, S., Hata, K., Andrews, S.R., Kelsey, G.** 2011. Dynamic CpG island methylation landscape in oocytes and preimplantation embryos. *Nature genetics* 43, 811-814.
- Smith, F.M., Garfield, A.S., Ward, A.** 2006. Regulation of growth and metabolism by imprinted genes. *Cytogenetic and Genome Research* 113, 279-291.
- Smith, L.C., Suzuki, J., Jr., Goff, A.K., Filion, F., Therrien, J., Murphy, B.D., Kohan-Ghadr, H.R., Lefebvre, R., Brisville, A.C., Buczinski, S., Fecteau, G., Perecin, F., Meirelles, F.V.** 2012. Developmental and epigenetic anomalies in cloned cattle. *Reproduction In Domestic Animals = Zuchthygiene* 47 Suppl 4, 107-114.
- Smith, Z.D., Chan, M.M., Humm, K.C., Karnik, R., Mekhoubad, S., Regev, A., Eggan, K., Meissner, A.** 2014a. DNA methylation dynamics of the human preimplantation embryo. *Nature* 511, 611-615.
- Smith, Z.D., Chan, M.M., Humm, K.C., Karnik, R., Mekhoubad, S., Regev, A., Eggan, K., Meissner, A.** 2014b. DNA methylation dynamics of the human preimplantation embryo. *Nature* 511, 611-615.
- Torres-Padilla, M.E., Ciosk, R.** 2013. A germline-centric view of cell fate commitment, reprogramming and immortality. *Development* 140, 487-491.
- Trapphoff, T., El Hajj, N., Zechner, U., Haaf, T., Eichenlaub-Ritter, U.** 2010. DNA integrity, growth pattern, spindle formation, chromosomal constitution and imprinting patterns of mouse oocytes from vitrified pre-antral follicles. *Human Reproduction* 25, 3025-3042.
- Ueda, T., Yamazaki, K., Suzuki, R., Fujimoto, H., Sasaki, H., Sakaki, Y., Higashinakagawa, T.** 1992. Parental methylation patterns of a transgenic locus in adult somatic tissues are imprinted during gametogenesis. *Development* 116, 831-839.
- Urrego, R., Rodriguez-Osorio, N., Niemann, H.** 2014. Epigenetic disorders and altered gene expression after use of Assisted Reproductive Technologies in domestic cattle. *Epigenetics* 9, 803-815.
- van Straten, E.M.E., Bloks, V.W., Huijkman, N.C.A., Baller, J.F.W., Meer, H.v., Lütjohann, D., Kuipers, F., Plösch, T.** 2010. The liver X-receptor gene promoter is hypermethylated in a mouse model of prenatal protein restriction. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 298, R275-R282.
- Veenendaal, M.V., Costello, P.M., Lillycrop, K.A., de Rooij, S.R., van der Post, J.A., Bossuyt, P.M., Hanson, M.A., Painter, R.C., Roseboom, T.J.** 2012. Prenatal famine exposure, health in later life and promoter methylation of four candidate genes. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* 3, 450-457.
- Veselovska, L., Smallwood, S.A., Saadeh, H., Stewart, K.R., Krueger, F., Maupetit-Méhouas, S., Arnaud, P., Tomizawa, S.-i., Andrews, S., Kelsey, G.** 2015. Deep sequencing and de novo assembly of the mouse oocyte transcriptome define the contribution of transcription to the DNA methylation landscape. *Genome Biology* 16, 209.
- Walsh, S.W., Fair, T., Browne, J.A., Evans, A.C.O., McGettigan, P.A.** 2012a. Physiological status alters immunological regulation of bovine follicle differentiation in dairy cattle. *J Reprod Immunol* 96, 34-44.
- Walsh, S.W., Mehta, J.P., McGettigan, P.A., Browne, J.A., Forde, N., Alibrahim, R.M., Mulligan, F.J., Loftus, B., Crowe, M.A., Matthews, D., Diskin, M., Mihm, M., Evans, A.C.O.** 2012b. Effect of the metabolic environment at key stages of follicle development in cattle: focus on steroid biosynthesis. *Physiological Genomics* 44, 504-517.
- Walter, J., Paulsen, M.** 2003. Imprinting and disease. *Semin Cell Dev Biol* 14, 101-110.
- Whitelaw, N., Bhattacharya, S., Hoad, G., Horgan, G.W., Hamilton, M., Haggarty, P.** 2014. Epigenetic status in the offspring of spontaneous and assisted conception. *Hum Reprod* 29, 1452-1458.
- Wu, S.C., Zhang, Y.** 2010. Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 607-620.
- Xu, G.L., Walsh, C.P.** 2014. Enzymatic DNA oxidation: mechanisms and biological significance. *BMB Rep* 47, 609-618.
- Zhou, D., Pan, Y.-X.** 2011. Gestational low protein diet selectively induces the amino acid response pathway target genes in the liver of offspring rats through transcription factor binding and histone modifications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1809, 549-556.



## Dinâmica e papel dos microRNAs durante o desenvolvimento folicular em mamíferos

S. Gebremedhn<sup>1</sup>, H. O. Pandey<sup>1</sup>, D. Salilew-wondim<sup>1</sup>, M. Hoelker<sup>1,2,3</sup>, K. Schellander<sup>1,3</sup>, D. Tesfaye<sup>1,3\*</sup>

Instituto de Ciência Animal, Departamento de Reprodução Animal e Pecuária, Universidade de Bonn, Bonn, Alemanha.

<sup>2</sup> Estação de Ensino e Pesquisa Frankenforst, Faculdade de Agricultura, Universidade de Bonn, Königswinter, Alemanha

<sup>3</sup> Centro de Pesquisa Integrada Leiteira, Universidade de Bonn, Bonn, Alemanha

Autor para correspondência: [tesfaye@itw.uni-bonn.de](mailto:tesfaye@itw.uni-bonn.de); Instituto de Ciência Animal, Grupo de criação e melhoramento animal, Universidade de Bonn, Endenicher Allee 15 Bonn, Alemanha

### Resumo

As funções ovarianas, que envolvem processos dinamicamente regulados de seleção, recrutamento e dominância, são conhecidas por serem regulados por um conjunto de genes que são expressos de forma espaço-temporal em células foliculares e gametas. Esta expressão diferencial de genes em células foliculares de mamíferos é parcialmente regulada por genes reguladores nomeados como microRNAs pós-transcricionais (miRNAs). Além dos miRNAs celulares, existem um número crescente de evidências disponíveis sobre o potencial papel de transferência de miRNAs em vesículas extracelulares mediadas no fluido folicular. Estas vesículas extracelulares são demonstradas envolvidas na comunicação célula-a-célula dentro do ambiente folicular. As mensagens moleculares desenvolvidas pelas vesículas extracelulares liberadas no espaço extracelular são pensadas como sendo um reflexo do estado fisiológico das células onde eles são liberados. Portanto, devido à sua natureza estrutural e potencial carga de moléculas fisiologicamente relevantes, os exossomos têm um grande potencial para serem usados como marcadores de oócitos na competência do desenvolvimento em um ambiente folicular. Aqui discutimos grandes conjuntos de literaturas para mostrar a natureza dinâmica dos miRNAs durante vários estágios de desenvolvimento folicular dos mamíferos, o crescimento de oócitos e o papel de alguns miRNAs em funções celulares do ovário. Além disso, a presença de microvesículas e miRNAs extracelulares acoplados ao exossoma no fluido folicular de mamífero e o seu envolvimento potencial na comunicação célula-a-célula são brevemente discutidos.

**Palavras-chave:** Foliculogênese, microRNAs, Vesículas extracelulares, exossomos, ovário

### MicroRNAs no ovário de mamífero

O ovário de mamíferos é um órgão regulado dinamicamente por uma série de processo de recrutamento folicular, seleção, domínio, ovulação e submissão a atresia. Estes processos estão sob a coordenação de fatores parácrinos e endócrinos que por sua vez regulam a expressão e interação de genes no ovário (Hunter et al., 2004). Numa tentativa de desvendar a regulação genética das funções ovarianas, a primeira importância funcional dos microRNAs (miRNAs) na reprodução feminina foi evidenciado pelo knockout do tecido específico de *Dicer*; uma importante

enzima ribonuclease III evolucionariamente conservada envolvida na biogênese dos miRNAs. A inativação condicional de *Dicer 1* na granulosa do ovário de rato, células uterinas e oviduto resultaram na infertilidade feminina, diminuindo a taxa de ovulação, encurtando os cornos uterinos e formação de cistos ovidutal (Nagaraja et al., 2008). Isso abriu portas para uma investigação mais aprofundada dos miRNAs e seu papel no ovário de mamíferos. Subsequentemente, na última década foi investigada intensivamente a identificação e análise funcional dos miRNAs, realizada nos ovários de mamíferos de várias espécies. Vários grupos relataram que os miRNAs são expressos em células de ovários de mamíferos apresentando um potencial envolvimento na regulação pós-transcricional de genes importantes no ovário. A construção de bibliotecas de pequenos RNAs do DNA complementar (srcRNA) revelou que a classe de miRNAs mais abundantemente expressos de pequenos RNAs em células do ovários de ratos (RO et al., 2007). Um sequenciamento paralelo da pequena fração de RNA extraído de ovário de ratos recém-nascidos identificou 398 genes conhecidos e quatro novos microRNAs expressos em células de ovário de ratos recém-nascidos (Ahn et al., 2010). Da mesma forma, a construção de bibliotecas de pequenos RNA a partir de ovários de vacas identificou 50 genes conhecidos e 24 novos miRNAs, entre os quais miRNAs; let-7a, let-7b, let-7c, miR-21, miR-23b, miR-24, miR-27a, miR-126 e miR-143 foram encontrados como os mais dominantes (Hossain et al., 2009). O padrão de expressão dos miRNAs no ovário de ovelhas durante o anestro e na época reprodutiva identificou 97 genes conhecidos, 369 conservados e 17 novos miRNAs (Di et al., 2014). Amostras ovarianas de cabras uníparas e múltiparas mostraram a expressão diferencial de 8 microRNAs, sendo 7 da família let; ; let-7b, let-7b-5p, let-7-5p, let-7c, let-7c-5p, let-7f-5p, let-7f, let-7 e miR-140 estavam entre os 10 abundantemente expressos em ambos os ovários uníparos e múltiparos (Ling et al., 2014). Um sequenciamento profundo de miRNAs em células de ovários suíno também identificou a abundância de cerca de 732 microRNAs (Li et al., 2011). Após a identificação de microRNAs nos ovários de várias espécies, os últimos anos de estudo têm se centrado sobre a caracterização e análise de expressão funcional destas moléculas reguladoras do crescimento folicular e a função ovariana.

### Dinâmica da expressão do miRNA durante o desenvolvimento folicular



Durante o curso da foliculogênese em mamíferos, diferentes miRNAs são expressos nas células da teca, células da granulosa (Salilew-Wondim et al., 2014; Gebremedhn et al., 2015), complexo cúmulos-oócito (Abd El Naby et al., 2013), dinâmica de expressão de miRNA no fluido folicular durante o desenvolvimento folicular (Sohel et al., 2013) e o corpo lúteo (McBride et al., 2012; Maalouf et al., 2016b). Nós temos mostrado previamente diferenças significativas na expressão de miRNAs em células da granulosa de bovinos derivadas de folículos subordinados e dominantes da primeira fase lútea (dias 3 e 7 do ciclo estral) (Salilew-Wondim et al., 2014) e da fase folicular tardia (dia 19 do ciclo estral) (Gebremedhn et al., 2015). Curiosamente, a extensão da abundância das diferenças relativas de microRNAs em células da granulosa de duas categorias foliculares foi mínima no dia 3, ao passo que foi maior no dia 7 e 19. No entanto, independentemente do dia do ciclo estral, miR-26 e miR-10b, membros da família let-7, foram os miRNAs abundantemente expressos em células da granulosa de ambos os folículos dominantes e subordinados (Salilew-Wondim et al., 2014; Gebremedhn et al., 2015) apresentando um papel significativo na organização e desenvolvimento folicular bovina. A natureza na dinâmica da expressão de miRNA foi também evidenciada na espécie ovina durante a transição folicular-lútea, em que miR-21, miR-125b, let-7a e let-7b mRNAs foram abundantemente mais expressos durante a análise comparativa em ovinos em crescimento folicular, folículos pré ovulatórios, corpos lúteos precoce e tardio (McBride et al., 2012). Da mesma forma, a tecnologia de microarranjo foi utilizada para investigar a associação da expressão de miRNA com o crescimento folicular e atresia de bovinos. Para isso, a análise de expressão de miRNA de todo o genoma foi realizada em amostras de tecidos derivadas de pequenos folículos em crescimento (4-8 mm), grandes folículos saudáveis (12-17 mm) e folículos atresícos (Sontakke et al., 2014). Entre os 17 miRNAs diferencialmente expressos, o miR-144, o miR-202, o miR-451, o miR-652 e miR-873 foram enriquecidos em folículos saudáveis maiores em comparação com os folículos pequenos em crescimento. Além disso, 57 miRNAs foram diferencialmente expressos entre folículos grandes e folículos atresícos. Para determinar o envolvimento de miRNAs selecionados obtidos a partir de estudos in vitro; miR-21, miR-23a, miR-145, miR-503, miR-224, miR-383, miR-378, miR-132 e miR-212 na regulação do desenvolvimento folicular de equino, Donadeu e Schauer (2013) aspiraram fluido folicular de folículos dominantes durante as estações ovulatória e anovulatória. Mostrou-se que os níveis relativos de miR-21, o miR-23b, o miR-378 e miR-202 foram mais elevados nos folículos ovulatórios, e o miR-145 tende a ter um nível mais elevado em folículos anovulatórios. O nível de miR-21, miR-132, miR-212 e miR-224 foi maior em folículos dominantes, enquanto que a expressão dos genes *alvos*; *PTEN*, *RASA1* e *SMAD4* foi reduzida, indicando a sua potencial participação na regulação da sobrevivência celular, diferenciação e esteroidogênese durante a seleção folicular no ovário de equinos (Schauer et al., 2013).

Dependendo da sua localização genômica, os miRNAs são agrupados e denominados em um determinado

grupo (Mathelier & Carbone 2013). A análise da expressão de dados de miRNAs revelaram um padrão interessante de co-enriquecimento ou degradação de agrupamentos de miRNAs em fases específicas do desenvolvimento folicular de bovinos. Desta forma, o conjunto de miR-183-96-182, conjunto de miR-132-212 e miR-424-450-542 miRNAs foram significativamente enriquecido em células da granulosa de folículos pré ovulatórios dominantes enquanto o fragmentação de miRNAs miR-17-92 foram enriquecidas em células da granulosa de folículos subordinados obtidos no dia 19 do ciclo estral (Gebremedhn et al., 2015).

### O potencial papel dos miRNAs no controle das funções ovarianas

Durante o curso do desenvolvimento folicular, proliferação e diferenciação de células da granulosa, são essenciais para proporcionar um ideal recrutamento folicular, dominância, maturação, ovulação e atresia. Vários estudos indicam o envolvimento de miRNAs na regulação, proliferação, diferenciação, sobrevivência, transição do ciclo celular e/ou apoptose de células da granulosa (Carletti et al., 2010; Sirotkin et al., 2010; Yin et al., 2014; Andreas et al., 2016; Gebremedhn et al., 2016). Curiosamente, modelos in vitro de cultura de células da granulosa tornaram-se mais populares e amplamente utilizadas para compreender o potencial papel dos miRNAs nas funções ovarianas. Por esta razão, a maioria dos estudos funcionais de miRNAs em células da granulosa são realizados in vitro por meio da perda e ganho de função, através da modulação dos níveis de miRNAs selecionados (Maalouf et al., 2016a).

Numa tentativa de determinar o papel do miR-15a em humanos para controlar as funções das células básicas para células da granulosa, Sirotkin et al. (2014) transfectaram células da granulosa primárias de humanos com anti-miR-15a e precursor de miR-15a, seguido de avaliação da expressão gênica de marcadores para proliferação celular (MAPK / ERL 1, 2 e PCNA), apoptose (Bax e Caspase 3) e níveis hormonais (progesterona, estradiol e testosterona) em meio de cultura. Foi demonstrado que a inibição do miR-15a aumentou com a acumulação de proteínas da proliferação e marcadores de apoptose houveram um redução na de progesterona e testosterona e promoveram um aumento de estradiol. Contrariamente a isto, a supra expressão de miR-15a resultou num efeito oposto. Evidências mostraram que vários fatores extra e intraovarianos, tais como os membros da superfamília de TGF- $\beta$  (van den Hurk & Zhao 2005; Knight & Glistler 2006), quinases do receptor de ativina-like (Alq) e os *Smads* (Miyazawa et al., 2002; Florio et al., 2010), são descritos como reguladores do desenvolvimento folicular. Os membros da superfamília de TGF- $\beta$ , os quais são conhecidos por estarem envolvidos na proliferação de células da granulosa e diferenciação (Hsueh et al., 1984; Hirshfield 1991), foram relatados como fatores pós-transcricionais regulados por miRNAs em células da granulosa (Yao et al., 2014). Nesse estudo, a supra expressão de miR-224 aumenta a proliferação induzida de TGF- $\beta$ 1 em células da granulosa direcionada pelo gene *Smad4*. Por outro lado, a inibição de miR-224 suprimirá a proliferação de células da granulosa induzidas pelo tratamento com TGF- $\beta$ 1.

Do mesmo modo, a expressão de miR-181a diminuiu em células da granulosa de ratos com ativina A em uma dose dependente e a supra-expressão da proliferação celular inibida por miR0181a direcionada por acvr2a, que por sua vez, resultou na supra-expressão de CCND2 e PCNA (Zhang et al., 2013). Recentemente, mostramos que o agrupamento de moR-183-96-182 direciona a expressão coordenada de FOXO1 e promove proliferação celular e de transição de células da granulosa de bovinos. A supra-expressão dos fragmentos de miRNAs miR183-96-182, reduziu a proporção das células em G0/G1, aumentando a proporção de células que entram em fase S do ciclo celular. Curiosamente, a degradação seletiva de FOXO1 usando siRNAs também promoveu a transição da proliferação celular. Estas evidências apoiam a ideia do papel coordenado deste agrupamento de miRNA na repressão de genes anti-proliferativo e as suas transcrições jusante (Gebremedhn et al., 2016). Durante vários estágios de desenvolvimento folicular ovariano, a maioria dos folículos sofre atresia, desencadeando a apoptose da célula da granulosa (Portela et al., 2015). Evidências estão disponíveis sobre a regulamentação dos miRNA na apoptose de células da granulosa, que determinam o destino de células foliculares no sentido de uma ovulação ou atresia. Em um dos primeiros estudos funcionais de miRNA, miR-21, é descrito como um dos três miRNAs altamente induzidos em células da granulosa de murídeos, em resposta a administração de uma dose ovulatória de LH, induzindo as células da granulosa a apoptose após as inibição. No mesmo estudo in vivo, o tratamento com anti-miR-21 no ovário, resultou em taxas reduzidas da ovulação em comparação com o ovário contralateral não tratado (Carletti et al., 2010). A let-7g induziu a apoptose em células da granulosa de suínos, visando o gene TGFBR1 (Zhou et al., 2015), enquanto que folículos atresiais de suínos altamente enriquecidos com let-7g e sua supra-expressão promovem a apoptose de células da granulosa (Cao et al., 2015). MiR-26b promove a apoptose e induz a atresia folicular em células da granulosa de suínos, visando SMAD4 (Liu et al., 2014) e ATM (Lin et al., 2012). MiR-34a promove a apoptose de células da granulosa, visando INHBB em células de ovário de suíno (Tu et al., 2014). Da mesma forma, a análise funcional dos agrupamentos miR-17-92, foi visto com enriquecido em células da granulosa de bovinos obtidos a partir dos folículos subordinados de 19 dias do ciclo estral, revelando um papel regulador do agrupamento de células da granulosa proliferação, diferenciação e esteroidogênese, visando genes *PTEN* e *BMPR2*. A supra-expressão do agrupamento miRNA promove a proliferação de células, diminuição da proporção de células em diferenciação (Andreas et al., 2016).

#### Regulação hormonal e da esteroidogênese por miRNAs

De acordo com a teoria “two-cell-two-gonadotropin”, o hormônio luteinizante estimula as células da teca para produzir andrógenos, e o hormônio folículo-estimulante estimula as células da granulosa a produzir estrógenos de andrógenos (Barnes et al., 2000). Evidências

indicam que miRNAs atuam como reguladores da esteroidogênese (Schauer et al., 2013; Toms et al., 2015; Donadeu et al., 2016). O efeito dos miRNAs sobre a libertação dos principais hormônios esteroides ovarianos foi determinada através da transfecção de células da granulosa primárias de humanos com a construção de 80 pré-miRNAs humanos diferentes, e a liberação de progesterona foi inibida por 46 miRNAs. Considerando que, 10 miRNAs promoveram a libertação da progesterona (Sirotkin et al., 2009). MiR-378 diminui a produção de estradiol ovariano, em relação a aromatase. No entanto, a supra-expressão da aromatase 3'-UTR em células da granulosa aumenta o nível de expressão da aromatase no nível de proteína, possivelmente mediada pela ligação do miR-378 dentro desta região, reduzindo assim a ligação deste miRNA para a aromatase endógena 3'-UTR (Xu et al., 2011). Em estudo diferente, o receptor de progesterona (PGR) foi alvo do miR-378-3p levando a diminuição dos níveis de proteína e mRNA e seus genes alvo; *ADAMTS1*, *CTSL1* e *PPARG*, envolvidos na maturação folicular e remodelação (Toms et al., 2015). Um estudo recente mostrou que o nível de miR-378 na parede folicular foi correlacionada com o estradiol, a razão estradiol: progesterona e *CYP19A1* (Donadeu et al., 2016). MiR-34a e miR-320 inibiu a liberação do estradiol em células da granulosa de humanos e ovários de murinos, respectivamente (Sirotkin et al., 2009; Yao et al., 2014). No entanto, o miR-320 poderia estimular a testosterona e progesterona no ovário murino. Curiosamente, o miR-383 tem sido demonstrado como regulador positivo da produção de estradiol em células da granulosa de rato através da inibição RBMS1, o que leva à inativação de c-Myc e da esteroidogênese (Yin et al., 2014). Além disso, o miR-132 está envolvida na via de sinalização do AMPc e promove a síntese de estradiol através da repressão de translocação de Nurr1 em células da granulosa do ovário e induz significativamente a expressão de *CYP19A1* através Nurr1; um alvo direto que suprime a expressão *CYP19A1* (Wu et al., 2015). Da mesma forma, miR-133b está envolvido com o hormônio folículo-estimulante (FSH) induzindo a produção de estrogênio por baixa regulação FOXL2 e inibindo a repressão da transcrição FOXL2 mediada por *STAR* e *CYP19A1* para promover a produção de estradiol (Dai et al., 2013). A supra-expressão de miR-20a, que está validado em relação aos genes *PTEN* e *BMPR2*, induziram a liberação de progesterona em cultura em células da granulosa de bovino in vitro (Andreas et al., 2016).

Recentemente, foi investigado o efeito do nível supra-fisiológico de gonadotropinas introduzida durante o processo de hiper-estimulação ovariana controlada sobre o nível de miRNAs extracelulares no plasma e fluido folicular de sangue bovino (Noferesti et al., 2015). Mostrou-se que, 57 e 21 miRNAs foram diferencialmente expressos no fluido folicular e plasma sanguíneo, respectivamente, derivado de novilhas hiper-estimuladas em comparação com o controle homólogo não estimulado. A análise de bioinformática revelou que as vias incluindo a sinalização TGF- $\beta$ , a sinalização MAPK e meiose de oócitos são significativamente enriquecida por genes-alvo dos miRNAs regulados positivamente seletivamente no plasma e no fluido folicular de novilhas hiper-estimulado (Noferesti et al.,

2015). Apesar do fato, a escolha do mecanismo de liberação de miRNA no espaço extracelular não é bem compreendida, detectamos miARNs circulante em exossomas e na fração ago2 do fluido folicular e plasma sanguíneo de bezerras de controle hiperestimuladas e não estimuladas. Isso pode evidenciar a liberação do mecanismo de miRNAs no espaço extracelular tanto em fluido folicular quanto em plasma sanguíneo não foi afetada pelo tratamento super-estimulação.

### miRNAs no fluido folicular extracelular

Embora a maioria dos miRNAs são encontrados intracelularmente, números enormes de miRNAs foram encontrados circulantes no espaço extracelular e fluidos biológicos, incluindo fluido folicular (Donadeu & Schauer 2013; Sohel et al., 2013; Santonocito et al., 2014). O fluido folicular de mamíferos consiste numa mistura complexa de ácidos nucleicos, proteínas, metabólitos e dos íons, que são conhecidos por serem segregados pelos oócitos, células granulosas, células da teca e componentes do plasma sanguíneo que vêm ao fluido folicular através de capilares da teca (Revelli et al., 2009; Rodgers & Irving-Rodgers 2010). O fluido folicular cria um microambiente muito adequado para o crescimento e o desenvolvimento dos oócitos e a sua composição bioquímica varia dependendo do estado fisiológico do folículo. Como qualquer alteração na composição do fluido folicular pode ser relacionada com a qualidade dos oócitos, os componentes do fluido folicular podem fornecer informações de diagnóstico úteis em funções de competência e do ovário no desenvolvimento de oócitos (Revelli et al., 2009). Vários componentes bioquímicos, incluindo hormônios, fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas, que são secretadas por células foliculares no fluido folicular, são conhecidos por promoverem a maturação do oócito. A avaliação de qualquer um dos componentes específicos no fluido folicular em qualquer fase de desenvolvimento folicular revelou o estado fisiológico do animal em geral e o estado de saúde do oócito ou de crescimento em particular (Sohel et al., 2013). Além do modo autócrino e parácrino de comunicação no interior do folículo ovariano, mecanismos alternativos recentemente entram em jogo. Este mecanismo em que os oócitos ou células somáticas trocam sinais foliculares é mediada pelas denominadas exossomas microvesiculares, que transportam os RNA (mRNA, miRNA, lncRNA e outros tipos de RNAs) e proteínas, fragmentos de DNA.

Vesículas extracelulares podem ser amplamente classificadas em 3 classes principais: microvesículas / micropartículas / ectossomas, que são produzidos através de brotamento e de fusão da membrana plasmática, enquanto que exossomas são formados no interior da rede endossomal e libertado mediante fusão de corpos multivesiculares com a membrana plasmática. A liberação de vesículas extracelulares (SVE), incluindo exossomas e microvesículas, é um fenômeno partilhado por muitos tipos de células como um meio de comunicação com outras células. EVs lançados para o espaço extracelular podem potencialmente atingir tecidos distantes através da circulação, e uma vez tomadas pelas células vizinhas e / ou

distantes, os EVs pode transferir moléculas funcionais que podem alterar o estado da célula receptora, contribuindo assim para ambos os processos fisiológicos e patológicos.

Microvesículas extracelulares e exossomas no fluido folicular transportando miRNAs como moléculas de carga têm sido detectados em bovinos (Sohel et al., 2013; Noferesti et al., 2015; Navakanitworakul et al., 2016), equinos (da Silveira et al., 2012; da Silveira et al., 2014; da Silveira et al., 2015) e humanos (Xiao et al., 2016). A presença de EV (microvesículas ou exossomas) em fluido folicular suporta a ideia de que eles desempenham um papel significativo nas funções ovarianas. O tamanho e a concentração de EVs no fluido folicular entre os diferentes folículos tem sido investigada (Navakanitworakul et al., 2016). No mesmo estudo, enquanto não foram observadas alterações significativas no tamanho das vesículas extracelulares entre pequenos, médios e grandes folículos, a concentração de vesículas extracelulares diminuiu progressivamente à medida que aumenta o tamanho do folículo. Um microarranjo ou sequenciamento baseado nos perfis de expressão dos miRNAs de exossomas de fluido folicular identificados em bovinos demonstrou que são diferencialmente enriquecidos em tamanho do folículo, dependendo da forma (Navakanitworakul et al., 2016) e competência de oócito em desenvolvimento (Sohel et al., 2013). Interessantemente, no primeiro estudo os miRNAs enriquecido em exossomas isoladas de pequenos folículos foram encontrados sendo associados com a proliferação celular, enquanto miRNAs abundantes em grandes folículos foram encontrados relacionados com vias de resposta inflamatória. Da mesma forma, o número significativo de miRNAs foram identificados sendo diferencialmente transportados por exossomas ou complexos proteicos ago2 isolada do fluido folicular que possuem oócitos com estado de crescimento diferente (Sohel et al., 2013). Esses miRNAs diferencialmente expressos a partir de ambos exossomas e fração não exossomal do fluido folicular foram encontrados envolvidos com vias moleculares (via de sinalização MAPK, de adesão focal e regulação do citoesqueleto de actina), os quais são conhecidos por serem principais reguladores do desenvolvimento folicular e do crescimento de oócito.

Durante o curso do desenvolvimento folicular dos bovinos, a expansão das células do cúmulus é essencial para a maturação de oócitos e a liberação através da ovulação para uma fertilização bem sucedida e no desenvolvimento embrionário precoce. O aumento do LH na expressão de genes, tais como *COX-2* induzida (Ptgs2), pentraxina-related protein 3 (*PTX3*), e fator de necrose tumoral-alfa induzida por proteína 6 (*Tnfaip6*) são essenciais para a expansão das células do cúmulus. Recentemente, a co-incubação de COC bovino com vesículas extracelulares isolados a partir do fluido folicular aspirados de pequenos e grandes folículos sob condições in vitro resultou na expansão do cumulus e aumento da expressão dos genes acima mencionados (Hung et al., 2015). Além disso, as diferenças relacionadas à idade na exossoma mediada abundância de miRNA no fluido folicular de murinos foi evidenciado (da Silveira et al., 2015). Esta expressão diferencial de miRNAs exossomal tem sido associada com a expressão de genes de células da granulosa associados a via de sinalização de TGF- $\beta$ , que é a

via dominante da modulação do desenvolvimento folicular e o crescimento de oócitos.

### O potencial papel dos miRNAs extracelulares na comunicação célula-a-célula

O desenvolvimento folicular ovariano e maturação do oócito são processos coordenados e mediados por uma constante troca de sinais entre as células somáticas ovarianas e os oócitos (Zuccotti et al., 2011). Estas trocas de sinais são possíveis através da criação de junções comunicantes entre as células somáticas circundantes e os oócitos (Cecconi et al., 2004; Gilchrist et al., 2008). No ambiente fisiológico de contato entre o circundante especialmente células da granulosa e oócitos é mediada pela expressão de moléculas-chave principalmente conexinas (Cx37 e Cx43) que também são expressas em fases iniciais do desenvolvimento do embrião de mamíferos (Gittens et al., 2005; Gittens & Kidder 2005). A comunicação mútua entre as células dos oócitos e cumulus é realizada através da secreção de ambas as células de ovócitos e cumulus ou fatores secretados, e são demonstrados por afetar uns aos outros em abundância relativa de transcritos no mRNA (Regassa et al., 2011) e nível de miRNA (Abd El Naby et al., 2013). Os fatores secretados dos oócitos que passam através das junções de hiato incluem íons, metabolitos e os aminoácidos que são necessários para o crescimento de oócitos, bem como pequenas moléculas reguladoras que controlam o desenvolvimento de oócitos (Gilchrist et al., 2008). Além da comunicação direta, a transferência de sinais entre os diferentes tipos de células foliculares pode ser facilitada por vesículas extracelulares que circulam no fluido folicular.

A liberação de EVs, incluindo exossomas e microvesículas, é uma característica celular compartilhada por muitos tipos de células como um meio de se comunicar com outras células e também potencialmente remover o conteúdo da célula. Este fenômeno é mais evidente no ambiente folicular onde a comunicação célula-a-célula é vital para o crescimento dos oócitos. miRNAs transportados por microvesículas e exossomas no fluido folicular são encontrados também presentes nas células foliculares circundantes, incluindo células da teca, células da granulosa e complexo cúmulos-oócito (Sohel et al., 2013). Em adição à identificação de miRNAs realizada por exossomas no fluido folicular de mamífero, experiências in vitro foram realizadas para simular a comunicação célula-a-célula mediada por exossomas (da Silveira et al., 2012; Sohel et al., 2013; Da Silveira et al., 2014; Di Pietro 2016). Para isto, demonstramos anteriormente que a marcação de exossomas na membrana isoladas do fluido folicular de bovinos em oócitos em crescimento ou maduros, foram co-cultivados com células da granulosa in vitro (Sohel et al., 2013). A captação de exossomas por células da granulosa cultivadas resultou num aumento subsequente da miRNAs celulares endógenos e alteração na expressão do gene. Uma experiência semelhante em equinos também evidenciou a absorção de microvesículas por cultura de células da granulosa in vitro e in vivo (da Silveira et al., 2012). Exossomas isolados de folículos mid-estro e pré-ovulatórios e conhecidos carga ACVR1 e miR-27b, miR-372 e miR-382

foram encontrados para alterar a ID2 (um gene alvo *ACVR1*) no folículo murino pré-ovulatório (da Silveira et al., 2014).

Ao todo, o fluido folicular irá fornecer um ambiente potencial para a identificação de moléculas de marcador associado com o desenvolvimento folicular e a competência do oócito. Além disso, com a identificação das vesículas extracelulares como carga para sinais moleculares, enormes oportunidades na terapêutica no domínio dos tratamentos de fertilidade.

### Conclusão

A foliculogênese ou a funcionalidade do ovário em mamíferos é um processo coordenado, envolvendo uma interação molecular entre vários tipos de células somáticas e do desenvolvimento de gameta no microambiente folicular para alcançar o sucesso da ovulação, fertilização e desenvolvimento do embrião e para o nascimento saudável da prole. Entender a regulação genética desses processos abre caminho para identificar perfis moleculares e seus mecanismos regulatórios associados à função ovariana e facilitar o desenvolvimento de marcadores de diagnósticos para competência de oócitos em desenvolvimento. Especialmente, explorando o fluido folicular para a presença de miRNAs extracelulares, o que poderia ser indicadores de funções ovarianas e, posteriormente, de competência dos oócitos, abrirá o caminho para o desenvolvimento de ferramentas de diagnósticos não invasivos para tratar a fertilidade feminina. Além disso, pesquisas futuras precisam se concentrar em decifrar as fontes exatas e o papel dos miRNAs extracelulares no fluido folicular para facilitar o desenvolvimento de ferramentas terapêuticas para tratamentos de fertilidade associados com a funcionalidade do ovário.

### Referências

- Abd El Naby W.S., Hagos T.H., Hossain M.M., Salilew-Wondim D., Gad A.Y., Rings F., Cinar M.U., Tholen E., Looft C., Schellander K., Hoelker M. & Tesfaye D. (2013) Expression analysis of regulatory microRNAs in bovine cumulus oocyte complex and preimplantation embryos. *Zygote* 21, 31-51.
- Ahn H.W., Morin R.D., Zhao H., Harris R.A., Coarfa C., Chen Z.J., Milosavljevic A., Marra M.A. & Rajkovic A. (2010) MicroRNA transcriptome in the newborn mouse ovaries determined by massive parallel sequencing. *Mol Hum Reprod* 16, 463-71.
- Andreas E., Hoelker M., Neuheff C., Tholen E., Schellander K., Tesfaye D. & Salilew-Wondim D. (2016) MicroRNA 17-92 cluster regulates proliferation and differentiation of bovine granulosa cells by targeting PTEN and BMP2 genes. *Cell Tissue Res.*
- Barnes R.B., Rosenfield R.L., Namnoum A. & Layman L.C. (2000) Effect of Follicle-Stimulating Hormone on Ovarian Androgen Production in a Woman with Isolated Follicle-Stimulating Hormone Deficiency. *New England Journal of Medicine* 343, 1197-8.
- Cao R., Wu W.J., Zhou X.L., Xiao P., Wang Y. & Liu H.L. (2015) Expression and preliminary functional

profiling of the let-7 family during porcine ovary follicle atresia. *Mol Cells* 38, 304-11.

**Carletti M.Z., Fiedler S.D. & Christenson L.K.** (2010) MicroRNA 21 blocks apoptosis in mouse periovulatory granulosa cells. *Biol Reprod* 83, 286-95.

**Cecconi S., Ciccarelli C., Barberi M., Macchiarelli G. & Canipari R.** (2004) Granulosa cell-oocyte interactions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1, S19-22.

**da Silveira J.C., Carnevale E.M., Winger Q.A. & Bouma G.J.** (2014) Regulation of ACVR1 and ID2 by cell-secreted exosomes during follicle maturation in the mare. *Reprod Biol Endocrinol* 12, 1477-7827.

**da Silveira J.C., Veeramachaneni D.N., Winger Q.A., Carnevale E.M. & Bouma G.J.** (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.

**da Silveira J.C., Winger Q.A., Bouma G.J. & Carnevale E.M.** (2015) Effects of age on follicular fluid exosomal microRNAs and granulosa cell transforming growth factor- $\beta$  signalling during follicle development in the mare. *Reprod Fertil Dev* 7.

**Dai A., Sun H., Fang T., Zhang Q., Wu S., Jiang Y., Ding L., Yan G. & Hu Y.** (2013) MicroRNA-133b stimulates ovarian estradiol synthesis by targeting Foxl2. *FEBS Lett* 587, 2474-82.

**Di Pietro C.** (2016) Exosome-mediated communication in the ovarian follicle. *J Assist Reprod Genet* 33, 303-11.

**Di R., He J., Song S., Tian D., Liu Q., Liang X., Ma Q., Sun M., Wang J., Zhao W., Cao G., Yang Z., Ge Y. & Chu M.** (2014) Characterization and comparative profiling of ovarian microRNAs during ovine anestrus and the breeding season. *BMC Genomics* 15, 1471-2164.

**Donadeu F.X. & Schauer S.N.** (2013) Differential miRNA expression between equine ovulatory and anovulatory follicles. *Domest Anim Endocrinol* 45, 122-5.

**Donadeu F.X., Sontakke S.D. & Ioannidis J.** (2016) MicroRNA indicators of follicular steroidogenesis. *Reprod Fertil Dev*.

**Florio P., Gabbanini M., Borges L.E., Bonaccorsi L., Pinzauti S., Reis F.M., Boy Torres P., Rago G., Litta P. & Petraglia F.** (2010) Activins and related proteins in the establishment of pregnancy. *Reprod Sci* 17, 320-30.

**Gebremedhn S., Salilew-Wondim D., Ahmad I., Sahadevan S., Hossain M.M., Hoelker M., Rings F., Neuhoﬀ C., Tholen E., Looft C., Schellander K. & Tesfaye D.** (2015) MicroRNA Expression Profile in Bovine Granulosa Cells of Preovulatory Dominant and Subordinate Follicles during the Late Follicular Phase of the Estrous Cycle. *PLoS One* 10.

**Gebremedhn S., Salilew-Wondim D., Hoelker M., Rings F., Neuhoﬀ C., Tholen E., Schellander K. & Tesfaye D.** (2016) MicroRNA-183~96~182 Cluster Regulate Bovine Granulosa Cell Proliferation and Cell Cycle Transition by Coordinately Targeting FOXO1. *Biol Reprod*.

**Gilchrist R.B., Lane M. & Thompson J.G.** (2008) Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update* 14, 159-77.

**Gittens J.E., Barr K.J., Vanderhyden B.C. & Kidder G.M.** (2005) Interplay between paracrine signaling and gap junctional communication in ovarian follicles. *J Cell Sci* 118, 113-22.

**Gittens J.E. & Kidder G.M.** (2005) Differential contributions of connexin37 and connexin43 to oogenesis revealed in chimeric reaggregated mouse ovaries. *J Cell Sci* 118, 5071-8.

**Hirshfield A.N.** (1991) Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol* 124, 43-101.

**Hossain M.M., Ghanem N., Hoelker M., Rings F., Phatsara C., Tholen E., Schellander K. & Tesfaye D.** (2009) Identification and characterization of miRNAs expressed in the bovine ovary. *BMC Genomics* 10, 1471-2164.

**Hsueh A.J., Adashi E.Y., Jones P.B. & Welsh T.H., Jr.** (1984) Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr Rev* 5, 76-127.

**Hung W.T., Hong X., Christenson L.K. & McGinnis L.K.** (2015) Extracellular Vesicles from Bovine Follicular Fluid Support Cumulus Expansion. *Biol Reprod* 93, 30.

**Hunter M.G., Robinson R.S., Mann G.E. & Webb R.** (2004) Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. *Anim Reprod Sci* 83, 461-77.

**Knight P.G. & Glister C.** (2006) TGF- $\beta$  superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction* 132, 191-206.

**Li M., Liu Y., Wang T., Guan J., Luo Z., Chen H., Wang X., Chen L., Ma J., Mu Z., Jiang A.A., Zhu L., Lang Q., Zhou X., Wang J., Zeng W., Li N., Li K., Gao X. & Li X.** (2011) Repertoire of porcine microRNAs in adult ovary and testis by deep sequencing. *Int J Biol Sci* 7, 1045-55.

**Lin F., Li R., Pan Z.X., Zhou B., Yu de B., Wang X.G., Ma X.S., Han J., Shen M. & Liu H.L.** (2012) miR-26b promotes granulosa cell apoptosis by targeting ATM during follicular atresia in porcine ovary. *PLoS One* 7, 21.

**Ling Y.H., Ren C.H., Guo X.F., Xu L.N., Huang Y.F., Luo J.C., Zhang Y.H., Zhang X.R. & Zhang Z.J.** (2014) Identification and characterization of microRNAs in the ovaries of multiple and uniparous goats (*Capra hircus*) during follicular phase. *BMC Genomics* 15, 1471-2164.

**Liu J., Du X., Zhou J., Pan Z., Liu H. & Li Q.** (2014) MicroRNA-26b functions as a proapoptotic factor in porcine follicular Granulosa cells by targeting Sma- and Mad-related protein 4. *Biol Reprod* 91, 13.

**Maalouf S.W., Liu W.S. & Pate J.L.** (2016a) MicroRNA in ovarian function. *Cell Tissue Res* 363, 7-18.

**Maalouf S.W., Smith C.L. & Pate J.L.** (2016b) Changes in MicroRNA Expression During Maturation of the Bovine Corpus Luteum: Regulation of Luteal Cell Proliferation and Function by MicroRNA-34a. *Biol Reprod* 94, 10.

**Mathelier A. & Carbone A.** (2013) Large scale chromosomal mapping of human microRNA structural clusters. *Nucleic Acids Res* 41, 4392-408.

**McBride D., Carre W., Sontakke S.D., Hogg C.O., Law A., Donadeu F.X. & Clinton M.** (2012) Identification

of miRNAs associated with the follicular-luteal transition in the ruminant ovary. *Reproduction* 144, 221-33.

**Miyazawa K., Shinozaki M., Hara T., Furuya T. & Miyazono K.** (2002) Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling. *Genes Cells* 7, 1191-204.

**Nagaraja A.K., Andreu-Vieyra C., Franco H.L., Ma L., Chen R., Han D.Y., Zhu H., Agno J.E., Gunaratne P.H., DeMayo F.J. & Matzuk M.M.** (2008) Deletion of Dicer in somatic cells of the female reproductive tract causes sterility. *Mol Endocrinol* 22, 2336-52.

**Navakanitworakul R., Hung W.T., Gunewardena S., Davis J.S., Chotigeat W. & Christenson L.K.** (2016) Characterization and Small RNA Content of Extracellular Vesicles in Follicular Fluid of Developing Bovine Antral Follicles. *Sci Rep* 6.

**Noferesti S.S., Sohel M.M.H., Hoelker M., Salilew-Wondim D., Tholen E., Looft C., Rings F., Neuhoft C., Schellander K. & Tesfaye D.** (2015) Controlled ovarian hyperstimulation induced changes in the expression of circulatory miRNA in bovine follicular fluid and blood plasma. *Journal of Ovarian Research* 8, 1-16.

**Portela V.M., Dirandeh E., Guerrero-Netro H.M., Zamberlam G., Barreta M.H., Goetten A.F. & Price C.A.** (2015) The role of fibroblast growth factor-18 in follicular atresia in cattle. *Biol Reprod* 92, 19.

**Regassa A., Rings F., Hoelker M., Cinar U., Tholen E., Looft C., Schellander K. & Tesfaye D.** (2011) Transcriptome dynamics and molecular cross-talk between bovine oocyte and its companion cumulus cells. *BMC Genomics* 12, 57.

**Revelli A., Delle Piane L., Casano S., Molinari E., Massobrio M. & Rinaudo P.** (2009) Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reprod Biol Endocrinol* 7, 1477-7827.

**Ro S., Song R., Park C., Zheng H., Sanders K.M. & Yan W.** (2007) Cloning and expression profiling of small RNAs expressed in the mouse ovary. *Rna* 13, 2366-80.

**Rodgers R.J. & Irving-Rodgers H.F.** (2010) Formation of the ovarian follicular antrum and follicular fluid. *Biol Reprod* 82, 1021-9.

**Salilew-Wondim D., Ahmad I., Gebremedhn S., Sahadevan S., Hossain M.D., Rings F., Hoelker M., Tholen E., Neuhoft C., Looft C., Schellander K. & Tesfaye D.** (2014) The expression pattern of microRNAs in granulosa cells of subordinate and dominant follicles during the early luteal phase of the bovine estrous cycle. *PLoS One* 9.

**Santonocito M., Vento M., Guglielmino M.R., Battaglia R., Wahlgren J., Ragusa M., Barbagallo D., Borzi P., Rizzari S., Maugeri M., Scollo P., Tatone C., Valadi H., Purrello M. & Di Pietro C.** (2014) Molecular characterization of exosomes and their microRNA cargo in human follicular fluid: bioinformatic analysis reveals that exosomal microRNAs control pathways involved in follicular maturation. *Fertil Steril* 102, 1751-61 e1.

**Schauer S.N., Sontakke S.D., Watson E.D., Esteves C.L. & Donadeu F.X.** (2013) Involvement of miRNAs in equine follicle development. *Reproduction* 146, 273-82.

**Sirotkin A.V., Kisova G., Brenaut P., Ovcharenko D., Grossmann R. & Mlynec M.** (2014) Involvement of microRNA Mir15a in control of human ovarian granulosa cell proliferation, apoptosis, steroidogenesis, and response to FSH. *Microna* 3, 29-36.

**Sirotkin A.V., Laukova M., Ovcharenko D., Brenaut P. & Mlynec M.** (2010) Identification of microRNAs controlling human ovarian cell proliferation and apoptosis. *J Cell Physiol* 223, 49-56.

**Sirotkin A.V., Ovcharenko D., Grossmann R., Laukova M. & Mlynec M.** (2009) Identification of microRNAs controlling human ovarian cell steroidogenesis via a genome-scale screen. *J Cell Physiol* 219, 415-20.

**Sohel M.M., Hoelker M., Noferesti S.S., Salilew-Wondim D., Tholen E., Looft C., Rings F., Uddin M.J., Spencer T.E., 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, e78505.

**Sontakke S.D., Mohammed B.T., McNeilly A.S. & Donadeu F.X.** (2014) Characterization of microRNAs differentially expressed during bovine follicle development. *Reproduction* 148, 271-83.

**Toms D., Xu S., Pan B., Wu D. & Li J.** (2015) Progesterone receptor expression in granulosa cells is suppressed by microRNA-378-3p. *Mol Cell Endocrinol* 399, 95-102.

**Tu F., Pan Z.X., Yao Y., Liu H.L., Liu S.R., Xie Z. & Li Q.F.** (2014) miR-34a targets the inhibin beta B gene, promoting granulosa cell apoptosis in the porcine ovary. *Genet Mol Res* 13, 2504-12.

**van den Hurk R. & Zhao J.** (2005) Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* 63, 1717-51.

**Wu S., Sun H., Zhang Q., Jiang Y., Fang T., Cui I., Yan G. & Hu Y.** (2015) MicroRNA-132 promotes estradiol synthesis in ovarian granulosa cells via translational repression of Nurr1. *Reprod Biol Endocrinol* 13, 015-0095.

**Xiao G.Y., Cheng C.C., Chiang Y.S., Cheng W.T., Liu I.H. & Wu S.C.** (2016) Exosomal miR-10a derived from amniotic fluid stem cells preserves ovarian follicles after chemotherapy. *Sci Rep* 6.

**Xu S., Linher-Melville K., Yang B.B., Wu D. & Li J.** (2011) Micro-RNA378 (miR-378) regulates ovarian estradiol production by targeting aromatase. *Endocrinology* 152, 3941-51.

**Yao G., Liang M., Liang N., Yin M., Lu M., Lian J., Wang Y. & Sun F.** (2014) MicroRNA-224 is involved in the regulation of mouse cumulus expansion by targeting Ptx3. *Mol Cell Endocrinol* 382, 244-53.

**Yin M., Wang X., Yao G., Lu M., Liang M., Sun Y. & Sun F.** (2014) Transactivation of microRNA-320 by microRNA-383 regulates granulosa cell functions by targeting E2F1 and SF-1 proteins. *J Biol Chem* 289, 18239-57.

**Zhang Q., Sun H., Jiang Y., Ding L., Wu S., Fang T., Yan G. & Hu Y.** (2013) MicroRNA-181a suppresses

mouse granulosa cell proliferation by targeting activin receptor IIA. *PLoS One* 8, 20.

**Zhou J., Liu J., Pan Z., Du X., Li X., Ma B., Yao W., Li Q. & Liu H.** (2015) The let-7g microRNA promotes follicular granulosa cell apoptosis by targeting transforming growth factor-beta type 1 receptor. *Mol Cell Endocrinol* 409, 103-12.

**Zuccotti M., Merico V., Cecconi S., Redi C.A. & Garagna S.** (2011) What does it take to make a developmentally competent mammalian egg? *Hum Reprod Update* 17, 525-40.

## Avanços e limitações da produção *in vitro* de embriões ovinos e caprinos

A. Menchaca<sup>1,3</sup>, N. Barrera<sup>1</sup>, P.C. dos Santos Neto<sup>1</sup>, F. Cuadro<sup>1</sup>, M. Crispo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Reproducción Animal Uruguay, Fundación IRAUy, Montevideo, Uruguay.

<sup>2</sup>Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación, Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay.

Título curto: Produção de embriões *in vitro* em ovinos e caprinos

### Resumo

Esta revisão sumariza os últimos avanços e as principais limitações para a implementação de programas de produção *in vitro* de embriões em ovinos e caprinos. Descrevemos a técnica de laparoscopia assistida para recuperação de oócitos e propomos novas ideias para a manipulação folicular visando aumentar a qualidade do oócito. A descrição mais detalhada da rotina em nosso laboratório para o processo *in vitro* de maturação oocitária, fertilização e cultivo de embrião é apresentada, com ênfase nos principais aspectos para sucesso da técnica. Protocolos para a transferência de embrião em tempo fixo (TETF) são propostos assim como o número ideal de embriões produzidos *in vitro* (PIV) a ser transferido por fêmea é discutido. Adicionalmente, apresentamos taxas de prenhez e de nascimento obtidas com TETF e embriões PIV criopreservados por vitrificação com métodos novos de volume mínimo. Em resumo, devido a importantes refinamentos da técnica de produção *in vitro* de embriões em ovinos e caprinos nos últimos anos, esta tecnologia está disponível para implementação em programas comerciais de melhoramento genético, para a produção de ovinos e caprinos por engenharia genética e para pesquisa básica em reprodução.

**Palavras-chave:** criopreservação; ovelha, cabra, LOPU, superovulação.

### Aspiração folicular por laparoscopia

O sucesso de programas de produção *in vitro* de embriões (PIVE) para finalidade de pesquisa ou aplicação industrial depende em grande parte da disponibilidade de um número contínuo de oócitos de boa qualidade. Apesar dos ovários de abatedouros representarem uma fonte rica em oócitos muito prática e barata para projetos de pesquisa, a aplicação desta tecnologia na indústria e nas criações requer a recuperação de oócitos de animais vivos. A aspiração folicular por laparoscopia (ovum pick-up por laparoscopia; LOPU) representa a melhor técnica disponível para a obtenção de oócitos de caprinos e ovinos, primeiramente descrita por Robin Tervit na Nova Zelândia e Hernan Baldassarre na Argentina nos início dos anos 90 (Tervit *et al.*, 1992; Baldassarre *et al.*, 1994). Esta abordagem apresenta a vantagem de eliminar os maus resultados observados diante da tradicional laparotomia, além da possibilidade de repetir o procedimento várias vezes na mesma fêmea, e possibilita a produção de descendentes de

animais pré-púberes (Baldassarre and Karatzas, 2004). LOPU é utilizada para recuperação de oócitos para a PIV convencional, mas também para a produção de zigotos para a geração de matrizes transgênicas (Baldassarre *et al.*, 2003b) ou para a propagação de animais transgênicos por transferência nuclear de célula somática (Baldassarre *et al.*, 2003a). Recentemente, esta técnica também foi proposta como uma ferramenta útil para apoiar a geração de ovinos e caprinos com genoma editado (por exemplo sistema CRISPR; Menchaca *et al.*, 2016).

Durante o procedimento de LOPU, o animal é contido sobre uma mesa padrão para laparoscopia sob anestesia geral. Em nosso laboratório, a anestesia geral é induzida com quetamina e diazepam i.v. e é mantida com anestesia inalatória com isoflurano. A técnica de LOPU foi descrita em detalhes por H. Baldassarre (Menchaca *et al.*, 2016), mas brevemente, consiste de um equipamento de laparoscopia com um telescópio de ângulo de 0° com 5 mm de diâmetro, dois sets de cânula e trocater de 5.5 mm (um para o laparoscópio e um para o fórceps), um set de trocater e cânula de 3.5-5 mm para a pipeta de aspiração, um fórceps atraumático para raspagem de 5 mm, um cabo de fibra óptica e uma fonte de luz. O set de aspiração de oócito consiste de um tubo coletor com o interior conectado por tubo a pipeta de aspiração e o exterior conectado por tubo a uma bomba de vácuo. A pipeta de aspiração consiste de uma agulha de bisel curto de 20G colada à ponta de um tubo de acrílico de 30 cm, com 3 mm de diâmetro externo e 1 mm de diâmetro interno. A superfície ovariana é exposta manipulando a fímbria com o fórceps em diferentes direções e os folículos são puncionados um a um utilizando-se a pipeta de aspiração. Para uma equipe treinada, o procedimento tem a duração de 15-20 min por doadora (inclusive a preparação) e a taxa de recuperação do complexo cópula-oócito (COC) gira em torno de 50 a 90%.

A possibilidade de utilização de fêmeas pré-púberes de 1-3 meses de idade como fonte de oócito é outra vantagem da técnica de LOPU, reduzindo o intervalo geracional e acelerando o processo de melhoramento genético (Paramio, 2010). Adicionalmente, a LOPU pode ser realizada na mesma fêmea com um intervalo de 4 dias entre as aspirações sem afetar a recuperação e qualidade oocitárias (Gibbons *et al.*, 2007). Estas duas possibilidades aumentam consideravelmente a capacidade de replicação de uma fêmea. A incidência de injúrias causadas ao ovário após sucessivas sessões de LOPU também foi estudada. Em geral, a maioria dos relatos não apontou lesões ovarianas severas que interfiram com a aspiração folicular, recuperação oocitária ou produção de embriões após 3 a 7 repetições de



tratamento hormonal e sessões de LOPU (Pierson *et al.*, 2004; Gibbons *et al.*, 2007; Teixeira *et al.*, 2011; Sanchez *et al.*, 2014). Outros autores relataram a presença de pequenas aderências em 30% das ovelhas após repetidas sessões de LOPU durante um período de 10 semanas (McEvoy *et al.*, 2006). Em nossa experiência, apesar de alguma aderência ou fibrose ser eventualmente encontrada em poucos animais após várias sessões de aspiração folicular, este fato não representa uma limitação relevante.

### Manipulação do crescimento folicular

Para se recuperar um grande número de COCs de boa qualidade por procedimento de LOPU, o status ovariano deve ser sincronizado e estimulado com gonadotrofinas. Para sincronização, diferentes protocolos foram utilizados em ovelhas e cabras e a maioria deles é utilizada em tratamentos de sincronização de estro, principalmente com dispositivos intravaginais de progesterona ou contendo progesterona (por exemplo: CIDR, esponjas). Normalmente os dispositivos são aplicados durante 9-11 dias junto com uma dose luteolítica de prostaglandina (PG) F2 $\alpha$  ou um análogo no início do tratamento com gonadotrofina. Após a sincronização, vários tratamentos para estimulação folicular foram propostos previamente à LOPU, sendo o mais popular o regime de injeções múltiplas de FSH e o conhecido como regime “oneshot”, que consiste em uma dose de FSH mais gonadotrofina coriônica equina (eCG) descrito por Baldassarre e colegas (Baldassarre *et al.*, 2002).

Diferentes estudos em ovelhas e cabras mostraram que oócitos maturados *in vitro* (IVM) obtidos por aspiração folicular apresentam competência oocitária mais baixa do que os maturados *in vivo* (Cognie *et al.*, 2003), sugerindo condições de IVM desfavoráveis, mas também baixa qualidade da população de oócitos obtida por aspiração. A competência oocitária é afetada pelo tamanho folicular do qual o COC é coletado (Crozet *et al.*, 1995) e também pela dinâmica da onda folicular, crescimento e status de dominância estudados em vacas (Adams *et al.*, 2008). O método ideal deve assegurar um pool homogêneo de folículos médios ou em crescimento (~4 mm) ou em fase estática contendo oócitos saudáveis, mas nunca em atresia tardia. Com isso em mente, recentemente testamos novas abordagens para controle do folículo previamente à LOPU em ovelhas. Previamente, descrevemos o protocolo Dia 0 para estímulo da primeira onda folicular, para superovulação em produção de embriões convencional ou programas MOET (Menchaca *et al.*, 2002, 2007, 2009, 2010). Este protocolo sincroniza a ovulação (definido como Dia 0 do ciclo) para induzir a primeira onda folicular 72 a 84 h após a remoção do dispositivo de progesterona e administração de eCG. No protocolo Dia 0 para programas de MOET, o FSH é administrado em várias doses (por exemplo 6 ou 8 doses) duas vezes ao dia sendo que a primeira dose é administrada 84 h após a remoção do dispositivo (ou seja, pouco após a ovulação), coincidindo com o recrutamento folicular da primeira onda. Recentemente, validamos este protocolo associado à LOPU. Neste caso, uma dose única de 80-100 mg de pFSH reconstituído em ácido sódico hialurônico (MAP-5, Vetoquinol) para liberação lenta foi dada no Dia 0

(84 h após a remoção do dispositivo). A LOPU foi realizada 72 h após a dose de FSH (no Dia 3). Dados preliminares mostraram maior número de folículos aspirados e oócitos coletados utilizando-se o protocolo Dia 0 com pFSH em MAP-5 quando comparado aquele obtido com ovelhas tratadas com FSH (Cuadro *et al.*; IRAUy, Montevideo, Uruguai; dados não publicados). Interessantemente, o efeito do pFSH em MAP-5 utilizado no protocolo de Dia 0 foi potencializado quando um dispositivo intravaginal de progesterona (DICO 0.3 g) foi inserido no Dia 0 (no dia da injeção de FSH) até o dia da LOPU. O desenvolvimento folicular na presença de alta progesterona aumentou significativamente a qualidade dos COCs, taxa de fertilização de oócito, e produção de embrião (Cuadro *et al.*; IRAUy, Montevideo, Uruguai; dados não publicados). A adição de um dispositivo intravaginal de liberação de progesterona durante o desenvolvimento folicular parece ser recomendado durante a indução da primeira onda.

### Maturação *in vitro*

O procedimento para produção *in vitro* de embriões em ovelhas e cabras foi estudado extensivamente e também descrito em revisões prévias (Cognie *et al.*, 2004; Paramio, 2010; Souza-Fabjan *et al.*, 2014; Paramio and Izquierdo, 2014, 2016). Por esta razão, este documento descreve as principais características e pontos fracos deste processo.

Sobre IVM, provavelmente a maioria dos esforços focaram na melhoria das condições dos meios de cultivo *in vitro*. Neste sentido, uma variedade de meios de cultivo foram estudados, propostos e adotados. Em geral, a maioria dos laboratórios utilizam TCM199 suplementados com diferentes componentes para este estágio. Este meio pode ser suplementado com gonadotrofinas como LH, FSH ou uma combinação de ambos desde que aumente o número de oócitos que atinjam MII e aumente a taxa de embriões viáveis (Moor e Trounson, 1977). Adicionalmente a suplementação com cisteína age como um precursor de glutatona, aumentando a maturação oocitária e claramente demonstrado em várias espécies como ovinos e caprinos (de Matos *et al.*, 2002; Cognie *et al.*, 2003). Estradiol é outro componente a ser incluso no meio de maturação uma vez que está presente no fluido do folículo pré-ovulatório. Entretanto seu efeito é controverso (Guler *et al.*, 2000) e parece ser dependente da presença/ausência de outros componentes. Apesar de estar presente em menor concentração do que no fluido folicular, estradiol também compõe o soro ovino/caprino, normalmente adicionado ao meio de IVM. Soro de estro ovino/caprino é rotineiramente utilizado em nosso laboratório, apesar de sua variabilidade ser bem conhecida e cada partida contém diferentes concentrações de metabólitos, fatores de crescimento, hormônios, proteínas, lipídeos, etc, sendo difícil a padronização das condições de cultura. Adicionalmente, como composto biológico, o soro representa um risco sanitário que pode ser relevante para aplicação comercial em PIVE. Por outro lado, meios para IVM quimicamente definidos apresentam maior repetibilidade e são mais seguros do ponto de vista sanitário, merecem investigação futura, validação e adoção. Um conhecimento mais aprofundado do papel do meio folicular

na maturação oocitária, a função dos seus componentes e a interação entre o oócito e as células do cumulus, ajudarão a melhorar a PIVE no futuro.

Provavelmente, existem tantas variações no meio de cultivo de embriões quanto laboratórios de PIVE no mundo. Em nosso laboratório o meio de maturação é composto por TCM-199 suplementado com soro de estro ovino, FSH, LH, cisteamina e antibióticos. Oócitos de qualidade excelente ou boa são oincubados em grupos de 25-30 por gota de 100 µl do meio de IVM sob óleo mineral por 24 h a 39°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Normalmente, mais de 90% dos oócitos nestas condições encontram-se em MII.

### **Fertilização *in vitro* (FIV)**

Existem estratégias diferentes para preparar o semen para a FIV em ovinos/caprinos, similares aos utilizados em bovinos. Espermatozoides com motilidade são obtidos por gradient de Percoll ou pelo método swim-up e adicionados aos COCs após MIV no meio para fertilização. A capacitação espermática normalmente é alcançada com a adição de heparina ao meio de fertilização e durante a preparação do semen antes da FIV (ou durante o swim-up). Ainda, a ionomicina foi testada para melhorar as taxas de fertilização em caprinos com bons resultados (Urdaneta *et al.*, 2004).

Alguns laboratórios removem as células do cumulus no final da MIV pouco antes da FIV (Cognie *et al.*, 2004). O efeito das células do cumulus durante a FIV foi estudado em ovinos (Menchaca *et al.*, 2012) e caprinos (Souza *et al.*, 2013). Relatamos um efeito positivo das células do cumulus durante a FIV, com maior taxa de clivagem (85 vs. 77%;  $P < 0,05$ ) e taxa de desenvolvimento (37 vs. 17%;  $P < 0,05$ ) quando as células do cumulus eram mantidas durante a FIV do que quando removidas antes da FIV, respectivamente ( $P < 0,05$ ). Resposta similar foi relatada em caprinos com maior recuperação de (48 vs. 37%;  $P < 0,05$ ) quando as células do cumulus foram mantidas durante a FIV (Souza *et al.*, 2013). Após testar vários protocolos e componentes, utilizamos em nosso laboratório um fluido sintético de oviduto (SOF) suplementado com heparina, hipotaurina e soro ovino de estro, tanto para o meio de FIV quanto para preparação de espermatozoides. Os espermatozoides são capacitados por swim-up com tempo de incubação de 15 min, e uma dose inseminante de  $1 \times 10^6$  esperma total por gota de 100 µl de SOF sob óleo mineral contendo 20-30 oócitos. Oócitos e espermatozoides são co-incubados por 18 a 22 h a 39°C em atmosfera umidificada contendo 5% CO<sub>2</sub>. Trabalhar sob estas condições com semen congelado, processando mais de 6.000 COCs durante o ano passado, a taxa de clivagem em 48 h da inseminação alcançou 80 a 90% em mais de 80% das sessões de FIV.

### **Cultura *in vitro* (CIV)**

Quatro eventos são cruciais durante PIVE: clivagem, ativação do genoma embrionário (8-16 cells), compactação da mórula, e formação do blastocisto acompanhada pela formação da massa celular interna de trofoectoderma

(Lonergan *et al.*, 2003). Estes eventos são afetados negativamente por condições de cultivo inadequadas e muitas estratégias foram delineadas para mimetizar o trato feminino em laboratório, com abordagens que incluem cultura *in vivo* de zigotos no oviduto de receptoras temporárias, co-cultura *in vitro* com células somáticas de suporte, e meios semi-definidos para seguir os requerimentos do embrião (Paramio e Izquierdo, 2016).

Meios de cultivo diferentes foram testados em embriões de pequenos ruminantes; entretanto, o meio SOF foi descrito primeiramente na década de 70 (Tervit *et al.*, 1972) e é o mais utilizado em laboratórios para cultivar embriões ovinos e foi adaptado a muitas espécies inclusive bovinos, suínos e caprinos. Em nossa experiência, trocar ou renovar o meio CIV no Dia 3 após inseminação melhorou a recuperação de blastocistos no Dia 6 de 33,6% (78/232) para 42,0% (102/243), ( $P < 0,05$ ), provavelmente pela adição de nutrientes frescos e remoção de metabólitos tóxicos (Vilariño *et al.*, 2012). Normalmente os embriões são mantidos em grupos durante CIV para melhorar a recuperação de blastocistos do que quando cultivados individualmente (Gardner e Lane, 1993). Em nosso laboratório, CIV é realizada em grupos de 20-30 embriões em gotas de 100 µl utilizando SOF sob óleo mineral suplementado com BSA, aminoácidos essenciais e não essenciais e antibióticos, a 39°C em 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> e 90% N<sub>2</sub>. A taxa de blastocisto esperada sob estas condições é aproximadamente 30 a 40% (número de blastocistos no Dia 6 derivados de COCs em FIV).

### **Transferência de embriões PIV**

Os resultados da transferência de embriões podem ser afetados pela qualidade do embrião e por fatores extrínsecos e intrínsecos da receptora (raça, idade, estatus reprodutivo, nutrição e saúde). Em relação à qualidade do embrião, a taxa de sobrevivência aumenta de acordo com o estágio de desenvolvimento do embrião para aqueles derivados *in vivo* (Bari *et al.*, 2003). Apesar de informações sobre PIV de embriões em pequenos ruminantes ser escassa, a conveniência da transferência no estágio de blastocisto ao invés de mórula é largamente aceita. Em relação ao componente materno, a fêmea receptora deve prover uma função luteínica competente com progesterone suficiente assim como ambiente uterino apropriado para o desenvolvimento do embrião e placentação. A atividade luteínica é determinada, ao menos em parte, pelo tratamento aplicado para sincronizar a ovulação. Neste sentido, os protocolos hormonais tradicionais consistem de tratamento com progesterona ou progestágenos normalmente administrados na forma de dispositivos intravaginais por 10 a 14 (caprinos e ovinos, respectivamente) e associados à administração i.m. de eCG no momento da remoção do dispositivo e uma dose luteolítica de PGF2alfa em caprinos. Alternativamente, protocolos curtos utilizando tratamento com progesterona por 6-7 dias tem sido utilizados em ovinos com resultados similares aos de tratamentos convencionais (Menchaca *et al.*; IRAUy, Montevideo, Uruguai; dados não publicados). Utilizando este protocolo para sincronização do estro, ocorre em média aproximadamente 90% de estro e

ovulação em 30 e 60 h da remoção do dispositivo intravaginal, respectivamente (Menchaca e Rubianes, 2004). Em nossa rotina com ovinos o dispositivo intravaginal é inserido no Dia 0 e removido na noite do Dia 6 junto com PGF2 $\alpha$  e 300 UI de eCG, e os machos vasectomizados são introduzidos no rebanho de 24 a 48h após a remoção do dispositivo. Transferência de embrião em tempo fixo (TETF) é realizada no Dia 15 (ou seja, 8,5 dias depois da remoção do dispositivo e ao redor de 7 dias após o início do estro) para transferir os blastocisto de dia 6 (ou seja 7 dias após a aspiração folicular). TETF é realizada apenas em fêmeas marcadas (aquelas montadas pelos machos) e a transferência de embriões é realizada no corno ipsilateral ao corpo lúteo por laparoscopia. A taxa esperada de prenhez é de aproximadamente 50-60% quando a TETF é realizada com embriões frescos. Alternativamente, a TETF pode ser realizada no oviduto no Dia 10, ou seja, 3,5 dias após a remoção do dispositivo e um dia após a FIV e ovulação.

O número recomendado de embriões PIV transferidos por receptora é de 1 ou 2 quando a TETF é realizada com blastocistos, dependendo da espécie, raça e Sistema de produção. Em nossa experiência, quando se transferem 2 embriões ao redor de 30% das ovelhas ficam prenhes de gêmeos. Em um experiment recente de TETF conduzido com 240 embriões PIV em receptoras Merino (uma raça que apresenta em torno de 1,1 de prolificidade), a taxa de prenhez foi de aproximadamente 10% maior quando 2 embriões foram transferidos ( $P < 0,05$ ). Entretanto a taxa de parto foi 20% mais baixa em gêmeos ( $P < 0,05$ ) e a sobrevivência do neonato foi muito maior com gestações únicas (ao redor de 30%;  $P < 0,05$ ) (Menchaca *et al.*; IRAUy, Montevideo, Uruguai; dados não publicados). Por esta razão, em condições de criação como no Uruguai e Argentina, o objetivo deveria ser atingir um carneiro nascido vivo por ovelha, o que assegura um peso ao nascimento e taxa de sobrevivência do neonato desejáveis.

### **Estamos prontos para dispensar a transferência de embriões frescos?**

Uma das maiores dificuldades da tecnologia de embriões *in vitro* em criações é a baixa criotolerância dos embriões produzidos em comparação com embriões derivados *in vivo* (IVD). Por esta razão, as PIVE são conduzidas com embriões frescos, as quais necessitam de um número grande e contínuo de receptoras prontas para uso em nos programas de produção em larga escala de PIVE. Neste context, a criopreservação de embriões deve ser considerada.

Métodos convencionais de congelamento lento foram desenvolvidos para embriões IVD, e de fato, são largamente utilizados em programas comerciais de MOET em ovinos e caprinos. Em geral, este método convencional resulta em taxas de sobrevivência muito baixas quando aplicado a embriões PIV (Massip, 2001). Embriões produzidos *in vitro* apresentam algumas diferenças intrínsecas com embriões IVD que afetam negativamente a criotolerância, associados com extensivo acúmulo de lipídeos, metabolismo alterado e mudanças em características estruturais e físicas, entre outras (Seidel, 2006). Por esta razão métodos de vitrificação

foram estudados em paralelo com o desenvolvimento da tecnologia de PIVE em diferentes espécies, inclusive espécies em risco de extinção, mas também necessários em reprodução assistida em humanos para a criopreservação de oócitos e embriões. Muitos estudos foram conduzidos para testar métodos de vitrificação para embriões de pequenos ruminantes (Traldi *et al.*, 1999; Dattena *et al.*, 2000; Baril *et al.*, 2001; Martínez *et al.*, 2006; Gibbons *et al.*, 2011; Morato *et al.*, 2011). Em geral, a efetividade da técnica de vitrificação depende de vários fatores como o estágio de desenvolvimento do embrião *embryo*, origem do embrião (*in vivo* ou *in vitro*), volume e taxa de resfriamento, meio crioprotetor, e a espécie, entre outros (Arav, 2014).

Durante os últimos anos, novos conceitos relativos à vitrificação embasaram o desenvolvimento de métodos de volume mínimo, reduzindo o volume dos crioprotetores e aumentando as taxas de resfriamento e e aquecimento (Yavin and Arav, 2007). Nós conduzimos uma série de experimentos com embriões ovinos para melhorar a taxa de sobrevivência após a criopreservação utilizando a vitrificação com o método de volume mínimo (Cryotop e Spatula MVD). Estes dois métodos de vitrificação foram previamente relatados para embriões humanos (Kuwayama, 2007) e murinos (Tsang e Chow, 2009), respectivamente. Em um estudo recente, encontramos que embriões ovinos PIV e vitrificados com métodos de volume mínimo como Cryotop e Spatula MVD demonstraram taxas de sobrevivência e desenvolvimento aceitáveis (dos Santos Neto *et al.*, 2015). Em outro estudo mais recente ainda (dos Santos Neto *et al.*; IRAUy, Montevideo, Uruguai; dados não publicados), transferimos 437 embriões para comparar embriões ovinos submetidos a vitrificação com Cryotop ou Spatula MVD, ou congelamento convencional. Como esperado, independentemente do método de congelamento, o estabelecimento da gestação foi maior em embriões IVD do que PIV (68,8 vs. 22,3%,  $P < 0,05$ ). Interessantemente, as receptoras que receberam embriões IVD ou PIV tiveram maior taxa de concepção ( $P < 0,05$ ) quando a vitrificação foi realizada com o método Cryotop (77,8 e 55,1%) do que Spatula MVD (59,3 e 18,4%) ou congelamento convencional (64,9 e 11,1%, respectivamente). Portanto, nestas condições, o método Cryotop alcançou >50% de fêmeas prenhes transferidas com embriões PIV. As perdas gestacionais entre os 30 dias de gestação e o parto tendeu a ser maior para embriões PIV do que IVD (14,9 vs. 5,8%;  $P = 0,08$ ), sem efeito do método de criopreservação (dos Santos Neto *et al.*; IRAUy, Montevideo, Uruguai; dados não publicados). Entretanto, vitrificação com o método de volume mínimo parece ser interessante para implementação futura em programas de PIVE em ovinos. Todavia, alguns refinamentos ainda são necessários para se alcançar um método simples e robusto a ser aplicado a campo, e então, finalmente se beneficiar com as vantagens da criopreservação.

### **Considerações finais**

O trabalho cumulativo alcançado durante muitos anos a partir da contribuição de muitos pesquisadores, brevemente sumarizado nesta revisão, transformou a PIVE

emu ma ferramenta de suporte para animais de produção, engenharia genética, e pesquisa. Entretanto, algumas limitações precisam ser resolvidas para melhorar os resultados e simplificar a técnica. A competência oocitária é variável e deveria ser melhorada, principalmente controlando a a dinâmica folicular para oferecer mais oócitos saudáveis para LOPU. Maturação de COCs *in vitro*, cultivo e fertilização de embriões são técnicas bem padronizadas, mas ainda requerem uma sintonia fina uma vez que a maioria dos embriões morre durante o processo antes da fase de hatching. A transferência de embriões e manejo de receptoras pode ser melhorado por TETF e protocolos padronizados para sincronização ovariana, como porposto nesta revisão. Adicionalmente, a transferência de embriões frescos é um fator limitante fpara troca internacional de material genético e requer disponibilidade continua de receptoras. Neste sentido, métodos novos de volume mínimo para vitrificação parecem atrativos pois permitem taxas de concepção aceitáveis em nossas condições. Em resumo, apesar de alguns desafios ainda estarem presents em PIVE em ovinos e caprinos, melhoras substanciais foram alcançadas durante os últimos anos e esta tecnologia está disponível para ser aplicada a campo.

### Referências

Durante os últimos anos, novos conceitos relativos à vitrificação embasaram o desenvolvimento de métodos de volume mínimo, reduzindo o volume dos crioprotetores e aumentando as taxas de resfriamento e e aquecimento (Yavin and Arav, 2007). Nós conduzimos uma série de experimentos com embriões ovinos para melhorar a taxa de sobrevivência após a criopreservação utilizando a vitrificação com o método de volume mínimo (Cryotop e Spatula MVD). Estes dois métodos de vitrificação foram previamente relatados para embriões humanos (Kuwayama, 2007) e murinos (Tsang e Chow, 2009), respectivamente. Em um estudo recente, encontramos que embriões ovinos PIV e vitrificados com métodos de volume mínimo como Cryotop e Spatula MVD demonstraram taxas de sobrevivência e desenvolvimento aceitáveis (dos Santos Neto *et al.*, 2015). Em outro estudo mais recente ainda (dos Santos Neto *et al.*; IRAUy, Montevideo, Uruguai; dados não publicados), transferimos 437 embriões para comparar embriões ovinos submetidos a vitrificação com Cryotop ou Spatula MVD, ou congelamento convencional. Como esperado, independentemente do método de congelação, o estabelecimento da gestação foi maior em embriões IVD do que PIV (68,8 vs. 22,3%,  $P < 0,05$ ). Interessantemente, as receptoras que receberam embriões IVD ou PIV tiveram maior taxa de concepção ( $P < 0,05$ ) quando a vitrificação foi realizada com o método Cryotop (77,8 e 55,1%) do que Spatula MVD (59,3 e 18,4%) ou congelamento convencional (64,9 e 11,1%, respectivamente). Portanto, nestas condições, o método Cryotop alcançou >50% de fêmeas prenhes transferidas com embriões PIV. As perdas gestacionais entre os 30 dias de gestação e o parto tendeu a ser maior para embriões PIV do que IVD (14,9 vs. 5,8%;  $P = 0,08$ ), sem efeito do método de criopreservação (dos Santos Neto *et al.*; IRAUy, Montevideo, Uruguai; dados não

publicados). Entretanto, vitrificação com o método de volume mínimo parece ser interessante para implementação futura em programas de PIVE em ovinos. Todavia, alguns refinamentos ainda são necessários para se alcançar um método simples e robusto a ser aplicado a campo, e então, finalmente se beneficiar com as vantagens da criopreservação.

### Considerações finais

O trabalho cumulativo alcançado durante muitos anos a partir da contribuição de muitos pesquisadores, brevemente sumarizado nesta revisão, transformou a PIVE em uma ferramenta de suporte para animais de produção, engenharia genética, e pesquisa. Entretanto, algumas limitações precisam ser resolvidas para melhorar os resultados e simplificar a técnica. A competência oocitária é variável e deveria ser melhorada, principalmente controlando a a dinâmica folicular para oferecer mais oócitos saudáveis para LOPU. Maturação de COCs *in vitro*, cultivo e fertilização de embriões são técnicas bem padronizadas, mas ainda requerem uma sintonia fina uma vez que a maioria dos embriões morre durante o processo antes da fase de hatching. A transferência de embriões e manejo de receptoras pode ser melhorado por TETF e protocolos padronizados para sincronização ovariana, como porposto nesta revisão. Adicionalmente, a transferência de embriões frescos é um fator limitante fpara troca internacional de material genético e requer disponibilidade continua de receptoras. Neste sentido, métodos novos de volume mínimo para vitrificação parecem atrativos pois permitem taxas de concepção aceitáveis em nossas condições. Em resumo, apesar de alguns desafios ainda estarem presents em PIVE em ovinos e caprinos, melhoras substanciais foram alcançadas durante os últimos anos e esta tecnologia está disponível para ser aplicada a campo.

### Referências

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

Arav A. 2014. Cryopreservation of oocytes and embryos. *Theriogenology*, 81:96-102.

Baldassarre H, de Matos DG, Furnus CC, Castro TE, Cabrera Fischer EI. 1994. Technique for efficient recovery of sheep oocytes by laparoscopic folliculocentesis. *Anim Reprod Sci*, 35:145-150.

Baldassarre H, Wang B, Kafidi N, Keefer C, Lazaris A, Karatzas C. 2002. Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and in vitro embryo production technologies. *Theriogenology*, 57:275-284.

Baldassarre H, Keefer C, Wang B, Lazaris A, Karatzas CN. 2003a. Nuclear transfer in goats using in vitro matured oocytes recovered by laparoscopic ovum pick-up. *Cloning Stem Cells*, 5:279-285.

Baldassarre H, Wang B, Kafidi N, Gauthier M, Neveu N, Lapointe J, Sneek L, Leduc M, Duguay F, Zhou JF, Lazaris A, Karatzas CN. 2003b. Production of

transgenic goats by pronuclear microinjection of in vitro produced zygotes derived from oocytes recovered by laparoscopy. *Theriogenology*, 59:831-839.

**Baldassarre H, Karatzas CN.** 2004. Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. *Anim Reprod Sci*, 82/83:255-266.

**Bari F, Khalid M, Haresign W, Murray A, Merrell B.** 2003. Factors affecting the survival of sheep embryos after transfer within a MOET program. *Theriogenology*, 59:1265-1275.

**Baril G, Traldi AL, Cognie Y, Leboeuf B, Beckers JF, Mermillod P.** 2001. Successful direct transfer of vitrified sheep embryos. *Theriogenology*, 56:299-305.

**Cognie Y, Baril G, Poulin N, Mermillod P.** 2003. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*, 59:171-188.

**Cognie Y, Poulin N, Locatelli Y, Mermillod P.** 2004. State-of-the-art production, conservation and transfer of in-vitro-produced embryos in small ruminants. *Reprod Fertil Dev*, 16:437-445.

**Crozet N, Ahmed-Ali M, Dubos MP.** 1995. Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture in vitro. *J Reprod Fertil*, 103:293-298.

**Dattena M, Ptak G, Loi P, Cappai P.** 2000. Survival and viability of vitrified in vitro and in vivo produced ovine blastocysts. *Theriogenology*, 53:1511-1519.

**de Matos DG, Gasparrini B, Pasqualini SR, Thompson JG.** 2002. Effect of glutathione synthesis stimulation during in vitro maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. *Theriogenology*, 57:1443-1451.

**dos Santos Neto PC, Vilarino M, Barrera N, Cuadro F, Crispo M, Menchaca A.** 2015. Cryotolerance of Day 2 or Day 6 in vitro produced ovine embryos after vitrification by Cryotop or Spatula methods. *Cryobiology*, 70:17-22.

**Gardner DK, Lane M.** 1993. Embryo culture systems. In: Gardner DK, Trounson AO (Ed.). *Handbook of In Vitro Fertilization*. Boca Raton, FL: CRC Press. pp. 84-105.

**Gibbons A, Pereyra Bonnet F, Cueto MI, Catala M, Salamone DF, Gonzalez-Bulnes A.** 2007. Procedure for maximizing oocyte harvest for in vitro embryo production in small ruminants. *Reprod Domest Anim*, 42:423-426.

**Gibbons A, Cueto MI, Pereyra Bonnet F.** 2011. A simple vitrification technique for sheep and goat embryo cryopreservation. *Small Rumin Res*, 95:61-64.

**Guler A, Poulin N, Mermillod P, Terqui M, Cognie Y.** 2000. Effect of growth factors, EGF and IGF-I, and estradiol on in vitro maturation of sheep oocytes. *Theriogenology*, 54:209-218.

**Kuwayama M.** 2007. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology*, 67:73-80.

**Loneragan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Fair T, Boland MP.** 2003. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reprod Domest Anim*, 38:259-267.

**Martínez AG, Valcárcel A, Furnus CC, de Matos DG, Iorio G, de las Heras MA.** 2006. Cryopreservation of

in vitro-produced ovine embryos. *Small Rumin Res*, 63:288-296.

**Massip A.** 2001. Cryopreservation of embryos of farm animals. *Reprod Domest Anim*, 36:49-55.

**McEvoy TG, Alink FM, Moreira VC, Watt RG, Powell KA.** 2006. Embryo technologies and animal health - consequences for the animal following ovum pick-up, in vitro embryo production and somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology*, 65:926-942.

**Menchaca A, Pinczak A, Rubianes E.** 2002. Follicular recruitment and ovulatory response to FSH treatment initiated on Day 0 or Day 3 postovulation in goats. *Theriogenology*, 58:1713-1721.

**Menchaca A, Rubianes E.** 2004. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reprod Fertil Dev*, 16:403-413.

**Menchaca A, Vilarino M, Crispo M, Pinczak A, Rubianes E.** 2007. Day 0 protocol: superstimulatory treatment initiated in the absence of a large follicle improves ovarian response and embryo yield in goats. *Theriogenology*, 68:1111-1117.

**Menchaca A, Vilarino M, Pinczak A, Kmaid S, Saldana JM.** 2009. Progesterone treatment, FSH plus eCG, GnRH administration, and Day 0 Protocol for MOET programs in sheep. *Theriogenology*, 72:477-483.

**Menchaca A, Vilarino M, Crispo M, de Castro T, Rubianes E.** 2010. New approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants. *Reprod Fertil Dev*, 22:113-118.

**Menchaca A, Vilariño M, dos Santos Neto PC, Wijma R, Crispo M.** 2012. Cumulus cells are involved in oocyte maturation and fertilization in vitro produced ovine embryos. *Reprod Fertil Dev*, 47(4).

**Menchaca A, Anegón I, Whitelaw CB, Baldassarre H, Crispo M.** 2016. New insights and current tools for genetically engineered (GE) sheep and goats. *Theriogenology*, 86:160-169.

**Moor RM, Trounson AO.** 1977. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes in vitro and their subsequent developmental capacity. *J Reprod Fertil*, 49:101-109.

**Morato R, Romaguera R, Izquierdo D, Paramio MT, Mogas T.** 2011. Vitrification of in vitro produced goat blastocysts: effects of oocyte donor age and development stage. *Cryobiology*, 63:240-244.

**Paramio MT.** 2010. In vivo and in vitro embryo production in goats. *Small Rumin Res*, 89:144-148.

**Paramio MT, Izquierdo D.** 2014. Current status of in vitro embryo production in sheep and goats. *Reprod Domest Anim*, 49(suppl. 4):37-48.

**Paramio MT, Izquierdo D.** 2016. Recent advances in in vitro embryo production in small ruminants. *Theriogenology*, 86:152-159.

**Pierson J, Wang B, Neveu N, Sneek L, Côté F, Karatzas CN, Baldassarre H.** 2004. Effects of repetition, interval between treatments and season on the results from laparoscopic ovum pick-up in goats. *Reprod Fertil Dev*, 16:795-799.

**Sanchez DJD, Melo CHS, Souza-Fabjan JMG, Sousa FC, Rocha AA, Campelo IS, Teixeira DIA, Pereira**

**AF, Melo LM, Freitas VJF.** 2014. Repeated hormonal treatment and laparoscopic ovum pick-up followed by in vitro embryo production in goats raised in the tropics. *Livest Sci*, 165:217-222.

**Seidel GE Jr.** 2006. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology*, 65:228-235.

**Souza JM, Duffard N, Bertoldo MJ, Locatelli Y, Corbin E, Fatet A, Freitas VJ, Mermillod P.** 2013. Influence of heparin or the presence of cumulus cells during fertilization on the in vitro production of goat embryos. *Anim Reprod Sci*, 138:82-89.

**Souza-Fabjan JM, Panneau B, Duffard N, Locatelli Y, Figueiredo JR, Freitas VJ, Mermillod P.** 2014. *In vitro* production of small ruminant embryos: late improvements and further research. *Theriogenology*, 81:1149-1162.

**Teixeira PP, Padilha LC, Oliveira ME, Motheo TF, Silva AS, Barros FF, Coutinho LN, Flores FN, Lopes MC, Bandarra MB, Silva MA, Vasconcelos RO, Rodrigues LF, Vicente WR.** 2011. Laparoscopic ovum collection in sheep: gross and microscopic evaluation of the ovary and influence on oocyte production. *Anim Reprod Sci*, 127:169-175.

**Tervit HR, Whittingham DG, Rowson LE.** 1972. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J Reprod Fertil*, 30:493-497.

**Tervit HR, Smith JF, McGowan LT, Wells RW, Parr J.** 1992. Laparoscopic recovery of oocytes from sheep. *Proc Aust Soc Reprod Biol*, 24:26.

**Traldi AS, Leboeuf B, Cognié Y, Poulin N, Mermillod P.** 1999. Comparative results of in vitro and in vivo survival of vitrified in vitro produced goat and sheep embryos. *Theriogenology*, 51:175. (abstract).

**Tsang WH, Chow KL.** 2009. Mouse embryo cryopreservation utilizing a novel high-capacity vitrification spatula. *Biotechniques*, 46:550-552.

**Urdaneta A, Jimenez AR, Paramio MT, Izquierdo D.** 2004. Cysteamine, glutathione and ionomycin treatments improve in vitro fertilization of prepubertal goat oocytes. *Zygote*, 12:277-284.

**Vilariño M, Crispo M, dos Santos-Neto PC, Wijma R, Menchaca A.** 2012. The effect of culture medium changes on in vitro production of sheep embryos. *Reprod Domest Anim*, 47:1806.

**Yavin S, Arav A.** 2007. Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. *Theriogenology*, 67:81-89.

## Sistemas de cultivo *in vitro*: quão longe estamos das condições ideais?

C. Wrenzycki

Clinic for Veterinary Obstetrics, Gynecology and Andrology of Large and Small Animals; Chair of Molecular Reproductive Medicine, Clinic for Veterinary Obstetrics, Gynecology and Andrology; Faculty of Veterinary Medicine,

**Título curto:** Sistemas de cultivo *in vitro*

Autor para correspondência: [Wrenzycki@vetmed.uni-giessen.de](mailto:Wrenzycki@vetmed.uni-giessen.de); Justus-Liebig-University Giessen, Frankfurter Str. 106, 35392 Giessen, Germany; Phone number +49 641 9938770; Fax number +49 641 9938709

### Resumo

Nas últimas décadas na produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos foi significativamente melhorada. Entretanto, embriões gerados *in vitro* ainda diferem dos seus homólogos produzidos *in vivo*. Os embriões devem adaptar-se a vários microambientes nos estágios de pré-implantação. Consequentemente, a manutenção ou mimetização *in vitro* da situação *in vivo* auxiliará a melhorar a qualidade e competência de desenvolvimento do embrião.

### Introdução

O nascimento do primeiro bezerro por FIV, a partir de um oócito maturado *in vivo*, em 1981 (Brackett et al., 1982) e a descoberta da heparina como agente de capacitação espermática em touros em 1986 (Parrish et al., 1986) foram os dois principais eventos para o início de uma era de intensa pesquisa que resultou em eficientes sistemas de produção *in vitro* (PIV) de embriões na fase de pré-implantação, incluindo maturação *in vitro* (MIV) do oócito até a metáfase II, fertilização *in vitro* (FIV), e subsequente cultura *in vitro* (CIV) de embriões até o estágio de blastocisto. Os primeiros bezerros produzidos inteiramente por MIV-FIV-CIV nasceram em 1987 (Fukuda et al. 1990).

Outro marco foi o desenvolvimento da aspiração transvaginal de oócitos guiada por ultrassom em humanos e a utilização da técnica em bovinos em 1988 (Pieterse et al. 1988). A atual tecnologia de OPU (ovum pick up)/PIV de oócitos imaturos originários de vacas vivas pode ser rotineiramente realizada duas vezes por semana por um período de tempo prolongado, sem quaisquer efeitos prejudiciais de longo prazo sobre a fertilidade da vaca doadora (Chastant-Maillard et al. 2003). Foram realizadas tentativas de combinar a OPU com a ultrassonografia com Doppler colorido, que é uma técnica não invasiva útil na avaliação da função vascular ovariana, permitindo uma observação visual do fluxo sanguíneo em uma área delimitada na parede dos folículos pré-ovulatórios (Brännström et al. 1998). A determinação do fluxo sanguíneo de cada um dos folículos pré-ovulatórios antes da aspiração folicular para a FIV fornece informações importantes sobre o ambiente intrafolicular e pode-se prever a competência de desenvolvimento do oócito correspondente (Coulam et al. 1999; Huey et al. 1999). Em bovinos, demonstrou-se que o intervalo de tempo entre as sessões de OPU tiveram um efeito sobre a qualidade dos oócitos e

embriões em nível molecular, ao passo que diferenças no fluxo sanguíneo perifolicular não influenciaram (Hanstedt et al. 2010). Um aumento do suprimento sanguíneo para determinado folículo parece estar associado com a taxa de crescimento folicular, enquanto que uma redução parece estar estreitamente relacionada com a atresia folicular (Acosta et al. 2003; Acosta 2007). Em conjunto, esses resultados demonstram que a OPU pode ser considerada uma técnica madura e grandes melhorias nessa tecnologia e seus resultados não devem ser esperadas em um futuro próximo. Atualmente, a aplicação de PIV combinada com a "ovum pick up" (OPU) de doadoras valiosas está aumentando (mais uma vez) devido ao desenvolvimento de estratégias de melhoramento baseadas com seleção genômica utilizando chips de SNPs ("single nucleotide polymorphisms"). Dependendo do chip utilizado, milhares desses SNPs podem ser analisados, mesmo em uma biópsia de um embrião. Essa tecnologia está se tornando rotineira para seleção genômica (SG) em bovinos (Ponsart et al. 2014).

No que diz respeito à eficiência da PIV, aproximadamente 80-90% dos oócitos imaturos de bovinos são submetidos a maturação nuclear *in vitro*, cerca de 80% passam por fertilização, 30-40% se desenvolvem ao estágio de blastocisto, e por volta de 50% dos embriões transferidos se estabelecem e a gestação é mantida (Galli et al. 2014; Loneragan et al. 2016; Wrenzycki et al. 2007).

### MIV

Complexos cumulus-oócitos (CCOs) coletados de ovários de animais abatidos ou eutanasiados ou de animais vivos por OPU (ovum pick-up) exigem maturação *in vitro* (MIV), uma vez que encontram-se no estágio de vesícula germinal (VG). A maturação envolve uma série de eventos que começam na vida fetal com o início da meiose. Ao nascer, os oócitos permanecem na fase de diplóteno (estágio de vesícula germinativa, GV). Após a puberdade, quando são expostos às ondas pré-ovulatórias de LH e FSH os oócitos avançam até a metáfase II, fase em que são ovulados (Monniaux et al. 2014). Além disso, condições ótimas para as células do cumulus que circundam o oócito devem ser consideradas, uma vez que existe uma complexa comunicação bidirecional entre estes dois tipos de células (Gilchrist 2011; Monniaux 2016).

A maturação adequada do oócito para a metáfase II é um pré-requisito para a fertilização e desenvolvimento na fase de pré-implantação. É possível alcançar taxas de

blastocisto de até 70% caso oócitos maturados *in vivo* sejam utilizados. Em contraste, se os oócitos são maturados *in vitro*, as taxas de blastocisto são apenas metade daquelas obtidas com oócitos maturados *in vivo*. Este sucesso limitado pode ser atribuído à população heterogênea de oócitos que é normalmente obtida a partir de folículos de 3-8 mm ao invés de folículos pré-ovulatórios. Ao contrário do oócito ovulado *in vivo*, esses oócitos não se desenvolvem até a fase pré-ovulatória e são maturados *in vitro*. Assim, esforços tem sido concentrados para o estabelecimento de meios não invasivos e não prejudiciais para a seleção dos oócitos mais competentes (Fair 2010; Krisher 2013; Wrenzycki and Stinshoff, 2013).

A MIV de oócitos imaturos ocorre por um mecanismo diferente daquele de oócitos maturados *in vivo*. A MIV é iniciada imediatamente após a remoção do oócito imaturo dos pequenos folículos antrais, e tais oócitos podem não possuir nem o tempo nem o ambiente correto para concluir as alterações necessárias exigidas para o sucesso do desenvolvimento subsequente (Krisher 2013; Wrenzycki and Stinshoff, 2013; Lonergan and Fair, 2016).

Recentemente, o sistema de simulação fisiológica de maturação oocitária (sistema SPOM) foi descrito (Albuz et al. 2010). Esse sistema preveniu a retomada espontânea da meiose após a recuperação mecânica de oócitos e, assim, melhorou o desenvolvimento *in vitro* de embriões. No entanto, como resultados semelhantes não foram facilmente alcançados, uma versão revisada foi descrita (Gilchrist et al. 2015). No momento, a maioria dos laboratórios que praticam MIV de oócitos bovinos utilizam um sistema de maturação de oócitos relativamente simples.

#### FIV

A FIV é um procedimento complexo cujo sucesso exige adequada maturação do oócito, seleção dos espermatozoides, capacitação espermática e meios de FIV.

As amostras de sêmen contêm uma população heterogênea de espermatozoides. *In vivo*, os espermatozoides são selecionadas por vários mecanismos no interior do sistema reprodutivo feminino, com o resultado de que o pequeno número de espermatozoides encontrado perto do oócito corresponde aos mais capazes de penetrar a zona pelúcida e fertilizar o oócito. Ao se empregar a FIV, no entanto, esses mecanismos de seleção natural são contornados. O método mais comum para a preparação de espermatozoides para FIV é por centrifugação através de um gradiente de concentração, como uma mistura de Percoll 45% sobre uma solução de 90%.

Uma variante de centrifugação coloide utilizando apenas uma camada de coloide (nesse caso não há gradiente) foi desenvolvida. A centrifugação de camada única (CCU) por meio de um coloide espécie-específico também mostrou-se eficaz na seleção de espermatozoides com boa mobilidade, morfologia normal e cromatina intacta (Thys et al. 2009; Goodla et al. 2014; Morrell et al. 2014; Gloria et al. 2016). Um método alternativo é o "swim-up". A desvantagem desse método é que ele leva cerca de 45-60 minutos para ser realizado e apenas 10-20% dos espermatozoides da amostra são recuperados. Para

centrifugação coloide são necessários apenas 25 minutos de tempo de preparação (incluindo a centrifugação) e uma taxa de recuperação >50% é normalmente atingida (Thys et al., 2009), embora isso dependa da qualidade espermática da amostra original.

Uma vez que a MIV foi realizada, os oócitos estão prontos para serem fertilizados. Isto envolve a co-incubação de oócitos com espermatozoides. A maioria dos laboratórios promove uma co-incubação de 18 - 19 horas. As mudanças pelas quais um espermatozoide tem que passar antes que possa fertilizar um oócito são chamadas de capacitação. Meios foram desenvolvidos para permitir esse processo, por exemplo o meio TALP. Como mencionado anteriormente, o principal agente de capacitação é heparina. A maioria dos sêmen utilizado para fertilização *in vitro* é congelado e descongelado. A concentração espermática final mais comum usada na FIV é de  $1 \times 10^6$  espermatozoides/mL.

#### CIV

A CIV dos embriões bovinos é o último passo do processo de PIV e envolve cerca de 6 dias de cultura a partir do zigoto. Os meios mais comuns para cultura de embriões bovinos são variações do meio fluido sintético do oviduto (SOF) original (Tervit et al. 1972). O SOF, com ou sem soro, faz parte da rotina da maioria dos sistemas de PIV bovina. Os embriões são cultivados em apenas um meio ao longo do tempo ou em um sistema sequencial no qual a formulação dos meios muda em certos pontos do período de cultura. Esses meios sequenciais tentam mimetizar as mudanças fisiológicas que os embriões encontram *in vivo* quando eles se movem pelas tubas uterinas e pelo útero. Parâmetros que variam de laboratório para laboratório são vários, por exemplo o volume do meio e a atmosfera na incubadora.

As condições de cultura *in vitro* (CIV) foram melhoradas nos últimos anos, principalmente pelo ajuste nas formulações dos meios. No entanto, enquanto mais de 30% de formação de blastocistos passa ser alcançada na maioria dos sistemas de cultura, logo se torna óbvio que a quantidade nem sempre está correlacionada com a qualidade (Lonergan et al., 2006; Wrenzycki et al. 2005; 2007) e que a suplementação com soro é prejudicial para desenvolvimento embrionário/fetal, sendo um dos principais fatores causadores da síndrome da cria grande (large offspring syndrome, LOS), caracterizada pelo crescimento embrionário e fetal anormalmente exagerado, padrões de expressão gênica alterados, e elevadas perdas perinatais (Young et al., 1998; Lazzari et al., 2002). Um grande estudo de campo demonstrou que a incidência de LOS foi altamente reduzida pela cultura *in vitro* em um meio SOF isento de células e de soro (van Wageningen-de Leeuw et al., 2000). Tais observações reforçam a importância do ambiente de cultura pós-fertilização para a qualidade do blastocisto resultante. No entanto, a existência de diversos meios e métodos de cultura de embriões torna muito difícil a definição dos componentes ideais dos meios de cultura de embriões.

O sucesso de um laboratório de PIV pode ser decorrente não só de melhorias na CIV, mas de todo o sistema de PIV (Baltz 2012; Gardner 2008; Leese 2012). Essas últimas incluem: condições de incubação, fase gasosa,



meios de cultura, camada de óleo, utensílios de plástico e densidade do embrião e o volume do meio. Além disso, as competências do pessoal envolvido em todo o processo tem que ser considerada como parte do sistema.

Em geral, considera-se que a PIV esteja em uma fase avançada de desenvolvimento. No entanto, um aspecto que pode mudar no futuro é a automação e a miniaturização do processo de PIV para melhor mimetizar o ambiente *in vivo*, por exemplo, usando microfluidos (Wheeler et al. 2007) ou uma tecnologia de encapsulamento (Blockeel et al. 2009) para obtenção de embriões PIV de qualidade similar aos embriões obtidos *in vivo*.

### Avaliação da qualidade de embriões na fase pré-implantação

O teste final da qualidade de um embrião é a sua capacidade para produzir um bezerro vivo e saudável após a transferência para uma receptora. A morfologia e a proporção de desenvolvimento para o estágio de blastocisto são utilizadas como critérios para avaliar a competência de desenvolvimento. A avaliação da morfologia do embrião continua a ser o método de escolha para a seleção de embriões viáveis antes da transferência. Essa é a abordagem mais prática e clinicamente útil para avaliar a viabilidade do embrião (Van Soom et al., 2003). Um sistema de classificação de embriões bovinos desenvolvido anteriormente, (Lindner and Wright, 1983), listado no Manual IETS, ainda é, com pequenas modificações, amplamente aplicado para esse fim (Hasler, 2001). No entanto, às vezes a morfologia do embrião por si só não é precisa o suficiente para ser utilizada como o único critério de avaliação do potencial de desenvolvimento do embrião *in vivo*. Marcadores não invasivos e técnicas melhoradas são necessários. Estas técnicas podem fornecer informações valiosas sobre a viabilidade do embrião. Por exemplo, a medida do consumo de oxigênio utilizando um nanorespiromômetro (Lopes et al. 2007) bem como o perfil de aminoácidos (Sturmey et al. 2010) podem ser utilizados para prever o potencial de desenvolvimento e viabilidade do embrião. Embora as abordagens não invasivas estejam melhorando, as invasivas têm sido extremamente úteis na seleção de genes candidatos para determinar a qualidade do embrião (Wrenzycki et al. 2007; Rizos et al. 2008; Graf et al. 2014).

### Conclusão

A produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos segue como um procedimento bem desenvolvido que está comercialmente disponível para esta espécie. No entanto, apesar de todas as melhorias no cultivo dos oócitos e dos embriões, apenas 30-35% dos CCOs bovinos imaturos desenvolvem-se para o estágio de blastocisto, o que representa uma eficiência razoável. No entanto, a situação *in vivo* ainda não pode ser mimetizada suficientemente bem. A qualidade dos embriões produzidos ainda é inferior em comparação aos embriões produzidos *in vivo*. Isso sugere que ainda há melhorias a serem feitas para aumentar a competência de desenvolvimento de oócitos e embriões.

Mais pesquisas básicas sobre os mecanismos moleculares, por exemplo reprogramação epigenética durante o desenvolvimento embrionário inicial, bem como estudos detalhados sobre a composição e as interações de meios de cultura, são necessárias. Com alteração das condições de maturação de oócitos e cultura de embriões, respectivamente, para mimetizar mais de perto o que ocorre *in vivo*, pode ser possível não só produzir mais embriões na fase de blastocisto, mas também blastocistos de melhor qualidade.

### References

- Acosta TJ, Hayashi KG, Ohtani M, Miyamoto A. (2003). Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. *Reproduction*. 125(5):759-67.
- Acosta TJ. (2007). Studies of follicular vascularity associated with follicle selection and ovulation in cattle. *J Reprod Dev*. 53(1):39-44.
- Albuz, F.K., Sasseville, M., Lane, M., Armstrong, D.T., Thompson, J.G., Gilchrist, R.B. (2010). "Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel in vitro maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes." *Hum Reprod*. 25(12):2999-3011.
- Baltz JM. (2012). Media composition: salts and osmolality. *Methods Mol Biol*. 912:61-80.
- Blockeel C, Mock P, Verheyen G, Bouche N, Le Goff P, Heyman Y, Wrenzycki C, Höffmann K, Niemann H, Haentjens P, de Los Santos MJ, Fernandez-Sanchez M, Velasco M, Aebischer P, Devroey P, Simón C. (2009). An in vivo culture system for human embryos using an encapsulation technology: a pilot study. *Hum Reprod*. 24(4):790-6.
- Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA. 1982. Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol Reprod*. 27(1):147-58.
- Brännström M, Zackrisson U, Hagström HG, Josefsson B, Hellberg P, Granberg S, Collins WP, Bourne T. (1998). Preovulatory changes of blood flow in different regions of the human follicle. *Fertil Steril*. 69(3):435-42.
- Chastant-Maillard S(1), Quinton H, Lauffenburger J, Cordonnier-Lefort N, Richard C, Marchal J, Mormede P, Renard JP. (2003). Consequences of transvaginal follicular puncture on well-being in cows. *Reproduction*. 125(4):555-63.
- Coulam CB, Goodman C, Rinehart JS. (1999). Colour Doppler indices of follicular blood flow as predictors of pregnancy after in-vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod*. 14(8):1979-82.
- Fair T. (2010). Mammalian oocyte development: checkpoints for competence. *Reprod Fertil Dev*. 22(1):13-20.
- Fukuda Y, Ichikawa M, Naito K, Toyoda Y. 1990. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized, and cultured with cumulus cells in vitro up to the blastocyst stage. *Biol Reprod*. 42(1):114-9.

- Galli C, Duchi R, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G.** (2014). Ovum pick up, intracytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer in cattle, buffalo and horses: from the research laboratory to clinical practice. *Theriogenology*. 81(1):138-51.
- Gardner DK.** (2008). Dissection of culture media for embryos: the most important and less important components and characteristics. *Reprod Fertil Dev*. 20(1):9-18.
- 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(1):23-31.
- Gilchrist, R.B., Zeng, H.T., Wang, X., Richani, D., Smitz, J., Thompson, J.G.** (2015). Reevaluation and evolution of the simulated physiological oocyte maturation system. *Theriogenology*. 84(4):656-7.
- Gloria A, Carluccio A, Wegher L, Robbe D, Befacchia G, Contri A.** (2016). Single and double layer centrifugation improve the quality of cryopreserved bovine sperm from poor quality ejaculates. *J Anim Sci Biotechnol*. 7:30.
- Goodla L, Morrell JM, Yusnizar Y, Stålhammar H, Johannisson A.** (2014). Quality of bull spermatozoa after preparation by single layer centrifugation. *Journal Dairy Science*, 97:2204-2212.
- Graf A, Krebs S, Heininen-Brown M, Zakhartchenko V, Blum H, Wolf E.** (2014). Genome activation in bovine embryos: review of the literature and new insights from RNA sequencing experiments. *Anim Reprod Sci*. 149(1-2):46-58.
- Hanstedt A, Wilkening S, Brüning K, Honnens Ä, Wrenzycki C.** (2010). Effect of perfollicular blood flow on the quality of oocytes collected during repeated OPU sessions. *Reprod Fert Dev*. 22:223.
- Hasler JF.** (2001). The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. *Anim Reprod Sci*. 79(3-4):245-64.
- Huey S, Abuhamad A, Barroso G, Hsu MI, Kolm P, Mayer J, Oehninger S.** (1999). Perifollicular blood flow Doppler indices, but not follicular pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>, or pH, predict oocyte developmental competence in in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 72(4):707-12.
- Krisher, R.L.** (2013). "In vivo and in vitro environmental effects on mammalian oocyte quality." *Annu Rev Anim Biosci*. 1:393-417.
- Lazzari G, Wrenzycki C, Herrmann D, Duchi R, Kruip T, Niemann H, Galli C.** (2002). Cellular and molecular deviations in bovine in vitro-produced embryos are related to the large offspring syndrome. *Biol Reprod*. 67(3):767-75.
- Leese HJ.** (2012). Metabolism of the preimplantation embryo: 40 years on. *Reproduction*. 143(4):417-27.
- Lindner GM, Wright RW Jr.** (1983). Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*. 20(4):407-16.
- Lonergan P, Fair T, Corcoran D, Evans AC.** (2006). Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology*. 65(1):137-52.
- Lonergan, P., Fair, T.** (2016). "Maturation of Oocytes in Vitro." *Annu Rev Anim Biosci*. 15:4:255-68.
- Lonergan P, Fair T, Forde N, Rizos D.** (2016). Embryo development in dairy cattle. *Theriogenology*. 86(1):270-7.
- Lopes AS, Wrenzycki C, Ramsing NB, Herrmann D, Niemann H, Løvendahl P, Greve T, Callesen H.** (2007). Respiration rates correlate with mRNA expression of G6PD and GLUT1 genes in individual bovine in vitro-produced blastocysts. *Theriogenology*. 68(2):223-36.
- Monniaux D, Clément F, Dalbiès-Tran R, Estienne A, Fabre S, Mansanet C, Monget P.** (2014). The ovarian reserve of primordial follicles and the dynamic reserve of antral growing follicles: what is the link? *Biol Reprod*. 90(4):85.
- Monniaux D.** (2016). Driving folliculogenesis by the oocyte-somatic cell dialog: Lessons from genetic models. *Theriogenology*. pii: S0093-691X(16)30048-6. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.04.017. [Epub ahead of print]
- Morrell JM, Rodriguez-Martinez H, Andersson M.** (2014). Colloid centrifugation selects normal spermatozoa from polymorphic bull ejaculates: a case study. *Reprod Dom Anim*, 49:281-284.
- 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(4):591-600.
- Pieterse MC, Kappen KA, Kruip TA, Taverne MA.** (1988). Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*. 30(4):751-62.
- Ponsart C, Le Bourhis D, Knijn H, Fritz S, Guyader-Joly C, Otter T, Lacaze S, Charreaux F, Schibler L, Dupassieux D, Mullaart E.** (2013). Reproductive technologies and genomic selection in dairy cattle. *Reprod Fertil Dev*. 26(1):12-21.
- 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.
- Sturmey RG, Bermejo-Alvarez P, Gutierrez-Adan A, Rizos D, Leese HJ, Lonergan P.** (2010). Amino acid metabolism of bovine blastocysts: a biomarker of sex and viability. *Mol Reprod Dev*. 77(3):285-96.
- Tervit HR, Whittingham DG, Rowson LE.** (1972). Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J Reprod Fertil*. 30(3):493-7.
- Thys, M, Vanadele L, Morrell JM, Mestach J, Van Soom A, Hoogewijs M, Rodriguez-Martinez H.** (2009). In vitro fertilising capacity of frozen-thawed bull spermatozoa separated by colloidal centrifugation through single-layer or gradients. *Reprod Domest Anim*, 44:390-394.
- Van Soom A, Mateusen B, Leroy J, De Kruif A.** (2003). Assessment of mammalian embryo quality: what can we learn from embryo morphology? *Reprod Biomed Online*. 7(6):664-70.
- van Wagtenonk-de Leeuw AM, Mullaart E, de Roos AP, Merton JS, den Daas JH, Kemp B, de Ruigh L.** (2000). Effects of different reproduction techniques: AI

MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. *Theriogenology*. 53(2):575-97.

**Wheeler MB, Walters EM, Beebe DJ.** (2007). Toward culture of single gametes: the development of microfluidic platforms for assisted reproduction. *Theriogenology*. 68 Suppl 1:S178-89.

**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(1-2):23-35.

**Wrenzycki C, Herrmann D, Niemann H.** (2007). Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. *Theriogenology*. 68 Suppl 1:S77-83.

**Wrenzycki, C. and H. Stinshoff** (2013). "Maturation environment and impact on subsequent developmental competence of bovine oocytes." *Reprod Domest Anim* 48 Suppl 1: 38-43.

**Young LE, Sinclair KD, Wilmut I.** (1998). Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev Reprod*. 3(3):155-63.

## Programas de fertilidade para vacas de leite, suas bases fisiológicas e os fatores críticos para seu sucesso

J.P.N. Martins and J.R. Pursley\*

Department of Animal Science, Michigan State University, East Lansing, MI 48824

Título curto: Aspectos relacionados à fertilidade em vacas de leite

\*Autor para correspondência: [pursleyr@msu.edu](mailto:pursleyr@msu.edu)

474 S. Shaw Lane, 1230 Anthony Hall, Michigan State University, East Lansing, MI 48824-1225, 517-281-7289,

### Resumo

Vacas leiteiras têm respostas reprodutivas muito peculiares quando comparadas com seus resultados enquanto eram novilhas. Estas diferenças surgem com distintos parâmetros reprodutivos e taxas de prenhes, os quais podem ser parcialmente modificados com algumas estratégias farmacológicas. Estes parâmetros incluem concentrações circulantes de progesterona e estradiol, diâmetro do folículo ovulatório e do corpo lúteo, incidência de anestro e ovulações duplas, duração do estro, taxas de prenhes por inseminação artificial (P/IA) e ocorrência de perdas gestacionais. Concentrações circulantes de progesterona durante o diestro de vacas são aproximadamente a metade das concentrações encontradas em novilhas. Esta diferença marcante é provavelmente a explicação para as maiores medidas no diâmetro do folículo ovulatório e na incidência de ovulações duplas em vacas quando comparadas com novilhas. Diferenças no diâmetro do folículo ovulatório podem explicar porque vacas têm maior diâmetro do corpo lúteo que as novilhas. O aumento na taxa de ovulações duplas parece ser um fator-chave no aumento do número de gêmeos e na perda gestacional durante a transição de novilhas para vacas primíparas e múltíparas em lactação. A redução nas concentrações de estradiol em vacas no momento do estro ajuda a explicar a diminuição na duração do estro de vacas em relação às novilhas. Concentrações de progesterona durante o crescimento do folículo ovulatório podem ser o fator-chave para as diferenças de P/IA das vacas em relação às novilhas. As diferenças na progesterona circulante podem estar relacionadas com a superestimulação de LH no complexo cúmulos/oócito de vacas, quando comparadas com novilhas. Estratégias farmacológicas vêm sendo desenvolvidas para vacas leiteiras em lactação com o objetivo de manipular o desenvolvimento ovariano para criar um ambiente hormonal similar ao das novilhas. Três estratégias primárias, Presynch-11, G6G e o Ovsynch Duplo parecem melhorar a fertilidade de vacas leiteiras. Esta revisão discute como estas três estratégias manipulam o desenvolvimento ovariano similarmente àquele das novilhas e mostra, por meio de

dados convincentes, por que estes programas devem ser chamados de “programas de fertilidade”.

### Introdução

O papel evolutivo do ovário é produzir oócitos viáveis para a fertilização. As estruturas ovarianas de apoio, folículos e corpo lúteo são os responsáveis pelo ambiente hormonal, produção dos oócitos e a manutenção da gestação. O efeito fisiológico dessas estruturas em vacas leiteiras em lactação, quando comparadas com nulíparas, está associado com resultados reprodutivos negativos (Wiltbank *et al.*, 2006). A manipulação farmacológica das estruturas ovarianas pode reverter estes efeitos da lactação e melhorar a fertilidade (Wiltbank *et al.*, 2011). A base fisiológica para o desenvolvimento de programas farmacológicos que melhorem a fertilidade de vacas leiteiras em lactação vem de estudos que caracterizaram as principais diferenças nos índices reprodutivos de primíparas e múltíparas (ambas referidas até agora como “vacas”) vs. nulíparas (referidas até agora como “novilhas”) (Sartori *et al.*, 2002; 2004; Wolfenson *et al.*, 2004).

A diferença nas concentrações circulantes de progesterona parece ser o fator-chave para a diferença em muitos desses índices. Vacas em lactação têm concentração de progesterona circulante reduzida durante o ciclo estral quando comparadas às novilhas (Sartori *et al.*, 2002; 2004; Wolfenson *et al.*, 2004). Isso provavelmente favorece o maior número de pulsos de LH durante a fase luteal do ciclo, o que impulsiona o crescimento do diâmetro do folículo dominante e do folículo ovulatório em vacas em relação às novilhas (Bergfeld *et al.*, 1996). Estas diferenças na progesterona e na pulsatilidade de LH também dão origem a diferenças na duração das ondas foliculares (Wolfenson *et al.*, 2004). Neste caso, vacas com menores concentrações de progesterona apresentam intervalos mais longos entre as ondas foliculares em relação às novilhas (Wolfenson *et al.*, 2004) devido, em parte, ao aumento no número de pulsos de LH que estimula o crescimento do folículo dominante durante períodos mais longos. Como consequência, isto faz com que um maior número de vacas apresente folículo ovulatório com maior idade antral (medidos desde o início

da onda até a ovulação), por terem sido desenvolvidos sob maior número de pulsos de LH em relação às novilhas.

Novilhas têm grandes chances de apresentar três ondas de crescimento folicular durante seu ciclo estral sutilmente mais curto, se o folículo dominante da segunda onda entra em atresia antes da luteólise endógena (Savio *et al.*, 1990). O aumento na taxa de ovulações duplas parece ser um fator-chave no aumento do número de gêmeos durante a transição de novilhas para vacas primíparas e multíparas em lactação (Wiltbank *et al.*, 2000; 2006; Sartori *et al.*, 2004; Lopez *et al.*, 2005). Parece que o aumento no número de gêmeos tem impacto significativo nas taxas de perda gestacional (López-Gatius *et al.*, 2002; López-Gatius and Hunter, 2005). Diferenças metabólicas como a produção leiteira e o aumento na ingestão de material seca podem explicar estas diferenças do funcionamento reprodutivo (Wiltbank *et al.*, 2006).

A ineficiência reprodutiva é um obstáculo para a rentabilidade e a sustentabilidade da fazenda leiteira. Durante os últimos 50 anos, a eficiência reprodutiva de vacas leiteiras em lactação diminuiu progressivamente devido, principalmente, a dois parâmetros reprodutivos essenciais - a baixa eficiência na detecção de estro e baixas taxas de P/IA (Lucy, 2001; Washburn *et al.*, 2002). Estudos recentes indicam que a taxa de detecção de estro é aproximadamente 36% em vacas em lactação (MI DHIA 2014, yearly summary) e 70% em novilhas. As mudanças drásticas na taxa de detecção de estro durante a transição de novilhas para vacas pode ser atribuída à mudanças na concentração de estrógeno circulante (Sartori *et al.*, 2004; Wolfenson *et al.*, 2004; Wiltbank *et al.*, 2006), assim como diferenças ambientais, com vacas passando mais tempo em pisos de concreto (Platz *et al.*, 2008; Martin *et al.*, 2015) e ficando mais suscetíveis ao estresse térmico (Her *et al.*, 1988; Orihuela, 2000).

Felizmente, a taxa de detecção de estro (ou taxa de serviço quando se refere a vacas inseminadas em tempo fixo) é significativamente aumentada quando as vacas são inseminadas em tempo fixo com Ovsynch (Pursley *et al.*, 1997b). Isso é possível pois o Ovsynch poder ser utilizado como uma ferramenta para controlar o momento da primeira IA e das inseminações subsequentes, caso o diagnóstico de gestação seja negativo. Mas, infelizmente, o segundo grande obstáculo, a taxa de P/IA, não é melhorado com o Ovsynch (Pursley *et al.*, 1997a; b). Nos últimos 40 anos, a taxa média de P/IA em vacas leiteiras em lactação diminuiu de aproximadamente 65% nos anos 1950 (Spalding *et al.*, 1975; Butler and Smith, 1989) para algo em torno de 35% (Strickland *et al.*, 2010; Fricke *et al.*, 2014), enquanto a P/IA em novilhas manteve-se estável ao redor de 70% (Pursley *et al.*, 1997a; Escalante *et al.*, 2013). O Ovsynch foi desenvolvido para sincronizar o momento da ovulação e permitir que a IA fosse realizada em um momento pré-determinado. Agora, os estudos têm focado nos caminhos para melhorar a dinâmica folicular e luteínica durante o protocolo Ovsynch, com o objetivo de melhorar as taxas de P/IA em vacas leiteiras em lactação (Vasconcelos *et al.*, 1999; Bello *et al.*, 2006; Wiltbank and Pursley, 2014).

Os programas de fertilidade, diferentemente dos programas de sincronização convencionais, se baseiam em

três eventos fisiológicos fundamentais para conseguir sincronizar um maior número de vacas: 1) iniciar um novo ciclo estral; 2) causar a ovulação do folículo dominante da primeira onda dentro de 8 horas após a indução; e 3) provocar controladamente a luteólise completa antes que ocorra a luteólise endogenamente induzida. Estes três eventos devem ocorrer para tornar estes programas de fertilidade efetivamente diferentes dos demais programas de sincronização.

Esta revisão focou em intervenções farmacológicas específicas que utilizam somente o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e a prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) para manipular o desenvolvimento ovariano de vacas em lactação, com o objetivo de gerar resultados fisiológicos semelhantes às novilhas e melhorar a fertilidade. Estas intervenções manipulam a idade antral do folículo ovulatório assim como o ambiente hormonal durante o seu crescimento, o que é necessário para a ovulação induzida de um único oócito competente. Esta condição induzida melhora as chances de ocorrência de prenhez após uma única IA em comparação com uma IA após a observação de estro. A partir de agora, este conjunto de intervenções serão denominados “programas de fertilidade para vacas leiteiras” à base do protocolo Ovsynch (Wiltbank and Pursley, 2014). Estes programas serão diferenciados dos demais programas de sincronização à base do Ovsynch à partir da manipulação dos folículos e do corpo lúteo formados.

### Limitações no uso do Ovsynch sozinho

O Ovsynch é baseado em três tratamentos farmacológicos (Pursley *et al.*, 1995). O primeiro tratamento, o GnRH, pode induzir um pico de LH e pode causar a ovulação de um possível folículo dominante (FD) maduro e funcional (Sartori *et al.*, 2001). Por sua vez, a ovulação do FD induz a emergência de uma nova onda de crescimento folicular aproximadamente 1,5 dias depois (Pursley *et al.*, 1995), seguida pelo desenvolvimento de um novo folículo dominante durante os próximos 7 dias. Se não há folículo responsivo ao primeiro GnRH, é provável que a vaca se encontre entre os dias 3 e 4 da onda folicular (Bello *et al.*, 2006).

Durante este estágio inicial da onda, o maior folículo em crescimento pode ser muito imaturo (por exemplo, sem receptores de LH (Xu *et al.*, 1995) para responder ao pico de LH induzido pelo primeiro tratamento com GnRH (Sartori *et al.*, 2001). Se o FD não é responsivo ao pico de LH induzido pelo GnRH, este pode tornar-se o folículo ovulatório no decorrer do protocolo Ovsynch ou, possivelmente, tornar-se atresico antes da luteólise (Vasconcelos *et al.*, 2003). Se o folículo se torna atresico antes da PGF<sub>2α</sub>, uma nova onda folicular surgirá. O novo FD dessa onda provavelmente não se tornará maduro o suficiente 2 dias depois para responder ao pico de LH induzido pelo segundo GnRH ao final do protocolo Ovsynch. Se a PGF<sub>2α</sub> induz uma luteólise completa nesta situação, as vacas provavelmente irão demonstrar sinais de estro nos próximos 3 a 4 dias e a IA será realizada antes da maturação do mais novo folículo pré-ovulatório. Este achado

é um caso comum de falha na sincronização do protocolo Ovsynch.

O segundo tratamento do Ovsynch, a PGF<sub>2α</sub> é administrada para induzir a luteólise, o que permite que o FD da nova onda de crescimento folicular se desenvolva para folículo pré-ovulatório. A luteólise pode não ser efetiva após uma única dose de PGF<sub>2α</sub>, particularmente em vacas multíparas. Isto será discutido a seguir. O terceiro e último tratamento do Ovsynch, o GnRH, é administrado de 56 a 60 após a aplicação da PGF<sub>2α</sub> (Brusveen *et al.*, 2008) para induzir o pico pré-ovulatório de LH que desencadeia a ovulação do FD, 24 a 32 horas depois (Pursley *et al.*, 1995). Isto é mais efetivo em vacas que tenham um folículo pré-ovulatório funcional no momento da aplicação do segundo GnRH.

Vacas tratadas com Ovsynch obtêm taxas de P/IA similares às aquelas inseminadas após detecção de estro (37 vs. 39%, respectivamente;  $P > 0,10$ ) (Pursley *et al.*, 1997b). Mais de 40% das vacas podem não ter a ovulação sincronizada com o protocolo Ovsynch (Pursley *et al.*, 1995; Vasconcelos *et al.*, 1999; Bello *et al.*, 2006). Vacas que não forem corretamente sincronizadas não serão inseminadas no momento apropriado em relação à sua ovulação, ou poderão não ter uma luteólise apropriada, fatos estes que diminuem as chances de que esta vaca se torne prenhe (Vasconcelos *et al.*, 1999; Bello *et al.*, 2006). A melhora nas taxas de sincronização do protocolo Ovsynch, quando usado sozinho, poderia causar grande impacto no desempenho reprodutivo. Vasconcelos *et al.* (1999) atribuíram a maior parte da variabilidade nas taxas de sincronização de vacas ao momento do ciclo estral em que as fêmeas se encontravam quando o Ovsynch era iniciado. Vacas que começavam o Ovsynch entre os dias 5-9 do ciclo estral tinham maior probabilidade de sincronização e, conseqüentemente, maior chance de P/IA do que vacas que recebiam o primeiro dia do protocolo em outros momentos do ciclo (Vasconcelos *et al.*, 1999; Bello *et al.*, 2006).

#### **Diferença entre programas de fertilidade e programas de sincronização**

Estudos indicam que as taxas de sincronização podem ser significativamente melhoradas quando vacas leiteiras em lactação são tratadas com programas de pré-sincronização que utilizam PGF<sub>2α</sub> e GnRH, quando comparadas com Ovsynch sozinho ou Presynch-12 ou -14/Ovsynch (Bello *et al.*, 2006; Souza *et al.*, 2008; Herlihy *et al.*, 2012). A razão principal para essa melhor sincronização foi a sincronia do início do novo ciclo estral, o que permite que o primeiro GnRH do protocolo Ovsynch seja administrado entre os dias 6 e 7 do novo ciclo (Vasconcelos *et al.*, 1999; Bello *et al.*, 2006). Os dados apresentados a seguir demonstrarão que iniciar o protocolo Ovsynch com a aplicação do primeiro GnRH ao redor dos dias 6 e 7 do ciclo estral melhora a resposta do folículo ovulatório e aumenta a proporção de vacas que ovulam ao final do protocolo Ovsynch após a aplicação do segundo GnRH (Vasconcelos *et al.*, 1999; Bello *et al.*, 2006). Isto, por sua vez, melhora as chances de prenhez das vacas e aumenta as taxas de P/IA (Bello *et al.*, 2006).

#### **O controle da emergência do folículo ovulatório é crucial para uma sincronização ideal**

Obter uma taxa de ovulação consistente em resposta ao primeiro GnRH do protocolo Ovsynch constitui o primeiro passo importante para melhorar a sincronização da ovulação do protocolo Ovsynch em vacas leiteiras em lactação (Vasconcelos *et al.*, 1999; Bello *et al.*, 2006). A ovulação ao primeiro GnRH do Ovsynch é seguida pela emergência de uma nova onda de crescimento folicular, que dará origem ao folículo ovulatório do protocolo Ovsynch (Pursley *et al.*, 1995). Assim, variações na resposta ao primeiro GnRH levam a variações extremas no momento da emergência do folículo que deveria ser o ovulatório ao final do Ovsynch. Isto, por sua vez, resulta em variações substanciais no tamanho do folículo ovulatório no momento da aplicação do segundo GnRH ao final do Ovsynch (Vasconcelos *et al.*, 1999; Bello *et al.*, 2006). Esta variação diminui as chances de ocorrência de prenhez (Vasconcelos *et al.*, 1999; Bello *et al.*, 2006).

O programa G6G, por exemplo, diminui a variabilidade do folículo ovulatório e aumenta a taxa de sincronização ao protocolo Ovsynch (Bello *et al.*, 2006). Nestes experimentos, vacas foram tratadas com 25 mg de PGF<sub>2α</sub> e, dois dias depois, com 100 µg de GnRH. Então, após essa pré-sincronização, as vacas receberam o primeiro GnRH do Ovsynch 4, 5 ou 6 dias no Experimento 1 (Bello *et al.*, 2006), ou aos 6, 7 ou 8 dias no Experimento 2 (Bello and Pursley, 2007). Os grupos Controle receberam somente o protocolo Ovsynch em ambos os experimentos.

Quando comparado ao Ovsynch sozinho, o tratamento de pré-sincronização com GnRH 6 dias antes do primeiro GnRH do protocolo Ovsynch aumentou a proporção de vacas que ovularam ao primeiro GnRH, a proporção de vacas que tiveram luteólise após a PGF<sub>2α</sub> do Ovsynch e a proporção de vacas que, em conjunto, tiveram luteólise após a PGF<sub>2α</sub> e ovulação após o segundo GnRH, ao final do protocolo Ovsynch (Bello *et al.*, 2006). Estas melhoras foram repetidas no Experimento 2 para o intervalo de 6 dias em relação ao grupo Controle (Bello and Pursley, 2007). Nos dois estudos combinados, a taxa de ovulação média ao primeiro GnRH do Ovsynch foi 90% no grupo 6 dias ( $n = 76$ ). Adicionalmente, o grupo com 7 dias de intervalo entre o GnRH da pré-sincronização e o primeiro GnRH do Ovsynch também melhorou essas respostas, particularmente quando as vacas iniciavam um novo ciclo estral após responderem a ambos os tratamentos da pré-sincronização (PGF<sub>2α</sub> e GnRH). Assim, os dias 6 ou 7 do ciclo estral parecem ser os dias ideais para se iniciar um protocolo Ovsynch com máxima resposta ovulatória ao primeiro GnRH e luteólise em resposta à PGF<sub>2α</sub> (Bello *et al.*, 2006; Bello and Pursley, 2007).

Adicionalmente, os dados revelam que vacas que ovulam em resposta ao primeiro GnRH do protocolo Ovsynch apresentam menor variabilidade no tamanho do folículo pré-ovulatório no momento do segundo GnRH, maior chance de luteólise em resposta à PGF<sub>2α</sub> do Ovsynch e maior chance de ovulação ao segundo GnRH (Vasconcelos *et al.*, 1999; Bello *et al.*, 2006;). Também, foi detectada uma

relação linear positiva entre as concentrações de estradiol no momento do segundo GnRH do Ovsynch e a probabilidade de ocorrência de prenhez (Bello *et al.*, 2006). Além disso, foi detectada uma relação quadrática entre o tamanho do folículo ovulatório no momento do segundo GnRH e a probabilidade de ocorrência de prenhez. Vacas que tiveram tamanho do folículo associado com maiores chances de prenhez também tinham maiores concentrações de estradiol. Assim, é de suma importância melhorar o tamanho do folículo ovulatório para permitir que estes folículos secretem a maior quantidade de estradiol possível no momento do segundo GnRH do protocolo Ovsynch.

Estes dois experimentos foram desenhados para testar o impacto deste esquema de pré-sincronização sobre o desenvolvimento do folículo e do corpo lúteo em resposta aos tratamentos do protocolo Ovsynch (Bello *et al.*, 2006; Bello and Pursley, 2007). Nestes resultados preliminares nós mostramos a proporção de vacas prenhes quase dobrar nos grupos de 6 e 7 dias de intervalo após a pré-sincronização em relação ao grupo Ovsynch sozinho. A Figura 1 descreve

algumas das diferenças potenciais entre dois esquemas de pré-sincronização. O Presynch utiliza duas injeções de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  com intervalo de 14 dias entre elas, e intervalo de 11 a 14 dias entre a última prostaglandina e o início do protocolo Ovsynch. Como a  $\text{PGF}_{2\alpha}$  controla somente a luteólise de forma direta, o intervalo para a ocorrência do estro e a ovulação pode ser bastante variável, o que faz com que o dia do ciclo estral no início do protocolo Ovsynch também seja muito variável. A possibilidade de ocorrência de ovulação ao primeiro GnRH do protocolo Ovsynch é aproximadamente 61% após 11 dias de intervalo e aproximadamente 45% após 14 dias de intervalo entre a segunda  $\text{PGF}_{2\alpha}$  do protocolo de pré-sincronização Presynch e o primeiro GnRH do Ovsynch (Galvão *et al.*, 2007). Adicionalmente, as vacas tratadas com Ovsynch que estão em anestro não responderão às injeções de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  do Presynch, mas responderão ao GnRH do novo programa proposto ( $\text{PGF}_{2\alpha}$  – GnRH), permitindo assim que o Ovsynch comece no melhor momento para a onda folicular subsequente.

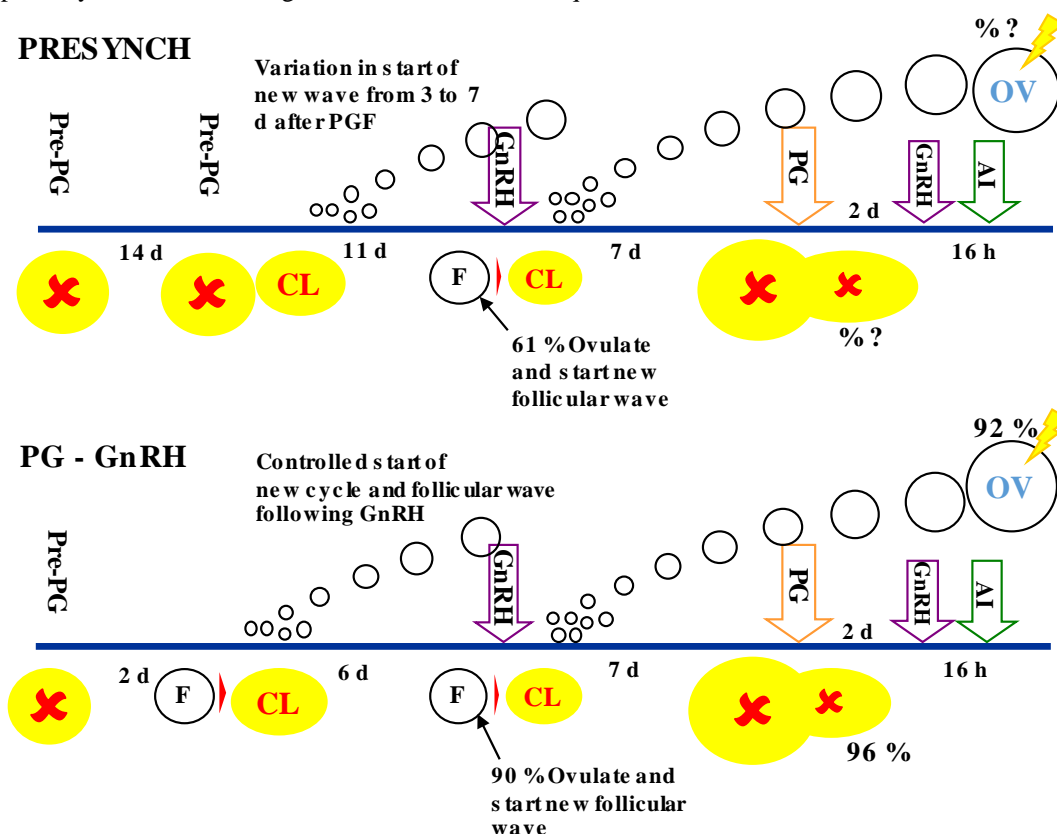


Figura 1. Descrição da potencial diferença no controle do desenvolvimento folicular do Presynch vs. o esquema de pré-sincronização proposto com  $\text{PGF}_{2\alpha}$  – GnRH. O maior controle de um novo ciclo estral nas vacas, causado pelo esquema  $\text{PGF}_{2\alpha}$  – GnRH, pode garantir um melhor controle do folículo ovulatório que será seguido pelo primeiro GnRH do protocolo Ovsynch. PG:  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ; F: folículo dominante; IA: inseminação artificial.

Se as vacas estiverem no dia 6 do ciclo no momento do primeiro GnRH do protocolo Ovsynch, aproximadamente 97% das vacas terão um CL acessório formado após o pico de LH induzido pela aplicação do GnRH, e estas vacas terão maior probabilidade de prenhez (Bello *et al.*, 2006; Bello and Pursley, 2007). Vacas com dois corpos lúteos, um com 7 e o

outro com 13 dias, no momento da  $\text{PGF}_{2\alpha}$  do Ovsynch têm aproximadamente 50% mais concentração de progesterona comparada com vacas que possuem somente um CL de 13 dias (Pursley and Martins, 2011). Programas de fertilidade melhoram a proporção das vacas que respondem ao primeiro GnRH do protocolo Ovsynch, o que permite que mais vacas



desenvolvam CL acessório, que tenham maiores concentrações de progesterona no momento da indução da luteólise e apresentem maior chance de prenhez.

### Melhorando a regressão do CL

A concentração circulante de P4 durante os tratamentos de fertilidade parece ser um dos marcadores mais importantes para o sucesso da prenhez após a inseminação em tempo fixo. Adicionalmente aos efeitos dos níveis de P4 antes da aplicação da PGF<sub>2α</sub> do protocolo Ovsynch na fertilidade de vacas de leite em lactação, como discutido anteriormente, as concentrações de P4 após a aplicação da PGF<sub>2α</sub> do protocolo Ovsynch também têm sido associadas com a P/IA de vacas leiteiras em lactação após a inseminação em tempo fixo (Souza *et al.*, 2007; Brusveen *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2011b). No entanto, neste caso, um pequeno aumento na concentração sérica de P4 parece ser prejudicial para os resultados de P/IA em tempo fixo.

Estudos usando programas de sincronização relataram que vacas com CL funcional que não baixaram as concentrações de P4 para níveis basais tiveram pouca ou nenhuma chance de concepção após uma inseminação em tempo fixo. Em estudos prévios, a probabilidade de prenhez diminuiu conforme as concentrações de P4 aumentavam (Souza *et al.*, 2007; Brusveen *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2011b). O tempo até atingir a luteólise completa após a aplicação da PGF<sub>2α</sub> do protocolo Ovsynch também parece influenciar a fertilidade, já que vacas com liberação de P4 alongada por luteólise incompleta têm fertilidade prejudicada após a inseminação em tempo fixo (Martins *et al.*, 2011a; b). Portanto, é essencial que vacas com CL funcional tenham regressão luteínica completa após a aplicação da PGF<sub>2α</sub> do protocolo Ovsynch, a qual é caracterizada pela queda da P4 circulante a níveis basais antes da inseminação em tempo fixo.

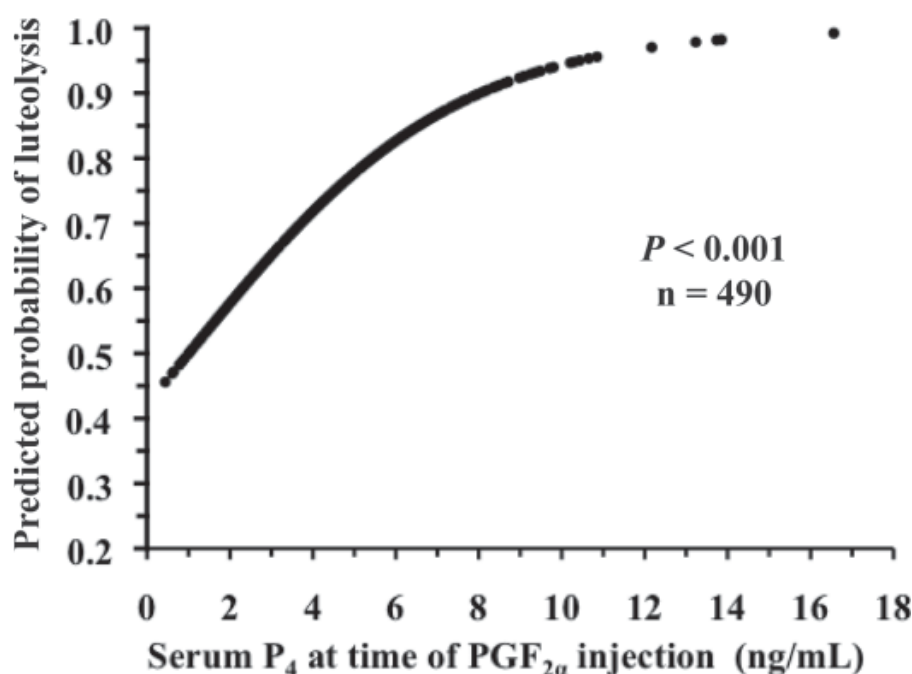


Figura 2. Probabilidade de ocorrência de luteólise completa baseado na concentração de progesterona (P4 < 0.5 ng/mL 56, 72 e 96 h após a injeção de PGF<sub>2α</sub>) no momento da aplicação de PGF<sub>2α</sub> do protocolo Ovsynch em vacas leiteiras em lactação com um corpo lúteo funcional (CL; concentrações de P4 ≥ 0.24 ng/mL 24 h e ≥ 0.09 ng/mL 56 h após o tratamento; n = 490) no momento do tratamento. Publicado na revista científica *Journal of Dairy Science* (Martins *et al.*, 2011b).

Relatos da proporção de vacas leiteiras em lactação com luteólise incompleta seguida da aplicação da PGF<sub>2α</sub> do protocolo Ovsynch estão entre 5 e 30% (Souza *et al.*, 2007; Brusveen *et al.*, 2009; Bisinotto *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2011b; Giordano *et al.*, 2012). Adicionalmente, resultados similares foram obtidos usando as duas PGF<sub>2α</sub> comerciais disponíveis nos Estados Unidos: o dinoprost trometamina (Lutalyse e ProstaMate) e o cloprostenol sódico (Estrumate e estroPLAN). Apesar dos mecanismos envolvidos na resistência de um CL maduro, com 7 dias ou mais, durante o processo de luteólise completa ainda não serem muito bem estabelecidos, alguns fatores parecem influenciar na

proporção de vacas com luteólise completa após a aplicação da PGF<sub>2α</sub> do protocolo Ovsynch.

Estudos prévios do nosso laboratório identificaram que as ordens de serviço e de parto poderiam afetar a proporção de vacas com luteólise completa (Martins *et al.*, 2011b). Uma grande proporção de vacas de primeiro serviço tiveram luteólise em relação às vacas de segundo serviço ou mais (79 vs. 71% respectivamente). Vacas primíparas também foram mais propensas a ter luteólise completa em relação a vacas multíparas (94 vs. 81%) (Martins *et al.*, 2011b). Este mesmo estudo também mostrou que vacas com maior P4 circulante no momento da aplicação da PGF<sub>2α</sub> do protocolo Ovsynch tiveram maior probabilidade de



apresentar regressão luteínica completa (Figura 2) (Martins *et al.*, 2011b). Este resultado foi inesperado uma vez que vacas com dois CL, um maduro e um acessório, apresentavam alta P4 sérica no momento da aplicação da PGF<sub>2α</sub> do protocolo Ovsynch. Acreditava-se que haveria problemas com a luteólise, devido ao número de CL e a pouca idade do CL acessório (7 dias).

Com o objetivo de aumentar a proporção de vacas com luteólise completa após a aplicação da PGF<sub>2α</sub> do protocolo Ovsynch, duas diferentes estratégias foram testadas: (1) repetidas aplicações de PGF<sub>2α</sub> na dose comercial de bula (Brusveen *et al.*, 2009); ou (2) aumento da dose de bula da PGF<sub>2α</sub> administrada somente uma vez (Giordano *et al.*, 2013). A proporção de vacas com regressão completa do corpo lúteo foi aumentada quando uma dose adicional de PGF<sub>2α</sub> foi administrada 24 horas após a PGF<sub>2α</sub> do protocolo Ovsynch (95,6%) em comparação com as vacas que receberam somente a dose de PGF<sub>2α</sub> do protocolo Ovsynch (84,6%) (Brusveen *et al.*, 2009). Houve aumento na proporção de vacas com luteólise completa. As taxas de P/IA nas vacas que receberam 1 vs. 2 doses de PGF<sub>2α</sub> foram 52,7 vs. 47,0%, respectivamente (Brusveen *et al.*, 2009). Baseando-se nos dados de Martins *et al.* (2011), as vacas que tiveram luteólise incompleta apresentaram chance de se tornarem prenhes próxima a 0%. Os 11% de vacas que não tiveram a luteólise completa (84,6% de 95,6) - provavelmente não engravidaram, já que, matematicamente, a diferença ficou próxima de 6%.

Giordano *et al.* (2013) testaram se o aumento de 50% na dose de bula (0,50 vs. 0,75 mg) de um análogo de PGF<sub>2α</sub> (cloprostenol) poderia aumentar a proporção de vacas com luteólise completa após a aplicação de PGF<sub>2α</sub> do protocolo Ovsynch (Giordano *et al.*, 2013). A maior dose de PGF<sub>2α</sub> aumentou a proporção de vacas com luteólise completa (87,7 vs. 79,2 %) e tendeu a aumentar a P/IA 39 dias após a inseminação de vacas multíparas (45,4 vs. 40,9 %) (Giordano *et al.*, 2013). No entanto, este efeito não foi percebido em vacas primíparas (92,8 vs. 89,7%) (Giordano *et al.*, 2013). Estes estudos indicam que algumas vacas e/ou seus CL são mais resistentes para atingir a luteólise completa com a dose indicada na bula da PGF<sub>2α</sub>. Conjuntamente, há evidências convincentes de que a luteólise incompleta após a aplicação da PGF<sub>2α</sub> do protocolo Ovsynch tem impacto direto no desempenho reprodutivo de vacas leiteiras em lactação, e que a administração de duas doses de PGF<sub>2α</sub> com intervalo de 24 horas entre aplicações pode resolver esse problema. Portanto, tratamentos de fertilidade incorporaram o uso da segunda dose de PGF<sub>2α</sub> de 8 a 24 horas após a aplicação da PGF<sub>2α</sub> do protocolo Ovsynch para aumentar a taxa de luteólise completa e as chances de prenhez após a inseminação em tempo fixo.

### Considerações finais

Para induzir a ovulação, tanto durante o ciclo estral como em condição de anestro, é crucial que seja gerada uma nova onda de crescimento folicular e um corpo lúteo acessório. A taxa de ovulação após o pico de LH induzido pelo GnRH é maior nos dias 6 ou 7 do ciclo estral, durante o período final de dominância da primeira onda folicular. Para

iniciar a indução da luteólise, tanto do CL formado espontaneamente como do CL acessório, é fundamental que o folículo dominante da nova onda folicular esteja em um estágio de maturidade ideal. A indução da luteólise completa do corpo lúteo é crítica e não pode ser prejudicada, portanto, é imperativo utilizar-se duas doses de PGF<sub>2α</sub> com intervalo de 8 e 24 horas entre as aplicações. Essencialmente, a indução de uma nova onda de crescimento folicular e da ovulação do FD oriundo dessa nova onda faz com que a idade do folículo ovulatório das vacas seja semelhante às novilhas durante o ciclo estral (Sartori *et al.*, 2002; 2004; Wolfenson *et al.*, 2004). O Presynch-10 ou -11, G6G e o Ovsynch duplo criam estas diferenças fisiológicas de grandes proporções em comparação ao Ovsynch sozinho, e o Presynch-12 ou -14 podem aumentar as taxas de P/IA entre 30 a 60% (Bello *et al.*, 2006; Galvão *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2008; Ribeiro *et al.*, 2012; Astiz and Fargas, 2013; Dirandeh *et al.*, 2015).

### References

- Astiz S, Fargas O. 2013. Pregnancy per AI differences between primiparous and multiparous high-yield dairy cows after using Double Ovsynch or G6G synchronization protocols. *Theriogenology*, 79:1065–1070.
- Bello NM, Pursley JR. 2007. Strategies to maximize ovulation to first GnRH of Ovsynch in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, 90:326–327 (Abst.).
- Bello NM, Steibel JP, Pursley JR. 2006. Optimizing ovulation to first GnRH improved outcomes to each hormonal injection of ovsynch in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, 89:3413–3424.
- Bergfeld EG, Kojima FN, Cupp AS, Wehrman ME, Peters KE, Mariscal V, Sanchez T, Kinder JE. 1996. Changing dose of progesterone results in sudden changes in frequency of luteinizing hormone pulses and secretion of 17 beta-estradiol in bovine females. *Biol Reprod*, 54:546–553.
- Bisinotto RS, Ribeiro ES, Martins LT, Marsola RS, Greco LF, Favoreto MG, Risco CA, Thatcher WW, Santos JEP. 2010. Effect of interval between induction of ovulation and artificial insemination (AI) and supplemental progesterone for resynchronization on fertility of dairy cows subjected to a 5-d timed AI program. *J Dairy Sci*, 93:5798–5808.
- Brusveen DJ, Souza AH, Wiltbank MC. 2009. Effects of additional prostaglandin F2alpha and estradiol-17beta during Ovsynch in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, 92:1412–1422.
- Brusveen DJ, Cunha AP, Silva CD, Cunha PM, Sterry RA, Silva EPB, Guenther JN, Wiltbank MC. 2008. Altering the time of the second gonadotropin-releasing hormone injection and artificial insemination (AI) during Ovsynch affects pregnancies per AI in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, 91:1044–1052.
- Butler WR, Smith RD. 1989. Interrelationships Between Energy Balance and Postpartum Reproductive Function in Dairy Cattle. *J Dairy Sci*, 72:767–783.
- Dirandeh E, Roodbari AR, Colazo MG. 2015. Double-Ovsynch, compared with presynch with or without GnRH, improves fertility in heat-stressed lactating dairy

cows. *Theriogenology*, 83:438–443.

**Escalante RC, Poock SE, Mathew DJ, Martin WR, Newsom EM, Hamilton SA, Pohler KG, Lucy MC.** 2013. Reproduction in grazing dairy cows treated with 14-day controlled internal drug release for presynchronization before timed artificial insemination compared with artificial insemination after observed estrus. *J Dairy Sci*, 96:300–306.

**Fricke PM, Giordano JO, Valenza A, Lopes G, Amundson MC, Carvalho PD.** 2014. Reproductive performance of lactating dairy cows managed for first service using timed artificial insemination with or without detection of estrus using an activity-monitoring system. *J Dairy Sci*, 97:2771–2781.

**Galvão KN, Sá Filho MF, Santos JEP.** 2007. Reducing the interval from presynchronization to initiation of timed artificial insemination improves fertility in dairy cows. *J Dairy Sci*, 90:4212–4218.

**Giordano JO, Wiltbank MC, Guenther JN, Pawlisch R, Bas S, Cunha AP, Fricke PM.** 2012. Increased fertility in lactating dairy cows resynchronized with Double-Ovsynch compared with Ovsynch initiated 32 d after timed artificial insemination. *J Dairy Sci*, 95:639–653.

**Giordano JO, Wiltbank MC, Fricke PM, Bas S, Pawlisch R, Guenther JN, Nascimento AB.** 2013. Effect of increasing GnRH and PGF2 $\alpha$  dose during Double-Ovsynch on ovulatory response, luteal regression, and fertility of lactating dairy cows. *Theriogenology*, 80:773–783.

**Her E, Wolfenson D, Flamenbaum I, Folman Y, Kaim M, Berman A.** 1988. Thermal, Productive, and Reproductive Responses of High Yielding Cows Exposed to Short-Term Cooling in Summer. *J Dairy Sci*, 71:1085–1092.

**Herlihy MM, Giordano JO, Souza AH, Ayres H, Ferreira RM, Keskin A, Nascimento AB, Guenther JN, Gaska JM, Kacuba SJ, Crowe MA, Butler ST, Wiltbank MC.** 2012. Presynchronization with Double-Ovsynch improves fertility at first postpartum artificial insemination in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, 95:7003–7014.

**Lopez H, Caraviello DZ, Satter LD, Fricke PM, Wiltbank MC.** 2005. Relationship between level of milk production and multiple ovulations in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, 88:2783–2793.

**López-Gatius F, Hunter RHF.** 2005. Spontaneous reduction of advanced twin embryos: its occurrence and clinical relevance in dairy cattle. *Theriogenology*, 63:118–125.

**López-Gatius F, Santolaria P, Yániz J, Rutllant J, López-Béjar M.** 2002. Factors affecting pregnancy loss from gestation Day 38 to 90 in lactating dairy cows from a single herd. *Theriogenology*, 57:1251–1261.

**Lucy MC.** 2001. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? *J Dairy Sci*, 84:1277–1293.

**Martin AD, Kielland C, Nelson ST, Østerås O.** 2015. The effects of building design on hazard of first service in Norwegian dairy cows. *J Dairy Sci*, 98:8655–8663.

**Martins JPN, Policelli RK, Pursley JR.** 2011a. Luteolytic effects of cloprostenol sodium in lactating dairy cows treated with G6G/Ovsynch. *J Dairy Sci*, 94:2806–

2814.

**Martins JPN, Policelli RK, Neuder LM, Raphael W, Pursley JR.** 2011b. Effects of cloprostenol sodium at final prostaglandin F2 $\alpha$  of Ovsynch on complete luteolysis and pregnancy per artificial insemination in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, 94:2815–2824.

**Orihuela A.** 2000. Some factors affecting the behavioural manifestation of oestrus in cattle: a review. *Appl Anim Behav Sci*, 70:1–16.

**Platz S, Ahrens F, Bendel J, Meyer HHD, Erhard MH.** 2008. What Happens with Cow Behavior When Replacing Concrete Slatted Floor by Rubber Coating: A Case Study. *J Dairy Sci*, 91:999–1004.

**Pursley JR, Martins JPN.** 2011. Impact of circulating concentrations of progesterone and antral age of the ovulatory follicle on fertility of high-producing lactating dairy cows. *Reprod Fertil Dev*, 24:267–271.

**Pursley JR, Wiltbank MC, Stevenson JS, Ottobre JS, Garverick HA, Anderson LL.** 1997a. Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. *J Dairy Sci*, 80:295–300.

**Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC.** 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 $\alpha$  and GnRH. *Theriogenology*, 44:915–923.

**Pursley JR, Kosorok MR, Wiltbank MC.** 1997b. Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. *J Dairy Sci*, 80:301–306.

**Ribeiro ES, Monteiro APA, Lima FS, Ayres H, Bisinotto RS, Favoreto M, Greco LF, Marsola RS, Thatcher WW, Santos JEP.** 2012. Effects of presynchronization and length of proestrus on fertility of grazing dairy cows subjected to a 5-day timed artificial insemination protocol. *J Dairy Sci*, 95:2513–2522.

**Sartori R, Rosa GJM, Wiltbank MC.** 2002. Ovarian structures and circulating steroids in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J Dairy Sci*, 85:2813–2822.

**Sartori R, Haughian JM, Shaver RD, Rosa GJM, 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.

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

**Savio JD, Boland MP, Roche JF.** 1990. Development of dominant follicles and length of ovarian cycles in post-partum dairy cows. *J Reprod Fertil*, 88:581–591.

**Souza AH, Gumen A, Silva EPB, Cunha AP, Guenther JN, Peto CM, Caraviello DZ, Wiltbank MC.** 2007. Supplementation with Estradiol-17 $\beta$  Before the Last Gonadotropin-Releasing Hormone Injection of the Ovsynch Protocol in Lactating Dairy Cows. *J Dairy Sci*, 90:4623–4634.

**Souza AH, Ayres H, Ferreira RM, Wiltbank MC.** 2008. A new presynchronization system (Double-Ovsynch) increases fertility at first postpartum timed AI in lactating dairy cows. *Theriogenology*, 70:208–215.

**Spalding RW, Everett RW, Foote RH.** 1975. Fertility in New York Artificially Inseminated Holstein Herds in Dairy Herd Improvement. *J. Dairy Sci*, 58:718–723.

**Strickland J, Martins JPN, Neuder LM, Pursley JR.** 2010. Effect of 14/11 Presynch/Ovsynch on 1st service conception rates of lactating dairy cows compared to AI following a detected estrus. Abstracts of the 43<sup>rd</sup> Annual Conference of the American Association of Bovine Practitioners, 2010, Albuquerque, NM, USA.

**Vasconcelos JL, Silcox RW, Rosa GJ, Pursley JR, Wiltbank MC.** 1999. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. *Theriogenology*, 52:1067–1078.

**Vasconcelos JLM, Sangsritavong S, Tsai SJ, Wiltbank MC.** 2003. Acute reduction in serum progesterone concentrations after feed intake in dairy cows. *Theriogenology*, 60:795–807.

**Washburn SP, Silvia WJ, Brown CH, McDaniel BT, McAllister AJ.** 2002. Trends in Reproductive Performance in Southeastern Holstein and Jersey DHI Herds. *J Dairy Sci*, 85:244–251.

**Wiltbank M, Lopez H, Sartori R, Sangsritavong S, Gümen A.** 2006. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology*, 65:17–29.

**Wiltbank MC, Souza AH, Carvalho PD, RW. Bender, Nascimento AB.** 2011. Improving fertility to timed artificial insemination by manipulation of circulating progesterone concentrations in lactating dairy cattle. *Reprod Fertil Dev*, 24:238–243.

**Wiltbank MC, Pursley JR.** 2014. The cow as an induced ovulator: timed AI after synchronization of ovulation. *Theriogenology*, 81:170–185.

**Wiltbank MC, Fricke PM, Sangsritavong S, Sartori R, Ginther OJ.** 2000. Mechanisms that prevent and produce double ovulations in dairy cattle. *J Dairy Sci*, 83:2998–3007.

**Wolfenson D, Inbar G, Roth Z, Kaim M, Bloch A, Braw-Tal R.** 2004. Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. *Theriogenology*, 62:1042–1055.

**Xu Z, Garverick HA, Smith GW, Smith MF, Hamilton SA, Youngquist RS.** 1995. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biol Reprod*, 53:951–957.

## Aspectos e Mecanismos da Baixa Fertilidade em Vacas Anovulatórias

J. E.P. Santos<sup>1</sup>, M.C. Wiltbank<sup>2</sup>, E.S. Ribeiro<sup>3</sup> e R. S. Bisinotto<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Department of Animal Sciences, D. H. Barron Reproductive and Perinatal Biology Research Program, University of Florida, Gainesville, FL, USA

<sup>2</sup> Department of Dairy Science, University of Wisconsin, Madison, USA

<sup>3</sup> Department of Animal Biosciences, University of Guelph, Guelph, Canada

<sup>4</sup> Department of Veterinary Population Medicine, University of Minnesota, St. Paul, MN, USA

### Resumo

O período anovulatório pós-parto é um processo natural observado na maioria dos mamíferos, inclusive nas mulheres. Em vacas leiteira durante a lactação, o intervalo entre o parto e a primeira ovulação normalmente varia entre 4 a 5 semanas, mas uma número grande de vacas não retorna a atividade cíclica ovariana até os 60 dias pós-parto. O atraso prolongado no retorno à primeira ovulação pós-parto está associado a efeitos negativos na fertilidade de vacas leiteiras que perduram por um longo prazo, incluindo a ausência de cio espontâneo e atraso na primeira inseminação artificial (IA) pós-parto. Entretanto, mesmo quando vacas anovulares são inseminadas após sincronização do ciclo estral para IA em tempo fixo, a prenhez por IA ainda é reduzida e o risco de perda de prenhez é aumentado. Vários são os fatores de risco para o desenvolvimento de períodos anovulatórios prolongados durante o pós-parto. Dentre eles, podemos citar o balanço nutricional negativo e desenvolvimento de doenças, e estes fatores de riscos por si só são também conhecidos por diminuir a fertilidade. Um aspecto importante em vacas anovulares quando inseminadas é que elas desenvolvem o folículo ovulatório em concentrações de progesterona baixas ou consideradas subleais. A progesterona produzida pelo o corpo lúteo (CL) é essencial para o controle do desenvolvimento folicular, competência do oócito, crescimento embrionário e função endometrial; no entanto, muitos desses efeitos causados pela progesterona são mediados ou pela secreção de gonadotropinas influenciando a função folicular e competência do oócito ou pela secreção de histotrofo do endométrio influenciando o crescimento do embrião/conceito e sua subsequent diferenciação celular. Baixas concentrações de progesterona durante o crescimento folicular em vacas anovulares afeta a qualidade da mórula e do blastocisto inicial, altera a expressão genica do conceito e afeta a função do endométrio aumentando a produção de prostaglandina F<sub>2α</sub>. Quando vacas anovulares recebem suplementação de progesterona em quantidades apropriadas durante o estágio antral do desenvolvimento do folículo ovulatório, a prenhez por IA é restabelecida e se assemelha àquela observada em vacas que desenvolveram o folículo durante o diestro. Dados preliminares sugerem que a concentração mínima de progesteronas durante o crescimento folicular necessária

para otimizar a fertilidade em vacas anovulares é de pelo menos 2,0 ng/mL.

### Introdução

Vacas em lactação são conhecidas por apresentarem fertilidade inadequada a qual pode ser avaliada através de prenhez por inseminação artificial (P/IA) ou pelo aumento em perda de prenhez durante os primeiros meses de gestação (Santos et al., 2004). Dados recentes de fazendas leiteiras dos Estados Unidos indicam que P/IA tem permanecido de certa forma estável nos últimos 10 anos, por volta de 33%, enquanto que a taxa de prenhez, que é a taxa em que vacas ficam prenhe medida em um intervalo de 21-d, aumentou e o intervalo entre partos reduziu consideravelmente (Bisinotto et al., 2014). Acredita-se que as melhorias observadas na performance reprodutiva em rebanhos leiteiros nos Estados Unidos são, em parte, resultado da melhor utilização de programas reprodutivos. Entretanto, ganhos expressivos em genética para fertilidade da filha também foram alcançados e provavelmente P/IA irá aumentar no futuro próximo.

Um dos obstáculos para fertilidade apropriada em vacas leiteiras é o atraso no resumo da ciclicidade estral durante os primeiros 2 meses pós-parto (Santos et al., 2009). A ausência de ciclicidade estral, um fenômeno também denominado de anovulação (Wiltbank et al., 2002), geralmente afeta 25% de vacas leiteiras até aproximadamente 65 dias em lactação (Walsh et al., 2007; Santos et al., 2009). Apesar disso, alguns rebanhos podem ter uma prevalência de até 40% de vacas anovulares até o final do período de espera voluntário, em casos em que a sanidade periparto é inadequada e/ou manejo nutricional é precário (Walsh et al., 2007; Santos et al., 2009). Vacas anovulares submetidas a programas de sincronização para IA em cio ou IA em tempo fixo normalmente apresentam baixa P/IA (Santos et al., 2009; Bisinotto et al., 2010) e elevada perda de prenhez em comparação a vacas cíclicas do mesmo rebanho (Santos et al., 2004; Bisinotto et al., 2010). Semelhante a vacas anovulares, vacas que desenvolvem o folículo ovulatório com baixa concentração de progesterona durante a última semana de crescimento apresentam P/IA tão baixa quanto as vacas anovulares (Bisinotto et al., 2010). Tal resposta sugere que um dos culpados pela baixa fertilidade

em vacas anovulares é provavelmente a falta de adequada concentrações de progesterona mediando o estágio final de crescimento folicular e/ou afetando o meio endócrino durante o proestro e a função uterina durante o período pós-ovulatório (Cerri et al., 2011a; 2011b; Shaham-Albalancy et al., 1997; 2001).

Uma estratégia para evitar os efeitos negativos de baixa concentração de progesterona endógena na fertilidade é sua suplementação com fontes exógenas em pontos estratégicos na tentativa de melhorar a P/IA em vacas leiteiras. Porém, as respostas a suplementação com progesterona são variáveis (Wiltbank et al., 2012a), e frequentemente a tática simplista de “uma abordagem que serve para todos” é utilizada por fisiologistas da reprodução e médicos veterinários, o que não parece ter sido muito eficaz (Bisinotto et al., 2012; Wiltbank et al. 2012a). As perguntas que precisam ser feitas são: quais vacas precisam de suplementação de progesterona; quando estas vacas devem ser suplementadas, e quanta progesterona precisa ser suplementada para otimizar o estabelecimento e manutenção da prenhez em vacas em lactação. Outro método para reduzir o impacto da condição anovular em vacas leiteiras, mas de longo prazo, é a seleção genética de vacas com base em marcadores genômicos ligados a um resurgimento mais precoce da 1ª ovulação no pós-parto.

### **O Papel da Progesterona no Controle da Reprodução**

O hormônio esteroide progesterona é sintetizado pelo corpo lúteo (CL; Mason and Savard, 1964), pela placenta (Conley and Ford, 1987), pelas glândulas suprarrenais (Wagner et al., 1972), e pelo sistema nervoso central e periférico (Schumacher et al., 2004), mas a de origem luteal tem maior importância para regulação dos eventos reprodutivos em bovinos. Por esse motivo, progesterona é considerado um dos esteroides ovarianos chaves na regulação do ciclo estral em fêmeas. Além disso, concentrações inapropriadas durante diferentes fases do ciclo e durante a gestação podem comprometer a fertilidade de vacas leiteiras.

Progesterona de origem luteal foi estabelecida como um hormônio regulador dos eventos reprodutivos em fêmeas bovinas depois da observação de que a presença do CL era necessária para o estabelecimento e manutenção da gestação (Fraenkel and Cohn, 1901; Magnus, 1901; Corner and Allen, 1929). Estudos subsequente descreveram o complexo mecanismo no qual a progesterona estimula a secreção de nutrientes e fatores de crescimento pelas glândulas endometriais, coletivamente chamadas de histiotrofo (Bazer et al., 2008). Recentemente, estudos documentaram e enfatizaram o papel da progesterona em preparar o útero para um adequado desenvolvimento do conceito bovino após a eclosão da zona pelúcida (Brandão et al., 2004; Alexopoulos et al., 2005), salientando assim a importância da progesterona em estimular as glândulas uterinas durante o processo de manutenção da gestação em bovinos.

Apesar disso, a importância da progesterona na regulação da reprodução em vacas leiteiras vai além de seu papel na coordenação da função uterina durante o período

pós-fertilização e os estágios embrionários iniciais. A progesterona desempenha um papel importante na coordenação do crescimento do folículo e na qualidade do oócito através de seus efeitos na pulsatilidade do hormônio luteinizante (LH). Vacas em lactação classificadas como tendo baixa concentração de progesterona na semana que precede o estro espontâneo tiveram redução na P/IA quando comparadas com vacas que tiveram concentração de progesterona elevada durante o mesmo período (Folman et al., 1973). Semelhantemente, vacas nas quais o folículo ovulatório desenvolveu na ausência de um CL maduro tiveram fertilidade reduzida em comparação com aquelas em que os folículos cresceram durante o diestro (Bisinotto et al., 2010). Estas diferenças em fertilidade em vacas com baixa comparada com moderada a alta concentração de progesterona durante o desenvolvimento do folículo ovulatório são, em parte, atribuídas ao papel da progesterona na regulação do crescimento folicular e maturação do oócito.

A progesterona exerce um efeito regulatório no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (Clarke and Pompolo, 2005) e diferenças na concentração de progesterona no plasma estão associadas com alterações na composição do fluido folicular (Cerri et al., 2011b), expansão do cóculo e competência do oócito (Fair and Lonergan, 2012), qualidade embrionária (Rivera et al., 2011), e função uterina durante o ciclo estral subsequente (Shaham-Albalancy et al., 1997, 2001; Cerri et al., 2011b). O CL de vacas leiteiras produz grandes quantidades de progesterona (Wiltbank et al., 2012b), mas o catabolismo elevado pelo tecido esplâncnico em vacas de alta produção resulta em concentrações no sangue que são frequentemente consideradas inadequadas para otimizar a função reprodutiva (Wiltbank et al., 2006).

Pouco se sabe sobre a concentração ideal de progesterona pré- e pós-inseminação que maximiza fertilidade em vacas leiteiras. Vários exemplos existem mostrando falha na resposta a suplementação com progesterona para melhorar a fertilidade em bovinos (Monteiro Jr. et al., 2014; Wiltbank et al., 2012a; 2014). Em alguns casos, falhas ocorreram porque os sistemas de utilizados para suplementar progesterona são inadequados ou resultam em concentrações sistêmicas consideradas sub-luteais. Em outros casos, até diminuição na fertilidade foi observado com a suplementação de progesterona após inseminação em vacas recebendo transferência de embrião (Monteiro Jr. et al., 2015).

### **Baixa Progesterona Afeta a Qualidade Folicular e Embrionária e Influência a Função Endometrial**

A progesterona, embora crítica para o estabelecimento e manutenção da prenhez, é conhecida por exercer pouco ou nenhum efeito direto sobre o oócito e desenvolvimento embrionário inicial (Lonergan et al., 2016). O impacto da progesterona mediando qualidade embrionária e alongamento do conceito são indiretos e, provavelmente, causados pela combinação dos efeitos na frequência de pulso de LH durante o desenvolvimento folicular e na função endometrial durante o período pós-ovulatório (Lonergan et al., 2016; Santos et al., 2016).

**Tabela 1.** Efeito da concentração de progesterona durante o desenvolvimento folicular na qualidade embrionária em vacas em lactação<sup>1</sup>

Item	Tratamento <sup>2</sup>		P
	Baixa progesterona	Alta progesterona	
Fertilização, % (n/n)	78.8 (26/33)	77.1 (37/48)	0.43
Grau de qualidade, 1 to 4	2.4	1.5	0.01
Grau 1, % (n/n)	34.6 (9/26)	67.6 (25/37)	0.01
Grau 2, % (n/n)	26.9 (7/26)	18.9 (7/37)	0.29
Grau 1 e 2, % (n/n)	61.5 (16/26)	86.5 (32/37)	0.02
Grau 4, % (n/n)	34.6 (9/26)	8.1 (3/37)	0.01

<sup>1</sup> Dados de Wiltbank et al. (2011).

<sup>2</sup> Vacas foram sincronizadas para iniciar o protocolo de IA em tempo fixo Ovsynch (GnRH, d7 PGF<sub>2α</sub>, 56 h GnRH, 16 h AI) iniciando no dia 7 do ciclo estral. Vacas com baixa progesterona receberam uma injeção de PGF<sub>2α</sub> 1 d depois do início do protocolo de IA em tempo fixo Ovsynch para regredir o pre-existente CL, enquanto que vacas com alta progesterona não receberam tratamento hormonal adicional.

Células foliculares ovarianas bovinas tais como aquelas do complexo cúmulos-oócito são responsivas a progesterona e diferenças existem na atividade esteroidogênica entre folículos dominantes da primeira comparado com os da segunda onda folicular (Badinga et al., 1992). Folículos dominantes da primeira onda, os quais se desenvolveram sob baixas concentrações de progesterona sistêmica tem alta atividade da aromatase e as concentrações de progesterona dentro do fluido folicular é elevada comparada com a do plasma sanguíneo (Badinga et al., 1992; Cerri et al., 2001b). De fato, a manipulação da concentração de progesterona no plasma não altera a concentração de progesterona no fluido folicular em vacas leiteiras (Cerri et al., 2001b). Portanto, os efeitos da baixa concentração de progesterona no plasma na função folicular muito provável são mediados pelas mudanças na pulsatilidade de LH, e não pelo efeito direto da progesterona nas células foliculares.

É bem descrito que receptores da progesterona estão presentes no núcleo arqueado do hipotálamo em neurônios liberadores de kisspeptina, e ativação desses receptores atenua a liberação de kisspeptina a qual diminui a pulsatilidade do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH; Clarke e Pompolo, 2005). A progesterona influencia a liberação de LH, a qual pode ser notada pela redução na frequência de pulsos de LH durante a fase lútea comparada com a fase folicular do ciclo estral na ovelha (Clarke, 1995), e durante o metaestro em comparação com o diestro em vacas leiteiras (Endo et al., 2012). De fato, o tratamento com progesterona exógena diminui a frequência de pulsos de LH em ovelhas ovariectomizadas (Goodman and Karsch, 1980; Goodman et al., 1982) e vacas leiteiras no pós-parto (Nation et al., 2000). Ainda assim, dados sugerem que a progesterona não afeta a quantidade de receptores de GnRH na glândula pituitária (Schoenemann et al., 1985) e o feedback negativo da progesterona na liberação de LH é observado principalmente no hipotálamo (Clarke and e Pompolo, 2005), e não na pituitária (Lane et al., 2009). Uma vez que neurônios contendo GnRH não expressão receptores de

progesterona (Herbison et al., 1996; Skinner et al., 2001), as ações deste esteróide na liberação de GnRH são mediadas por alterações que ocorrem na secreção de kisspeptina. Quando vacas são expostas a baixa concentração de progesterona, ocorre um aumento na concentração basal de LH, o crescimento folicular é acelerado, e a composição folicular é alterada (Cerri et al., 2001a; 2001b). Apesar deste modelo não se assemelhar por completo com os de dominância folicular prolongada, as alterações na pulsatilidade de LH provocada pela baixa concentração de progesterona provavelmente influenciam a qualidade do oócito pelos seus efeitos nas junções gap, fosforilação precoce proteínas do ciclo celular, e reativação da meiose do estágio diplóteno da prófase I (Santos et al., 2016). O avanço na maturação do oócito induzida pelo aumento na pulsatilidade de LH quando a concentração de progesterona é baixa comprometem o desenvolvimento embrionário inicial e o alongamento do concepto (Wiltbank et al., 2011).

Wiltbank et al. (2011) alocou vacas para iniciarem o protocolo de inseminação em tempo fixo Ovsynch no dia 7 do ciclo estral, mas manipulou as concentrações de progesterona de forma que em um tratamento vacas desenvolveram o folículo pré-ovulatório em baixa concentração de progesterona e no outro tratamento em alta concentração de progesterona. Tratamentos foram obtidos através da administração de prostaglandina (PG) F<sub>2α</sub> concomitante com o início do protocolo Ovsynch para regredir o CL pré-existente no dia 7 do ciclo estral. Com isso, os autores criaram dois tratamentos, um na qual o folículo pré-ovulatório desenvolveu na presença do novo CL ainda em formação (baixa progesterona) e o outro tratamento na qual o folículo pré-ovulatório desenvolveu com ambos, o CL pré-existente e o novo CL em formação (alta progesterona). No dia 7 após a IA, oócitos-embriões foram coletados por lavagem do útero, e um total de 81 oócitos-embriões foram obtidos de 168 vacas no experimento. A fertilização foi similar entre os tratamentos, mas a qualidade embrionária foi reduzida de maneira considerável em vacas do tratamento com baixa progesterona (Tabela 1). Uma diminuição da

qualidade embrionária similar foi observada quando vacas em lactação foram sujeitas a tratamentos superestimulatórios com FSH durante o início do metaestro, quando a concentração de progesterona é naturalmente baixa (Rivera et al., 2011). Curiosamente, em experimentos com doadoras de embrião, a suplementação de progesterona utilizando 2 dispositivos intravaginais resultou em concentrações de progesterona similares àquelas observadas em vacas nas quais o uso de FSH ocorreu no início do diestro e esse tratamento restabeleceu a qualidade embrionária (Rivera et al., 2011).

É interessante que os efeitos negativos do desenvolvimento do folículo ovulatório em baixa concentração de progesterona não se limitou a redução da qualidade embrionária. Vacas anovulares e cíclicas iniciando o protocolo de inseminação em tempo fixo com baixa concentração de progesterona tiveram um aumento no risco de perda de prenhez nos primeiros 60 dias de gestação (Bisinotto et al., 2010). É bem estabelecido que a progesterona no ciclo estral precedente a IA influencia a função endometrial no ciclo subsequente (Shaham-Albalancy et al., 1997; 2001). Vacas que desenvolveram o folículo ovulatório sob baixa concentração de progesterona tiveram um aumento precoce na expressão da proteína do receptor de estrógeno- $\alpha$  no período pós-ovulatório e produziram mais PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  em resposta a um desafio com ocitocina quando comparadas com vacas que desenvolveram o folículo ovulatório sob alta concentração de progesterona (Cerri et al., 2011b). Na verdade, essas vacas anovulares ou que desenvolvem o folículo pré-ovulatório sob baixa concentração de progesterona são mais suscetíveis a apresentarem fases lúteas de curta duração (Cerri et al., 2011b), o qual é devastador para a manutenção da prenhez em bovinos.

Embora qualidade embrionária é comprometida em vacas anovulares, muitas ainda apresentam um conceito alongado no dia 15 da gestação. Apesar disso, conceitos de vacas anovulares apresentam alterações marcantes em seu transcriptoma indicando alterações moleculares que parecem comprometer a sobrevivência subsequente e explicar o aumento na perda de prenhez em períodos embrionários tardios ou fetal. Ribeiro et al. (2016a) identificou diferenças na expressão de 500 transcriptos entre vacas holandesas anovulares e vacas cíclicas. Destes, 262 apresentaram expressão aumentada e 238 reduzida em vacas anovulares. Muitos destes genes estão relacionados a processos de transição do conceito de tubular para filamentosos em vacas leiteiras (Ribeiro et al., 2016b). A análise funcional dos dados de transcriptoma avaliados por Ribeiro et al. (2016a) demonstrou que apoptose, via de sinalização 14-3-3, e autofagia foram preditos a estarem aumentados em conceitos de vacas anovulares em comparação ao de vacas cíclicas. Esses dados sugerem que conceitos que sobrevivem até o dia 15 da gestação têm assinaturas moleculares alteradas que podem favorecer o mecanismo de morte celular.

É importante enfatizar que não se pode ignorar que a condição anovulatória está interligada a inúmeros eventos que acontecem no início da lactação, entre eles o balanço nutricional negativo e doenças, muitas delas de origem

inflamatória. Catabolismo induzido pelo balanço energético negativo e doenças do periparto são conhecidos por afetarem a reprodução de vacas leiteiras e predisõem estas a apresentarem períodos anovulatórios prolongados (Ribeiro et al., 2016b; 2016c; Santos et al., 2009). Doenças inflamatórias como aquealias que afetam o trato reprodutivo e a glândula mamária têm impacto catastrófico na fertilidade em vacas leiteiras. Vacas que desenvolvem doenças são mais susceptíveis a permanecerem anovulares, e ambos influenciam a fertilidade em vacas leiteiras. De fato, doenças no início da lactação deixam marcas de longa duração de imprimem características moleculares indesejáveis no conceito (Ribeiro et al., 2016c), as quais provavelmente justificam, em parte, a reduzida P/IA observada em vacas anovulares.

### **Identificação de Vacas Anovulares e Estas que Respondem a Suplementação com Progesterona**

Assim como na maioria dos sistemas biológicos, provavelmente há uma concentração ideal de cada hormônio que possivelmente maximizaria a prenhez em bovinos leiteiros. Para a progesterona, essa concentração permanece desconhecida e provavelmente varia com o estágio do ciclo reprodutivo. Mesmo assim, é evidente que vacas anovulares e aquelas que desenvolvem o folículo ovulatório sob baixa concentração de progesterona têm uma redução marcante na P/IA (Bisinotto et al., 2010; Wiltbank et al., 2014; 2012a).

Um dos desafios com vacas anovulares é que a ausência de CL após um único exame ultrassonográfico dos ovários ou uma medida única da concentração de progesterona no plasma ou soro sanguíneo acabam inflando a prevalência do problema. Vacas no proestro, estro e metaestro normalmente possuem um CL pequeno ou mesmo não visível, e as concentrações de progesterona são baixas, tipicamente abaixo de 1,0 ng/mL. É por isso que a maioria dos estudos caracterizando a prevalência de vacas anovulares usam dois exames ultrassonográficos dos ovários com intervalos de 7 a 14 dias ou duas medidas seguidas de concentração de progesterona no sangue durante esse mesmo intervalo (Santos et al., 2009). Na maioria das vezes, esta abordagem para diagnosticar vacas anovulares não é praticada no campo devido à mão de obra envolvida em duas avaliações sequenciais por vaca.

Um método que tem sido utilizado de forma eficiente é um único exame ultrassonográfico dos ovários em um momento estratégico, quando baixa progesterona é conhecida por diminuir a fertilidade (Silva et al., 2007). Na verdade, um único exame ultrassonográfico no início do protocolo de sincronização é capaz de identificar não apenas a maioria das vacas anovulares, mas também um grupo de vacas conhecidas por terem baixa P/IA (Bisinotto et al., 2010; 2013). Um método similar é utilizado como norma na identificação de vacas com baixa fertilidade em fazendas em sistema de pastejo na Nova Zelândia (Rhodes et al., 2003). Na verdade, vacas cíclicas que iniciam o protocolo de IA em tempo fixo durante o proestro, estro, ou metaestro supostamente ovulam o folículo da primeira onda de crescimento folicular quando inseminadas e têm P/IA similar àquela observada em vacas anovulares (Bisinotto et

al., 2010). A observação de que a presença do CL, e não necessariamente a condição do ciclo estral, tem o maior impacto na P/IA é fato importante pois aproximadamente 25% das vacas recebendo a primeira IA no pós-parto (Santos et al., 2009) e de 22 a 46% destas recebendo a IA após resincronização (Fricke et al., 2003; Silva et al., 2009) não possuem um CL no início do protocolo de sincronização. Portanto, o uso de um único exame ultrassonográfico dos ovários no início protocolo de sincronização é sugerido como o método de escolha para selecionar vacas para terapia com suplementação de progesterona.

### Suplementação com Progesterona

A concentração de progesterona durante o diestro em vacas leiteiras é determinada pela taxa de esteroidogênese lútea e pela degradação e remoção do hormônio da circulação (Wiltbank et al., 2012b). Portanto, um catabolismo mais intensivo normalmente resulta em redução da concentração de progesterona no sangue. O mesmo conceito pode-se aplicar no caso de vacas recebendo progesterona exógena. Tratamento de novilhas com dispositivos intravaginais normalmente resulta em alterações mais marcantes nas concentrações plasmáticas de progesterona do que as observadas quando os mesmos dispositivos são utilizados em vacas leiteiras de alta produção (Macmillan et al., 1991; Cerri et al., 2009), que normalmente é atribuído ao intenso catabolismo de esteróides pelos tecidos esplâncnicos em animais com elevada ingestão de nutrientes e metabolismo hepático. Deste modo, quando o mesmo método de administração é utilizado em vacas com taxas metabólicas diferentes, não é surpresa que as concentrações de progesterona no plasma sejam muito diferentes.

O fato de que as concentrações de progesterona variam com o tipo de animal recebendo um determinado dispositivo intravaginal tem importante implicação no desenvolvimento de métodos para suplementação de progesterona. Normalmente, estes dispositivos são desenvolvidos para uma categoria animal, mas acabam sendo utilizados em todas as classes de bovinos, desde novilhas até vacas de alta produção. Um exemplo destes sistemas é o dispositivo de liberação controlada de progesterona desenvolvido por Welch et al. (1984) para o uso em ovelhas que se tornou uma alternativa às esponjas de nylon que foram utilizadas antigamente para a administração de progesterona. Esse sistema foi adaptado para utilização em bovinos posteriormente (Macmillan et al., 1990), mas foi desenvolvido para novilhas para facilitar a adoção da IA (Macmillan et al., 1991). Mais tarde, a mesma tecnologia foi adotada para o uso em vacas em lactação de tamanho mediano e baixo potencial genético para produção de leite (Macmillan e Peterson, 1993). O uso do mesmo sistema de administração controlada de progesterona em vacas de alta produção tipicamente resulta em concentrações de progesterona que representam apenas 20 a 30% do que se observa em novilhas em crescimento ou vacas de porte pequeno com baixa produtividade (Cerri et al., 2009).

### Concentração no Plasma durante o Uso de Dispositivos Intravaginal

Para a discussão subsequente, o exemplo de dispositivo de liberação controlada conhecido como CIDR será utilizado devido a abundância e familiaridade com a literatura, apesar de que a informação é pertinente a qualquer dispositivo intravaginal que libera entre 80 e 90 mg de progesterona diariamente.

O dispositivo CIDR original desenvolvido para bovinos que ainda é comercializado em muitos países contém 1.9 g de progesterona. Quando utilizado em novilhas ovariectomizadas, ele resulta em concentrações de progesterona de 5.6 ng/mL por um período de 12 dias, e as concentrações variam de 8.7 ng/mL nas primeiras horas depois de aplicado o dispositivo até 2.5 ng/mL na sua remoção no dia 12 (Macmillan et al., 1991). Essas concentrações são típicas de novilhas no início até a metade do diestro e mais do que necessário para bloquear o cio, o pico de LH e a ovulação. Na verdade, quando utilizado em novilhas no diestro, as concentrações de progesterona aumentam entre 5 e 6 ng/mL em menos de 24 horas após o tratamento (Macmillan et al., 1991). Por outro lado, o mesmo dispositivo utilizado em vacas secas em consumindo apenas pasto na Nova Zelândia que tiveram o CL regredido pela prostaglandina (PG)  $F_{2\alpha}$  resultou em uma concentração média de progesterona de 2.8 ng/mL por um período de 10 d (Macmillan et al., 1991). A concentração máxima foi no dia da aplicação do dispositivo (4.1 ng/mL) e lentamente diminuiu para 1.9 ng/mL depois de 10 d de utilização. Aravés de estudos *in vitro* e *in vivo* foi demonstrado que a liberação diária de progesterona provenientes do dispositivo CIDR é de aproximadamente 89 mg (Rathbone et al., 2001; 2002). Essa liberação é dependente primeramente na área de superfície do dispositivo em contato com a mucosa vaginal. No entanto, é improvável que o sistema de administração é estável e ele varia ao longo do período de tratamento. Na verdade, mesmo que as concentrações de progesterona em vacas leiteiras de alta produção fiquem em torno de 1 ng/mL quando 89 mg de progesterona é liberada diariamente pelo dispositivo intravaginal, muita variabilidade existe entre animais (Cerri et al., 2009). Essa variação nas concentrações refletem ou as diferenças na farmacocinética entre animais ou porque a liberação não é constante em todos os dispositivos. Provavelmente, ambos ocorrem e explicam a variação de resposta em progesterona no sangue quando vacas em lactação são tratadas com dispositivos intravaginais.

O CIDR reestruturado que é comercializado no Estados Unidos e outros países contém 1.38 g de progesterona, mas é supostamente para liberar a mesma quantidade diariamente que o dispositivo original libera (Rathbone et al., 2001; 2002). Cerri et al. (2009) avaliou as concentrações de progesterona em vacas holandesas de alta produtividade que estavam cíclicas, mas que receberam um CIDR novo (1.38 g de progesterona) ou um dispositivo com 7 dias de utilização depois de regredir seus CL. Os autores demonstraram que o CIDR liberando 89 mg de progesterona diariamente (Rathbone et al., 2001; 2002) aumentou as concentrações plasmáticas aproximadamente 0,8 a 1,0



**Tabela 2.** Efeito da presença do corpo luteo (CL) e da suplementação de progesterona para vacas sem CL no início do protocolo Ovsynch em respostas de fertilidade

	Tratamento <sup>1</sup>		
	Sem CL Controle	Sem CL Progesterona	Diestro
	----- % (n.) -----		
Estro na IA			
Bisinotto et al. (2013)	34.2 (234)	36.2 (218)	35.0 (946)
Bisinotto et al. (2015a)	35.8 (652)	39.6 (635)	30.6 (640)
Média de estro na IA	35.4	38.7	33.2
Prenhez dia 60			
Bisinotto et al. (2013)	28.6 (234)	43.7 (215)	47.3 (941)
Bisinotto et al. (2015a)	28.9 (642)	37.2 (630)	33.9 (633)
Média de prenhez no dia 60	28.8	38.9	41.9
Perda de Prenhez			
Bisinotto et al. (2013)	6.9 (72)	5.1 (99)	4.7 (467)
Bisinotto et al. (2015a)	8.5 (208)	11.4 (260)	8.8 (231)
Média da perda de prenhez	8.1	9.7	6.1

<sup>1</sup> Todas as vacas foram submetidas a um protocolo de IA em tempo fixo denominado 5-d TAI protocol (Bisinotto et al., 2013) ou ao protocolo Ovsynch-56 (Bisinotto et al., 2015a). Sem CL controle = vacas sem um CL no dia do primeiro GnRH que não receberam suplementação de progesterona; Sem CL Progesterona = vacas sem um CL no dia do primeiro GnRH que receberam dois dispositivos intravaginal contendo 1.38 g de progesterona cada; Diestro = vacas com CL no dia do primeiro GnRH do protocolo de IA em tempo fixo.

ng/mL (Cerri et al., 2009). As concentrações aumentaram durante os primeiros 15 min e atingiram um plateau dentro de 90 min após a inserção do dispositivo. Semelhante aos achados de McMillan et al. (1991), as concentrações diminuíram ao longo da utilização do dispositivo, mas em vacas holandesas em lactação, a concentração caiu para 0,5 a 0,7 ng/mL depois de 7 dias de uso. Essas concentrações de progesterona em vacas de leite são suficientes para bloquear o cio, o pico de LH e a ovulação, mas não são ideais para melhorar a fertilidade quando o objetivo é suplementar progesterona a vacas sem CL (Bisinotto et al., 2015a; Bisinotto e Santos, 2012). Isto provavelmente explica o porquê de estudos no passado demonstraram que um único CIDR incorporado em programas de IA em tempo fixo resulta em respostas inconsistentes em vacas anovulares (Bisinotto e Santos, 2012). O aumento na progesterona resultante de um único dispositivo é provavelmente insuficiente para otimizar a maturação folicular e do oócito durante o estágio final de desenvolvimento antes da IA, ou mesmo sensibilizar o endométrio para adequada função pós-inseminação durante o desenvolvimento do conceito e manutenção da prenhez.

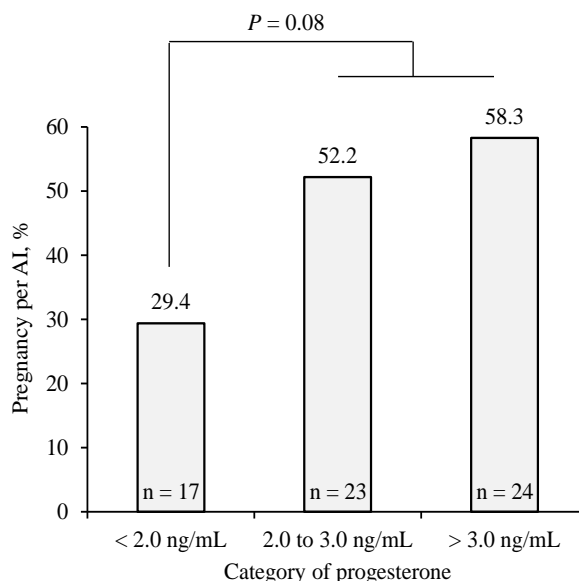
Uma vez que a liberação de progesterona do dispositivo intravaginal é dependente principalmente na área de superfície em contato com a mucosa vaginal (Rathbone et al., 2001; 2002), não é uma surpresa que utilizar vários dispositivos aumenta a progesterona no plasma em uma maneira paralela ao número utilizado (McMillan et al., 1991; Lima et al., 2009). Isto é importante porque em muitos países a aprovação de novos dispositivos é dispendioso, mas oportunidades existem para utilização dos dispositivos atuais para determinados animais que necessitam de uma dose diária de 180 a 200 mg de progesterona.

#### Suplementação de Progesterona em Programas de Sincronização

Programas para sincronização da ovulação e IA em tempo fixo são utilizados como uma ferramenta de manejo para controle sistemático da reprodução em rebanhos leiteiros. Programas de IA em tempo fixo permitem que todas as vacas elegíveis para inseminação sejam inseminadas em dia pré-determinado com P/IA satisfatória, o que normalmente melhora taxa de prenhez especialmente quando a detecção de cio é ineficiente (Tenhagen et al., 2004) ou quando substitui-se a monta natural por IA (Lima et al., 2012). A fertilidade de vacas em lactação cíclicas e anovulares induzidas a ovular um folículo dominante da primeira onda é baixa (Bisinotto et al., 2010). Folículos da primeira onda que desenvolvem concomitantemente com o CL e, portanto, sob baixas concentrações de progesterona resultam em alterações na composição do fluido folicular (Cerri et al., 2011b), alterações na função endometrial (Cerri et al., 2011b), diminuição da qualidade embrionária (Rivera et al., 2011; Wiltbank et al., 2011), e P/IA comprometida (Bisinotto et al., 2010). Mais relevante, é o fato de que a progesterona provavelmente media essas alterações na resposta reprodutiva de vacas que ovulam o folículo dominante da primeira onda folicular (Bisinotto et al., 2013).

Programas de IA em tempo fixo oferecem uma plataforma única para a manipulação do folículo ovulatório em ordem a melhorar a P/IA em vacas leiteiras. Uma destas oportunidades é a suplementação de progesterona para vacas que são identificadas como anovulares ou em estágio do ciclo estral onde há ausência de um CL funcional. A ausência de CL no início do protocolo de IA em tempo fixo é pré-determinante de baixa fertilidade e, portanto, torna-se lógico que a identificação de vacas sem CL seria um grupo alvo para receber suplementação com progesterona (Bisinotto et al., 2013; 2015a).

É importante enfatizar que programas de sincronização baseados no uso de estrógeno como os com benzoato de



**Figura 1.** Prenhez para a IA no dia 32 depois da inseminação baseado nas concentrações de progesterona durante o crescimento folicular em vacas que receberam 2 dispositivos intravaginal contendo progesterona durante o crescimento folicular no protocolo Ovsynch. Vacas foram categorizadas como tendo progesterona < 2.0 ng/mL ( $1.66 \pm 0.32$  ng/mL), de 2.0 a 3.0 ng/mL ( $2.53 \pm 0.26$  ng/mL), ou > 3.0 ng/mL ( $3.97 \pm 0.89$  ng/mL) entre o dia do primeiro GnRH e o dia da PGF<sub>2α</sub>. Dados de Bisinotto et al. (2015a).

estradiol necessitam uma fonte exógena de progesterona (Baruselli et al., 2004), caso contrário vacas sem um CL quando o estrógeno é administrado ou vacas que regridem o CL depois do tratamento com estrógeno não sincronizarão o cio e ovulação adequadamente.

#### Suplementação de Progesterona durante o Protocolo de IA em Tempo Fixo de acordo com a Presença de CL

Inúmeros estudos avaliaram o impacto da suplementação com progesterona durante protocolos de IA em tempo fixo na fertilidade de vacas leiteiras. Bisinotto et al. (2013; 2015a) avaliou o efeito da suplementação de progesterona em protocolos de sincronização baseados em GnRH-PGF<sub>2α</sub>. Os autores mostraram que o incremento das concentrações de progesterona no sangue acima de 2,0 ng/mL com o uso de dois dispositivos intravaginal restabeleceu a fertilidade de vacas sem CL semelhante à de vacas que estavam no diestro. Os dados de Bisinotto et al. (2015a) sugerem que um mínimo de aproximadamente 2,0 ng/mL é necessário durante o desenvolvimento do folículo ovulatório para otimizar a fertilidade de vacas leiteiras de alta produção (Figura 1). Tal resposta provavelmente explica a falta de benefício em vários experimentos com o uso de um único dispositivo intravaginal que resulta em 0,8 a 1,0 ng/mL em vacas sem CL (Bisinotto e Santos, 2012).

Na verdade, a suplementação de progesterona para vacas sem CL com o uso de 2 dispositivos intravaginais (Bisinotto et al., 2013; 2015a), para fornecer aproximadamente 180 mg por dia (Rathbone et al., 2001;

2002), resultou em P/IA semelhante à de vacas em diestro no início do protocolo de IA em tempo fixo (Tabela 2). A melhoria observada foi de aproximadamente 10 pontos percentuais em P/IA (Bisinotto et al., 2013; 2015a).

Boa parte dos experimentos avaliando o uso da suplementação de progesterona não foram necessariamente delineados considerando a quantidade necessária de progesterona para vacas leiteiras fornecida pelo dispositivo intravaginal. Por causa disto, não é uma surpresa que as respostas com suplementação com progesterona durante programas de sincronização não são consistentes (Bisinotto et al., 2012). Essa inconsistência nos resultados nos levou a conduzir uma revisão sistemática da literatura sobre o uso desuplementação de progesterona durante programas de IA em tempo fixo em vacas em lactação (Bisinotto et al., 2015b). Um total de 25 experimentos controlados incluindo 16,683 vacas leiteiras, metade sendo suplementada e a outra metade controles não tratadas foram incluídas na meta-análise. Uma porção dos estudos, incluindo 13,762 vacas (82,5% do total de vacas) tinha informação se as vacas estavam no diestro ou se não tinham um CL quando o protocolo de IA em tempo fixo foi iniciado. Além disso, foi coletado dados de detecção de cio durante o protocolo de IA em tempo fixo e se as vacas tinham o ciclo estral pré-sincronizados ou não antes entrarem no programa de IA em tempo fixo. A meta-análise revelou que a suplementação de progesterona aumentou a P/IA nos dias 32 e 60 depois da inseminação em 8 (risco relativo [RR] = 1.08; 95% intervalo de confiança [IC] = 1.03 a 1.17) e 10% (RR = 1.10; 95% IC = 1.03 a 1.17), respectivamente. Curiosamente, o benefício das vacas tratadas com progesterona durante o protocolo de IA em tempo fixo foi maior em vacas sem CL (P/IA no dia

60: RR = 1.18; 95% IC = 1.07 a 1.30) do que as vacas em diestro (RR = 1.06; 95% IC = 0.99 a 1.12). Além do mais, a suplementação de progesterona beneficiou a P/IA apenas quando todas as vacas foram submetidas a IA em tempo fixo, mas não quando foi realizada detecção de cio durante o experimento. Quando detecção de cio era realizado durante o protocolo de sincronização, e vacas podiam ser inseminadas se observadas em cio, a progesterona então não aumentou a P/IA. Coletivamente, estes resultados mostraram que vacas sem CL se beneficiam da suplementação com progesterona, mas o fornecimento de 80 a 90 mg de progesterona/dia para vacas holandesas de alta produção não parece ser ideal. Os resultados também demonstraram que um dos benefícios da suplementação de progesterona é uma melhor sincronização do cio/ovulação nesses programas porque detecção de cio e inseminação durante o protocolo anulou os efeitos positivos da suplementação na fertilidade.

### Conclusão

O atraso no retorno a 1ª ovulação pós-parto após os 60 dias em lactação afeta uma grande porção das vacas leiteiras, aproximadamente 25% delas. Vacas em condição anovulatória têm como característica o desenvolvimento do folículo ovulatório sob baixas concentrações de progesterona quando submetidas a programas de inseminação onde o ciclo estral é sincronizado. Essas concentrações sub-ótimas de progesterona durante o crescimento folicular é um dos obstáculos para adequada fertilidade e claramente diminui P/IA em vacas submetidas a sincronização do cio e ovulação. A fertilidade comprometida observada em vacas anovulares é atribuída a alterações no folículo/oócito que eventualmente afetam o desenvolvimento embrionário, mas também aos efeitos no conceito e útero que influenciam a receptividade a prenhez e manutenção do CL. A suplementação de progesterona para vacas leiteiras de alta produção nem sempre melhorou a fertilidade de forma consistente. Em muitos casos, a falta de reposta positiva em P/IA com a suplementação de progesterona é atribuída ao método de administração que nem sempre foi ideal para o tipo de vaca em questão. Quando as quantidades de progesterona fornecidas para vacas anovulares e vacas sem CL no início do protocolo de IA em tempo fixo for adequadas, a fertilidade então se tornou similar àquela observada em vacas iniciando a sincronização durante o diestro. Com base em dados preliminares, é sugerido que um mínimo de 2,0 ng/mL seja necessário durante o desenvolvimento do folículo para melhorar a fertilidade de vacas leiteiras. Alcançando esta concentração com suplementação de progesterona resultou em aumento de P/IA de aproximadamente 10 pontos percentuais, igualando àquela observada em vacas no diestro. Por outro lado, quando a suplementação de progesterona aumentou a concentração no plasma apenas 0,8 a 1,0 ng/mL, os aumentos em P/IA se limitaram a 3 a 5 pontos percentuais, o que não é suficiente para atingir valores de P/IA observados em vacas no diestro.

### Agradecimentos

Os experimentos conduzidos pelos autores e apresentados nessa revisão foram patrocinados por projetos das seguintes agências de fomento a pesquisa: Southeast Milk Inc. Checkoff Program (Belleview, FL); National Institute of Food and Agriculture, United States Department of Agriculture processo 2015-67015-23313.

### Referências

- Alexopoulos, N. I., G. Vajta, P. Maddox-Hyttel, A. J. French, and A. O. Trounson.** 2005. Stereomicroscopic and histological examination of bovine embryos following extended in vitro culture. *Reprod. Fertil. Dev.* 17:799-808.
- Bazer, F. W., R. C. Burghardt, G. A. Johnson, T. E. Spencer, and G. Wu.** 2008. Interferons and progesterone for establishment and maintenance of pregnancy: interactions among novel cell signaling pathways. *Reprod. Biol.* 8:179-211.
- Badinga, L., M. A. Driancourt, J. D. Savio, D. Wolfenson, M. Drost, R. L. De La Sota, and W. W. Thatcher.** 1992. Endocrine and ovarian responses associated with the first-wave dominant follicle in cattle. *Biol. Reprod.* 47:871-883.
- Baruselli, P. S., E. L. Reis, M. O. Marques, L. F. Nasser, and G. A. Bó.** 2004. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83:479-486.
- Bisinotto, R.S., L.O. Castro, M.B. Pansani, C.D. Narciso, N. Martinez, L.D.P. Sinedino, T.L.C. Pinto, N.S. Van de Burgwal, H.M. Bosman, R.S. Surjus, W.W. Thatcher, and J.E.P. Santos.** 2015a. Progesterone supplementation to lactating dairy cows without corpus luteum at the initiation of the Ovsynch protocol. *J. Dairy Sci.* 98: 2515-2528.
- Bisinotto, R.S., I.J. Lean, W.W. Thatcher, and J.E.P. Santos.** 2015b. Meta-analysis of progesterone supplementation during timed AI programs in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98:2472-2487.
- Bisinotto, R. S., E. S. Ribeiro, and J. E. P. Santos.** 2014. Synchronisation of ovulation for management of reproduction in dairy cows. *Animal Suppl.* 1:151-159.
- Bisinotto, R. S., E. S. Ribeiro, F. S. Lima, N. Martinez, L. F. Greco, L. F. Barbosa, P. P. Bueno, L. F. Scagion, W. W. Thatcher, and J. E. P. Santos.** 2013. Targeted progesterone supplementation improves fertility in lactating dairy cows without a corpus luteum at the initiation of the timed artificial insemination protocol. *J. Dairy Sci.* 96:2214-2225.
- Bisinotto, R. S., and J. E. P. Santos.** 2012. The use of endocrine treatments to improve pregnancy rates in cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* 24:258-266.
- Bisinotto, R. S., R. C. Chebel, and J. E. P. Santos.** 2010a. Follicular wave of the ovulatory follicle and not cyclic status influences fertility of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93:3578-3587.

- Brandão, D. O., P. Maddox-Hyttel, P. Lovendahl, R. Rumpf, D. Stringfellow, and H. Callesen.** 2004. Post hatching development: a novel system for extended in vitro culture of bovine embryos. *Biol. Reprod.* 71:2048-2055.
- Cerri, R. L., R. C. Chebel, F. Rivera, C. D. Narciso, R. A. Oliveira, W. W. Thatcher, and J. E. P. Santos.** 2011a. Concentration of progesterone during the development of the ovulatory follicle: I. Ovarian and embryonic responses. *J. Dairy Sci.* 94:3342-3351.
- Cerri, R. L., R. C. Chebel, F. Rivera, C. D. Narciso, R. A. Oliveira, M. Amstalden, G. M. Baez-Sandoval, L. J. Oliveira, W. W. Thatcher, and J. E. P. Santos.** 2011b. Concentration of progesterone during the development of the ovulatory follicle: II. Ovarian and uterine responses. *J. Dairy Sci.* 94:3352-3365.
- Cerri, R. L., H. M. Rutigliano, R. G. Bruno, J. E. P. Santos.** 2009. Progesterone concentration, follicular development and induction of cyclicity in dairy cows receiving intravaginal progesterone inserts. *Anim. Reprod. Sci.* 110:56-70.
- Clarke, I. J., and S. Pompolo.** 2005. Synthesis and secretion of GnRH. *Anim. Reprod. Sci.* 88:29-55.
- Conley, A. J., and S. P. Ford.** 1987. Effect of prostaglandin F<sub>2</sub> alpha-induced luteolysis on in vivo and in vitro progesterone production by individual placentomes of cows. *J. Anim. Sci.* 65:500-507.
- Clarke, I. J.** 1995. Evidence that the switch from negative to positive feedback at the level of the pituitary gland is an important timing event for the onset of the preovulatory surge in LH in the ewe. *J. Endocrinol.* 145:271-282.
- Corner, G., and W. Allen.** 1929. Physiology of the corpus luteum. II. Production of a special uterine reaction (progestational proliferation) by extracts of the corpus luteum. *Am. J. Physiol.* 88:326-399.
- Endo, N., K. Nagai, T. Tanaka, and H. Kamomae.** 2012. Comparison between lactating and non-lactating dairy cows on follicular growth and corpus luteum development, and endocrine patterns of ovarian steroids and luteinizing hormone in the estrous cycles. *Anim. Reprod. Sci.* 134:112-118.
- Folman, Y., M. Rosenberg, Z. Herz, and M. Davidson.** 1973. The relationship between plasma progesterone concentration and conception in post-partum dairy cows maintained on two levels of nutrition. *J. Reprod. Fertil.* 34:267-278.
- Fraenkel, L. and F. Cohn.** 1901. Experimentelle untersuchungen des corpus luteum auf die insertion des eies (Theorie von Born). *Anatomischer Anzeiger* 20:294-300.
- Herbison, A. E., D. C. Skinner, J. E. Robinson, and I. S. King.** 1996. Androgen receptor-immunoreactive cells in ram hypothalamus: distribution and co-localization patterns with gonadotropin-releasing hormone, somatostatin and tyrosine hydroxylase. *Neuroendocrinology* 63:120-131.
- Lane, E. A., T. Sweeney, M. Ryan, J. F. Roche, and M. A. Crowe.** 2009. Relationship between serum gonadotropins and pituitary immunoreactive gonadotropins and steroid receptors during the first FSH increase of the estrous cycle and following steroid treatment in heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 112:66-82.
- Lima, F. S., R. S. Bisinotto, E. S. Ribeiro, H. Ayres, L. F. Greco, K. N. Galvão, C. A. Risco, W. W. Thatcher, and J. E. P. Santos.** 2012. Effect of one or three timed artificial inseminations before natural service on reproductive performance of lactating dairy cows not observed for detection of estrus. *Theriogenology* 77:1918-1927.
- Lima, J. R., F. A. Rivera, C. D. Narciso, R. Oliveira, R. C. Chebel, and J. E. P. Santos.** 2009. Effect of increasing amounts of supplemental progesterone in a timed artificial insemination protocol on fertility of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92:5436-5446.
- Loneragan, P.A.D., N. Forde, and T. Spencer.** 2016. Role of progesterone in embryo development in cattle. *Reprod. Fert. Dev.* 28: 66-74.
- Macmillan, K. L., and A. J.** 1993. A new intravaginal progesterone releasing device for cattle (CIDR-B) for oestrous synchronization, increasing pregnancy rates and the treatment of post-partum anoestrus. *Anim. Reprod. Sci.* 33: 1-25.
- Macmillan, K. L., V. K. Taufa, D. R. Barnes, and A. M. Day.** 1991. Plasma progesterone concentrations in heifers and cows treated with a new intravaginal device. *Anim. Reprod. Sc.* 26: 25-40.
- Macmillan, K. L., S. P. Washburn, H. V. Henderson, S. F. Petch.** 1990. Effects of varying the progesterone content of the CIDR intravaginal device and multiple CIDR treatments on plasma hormone concentrations and residual hormone content. *Proc. NZ Soc. Anim. Prod.* 50: 471-472.
- Magnus, V.** 1901. Ovariets betydning for svangerskabet med saerligt hensyntil corpus luteum. *Norsk Magazin for Laegevidenskaben* 62:1138-1142.
- Mason, N. R., and K. Savard.** 1964. Conversion of cholesterol to progesterone by corpus luteum slices. *Endocrinology* 75:215-221.
- Monteiro Jr., P.L.J., E.S. Ribeiro, R.P. Maciel, A.L.G. Dias, E. Solé Jr., F.S. Lima, R.S. Bisinotto, W.W. Thatcher, R. Sartori, and J.E.P. Santos.** 2014. Effects of supplemental progesterone after AI on expression of interferon-stimulated genes and fertility in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 97: 4907-4921.
- Monteiro Jr., P.L.J., A.B. Nascimento, G.C.S. Pontes, G.O. Fernandes, L.F. Melo, M.C. Wiltbank, and R. Sartori.** 2015. Progesterone supplementation after ovulation: effects on corpus luteum function and on fertility of dairy cows subjected to AI or ET. *Theriogenology* 84:1215-1224.
- Rathbone, M. J., C. R. Bunt, C. R. Ogle, S. Burggraaf, K. L. Macmillan, C. R. Burke, and K. L. Pickering.** 2002. Reengineering of a commercially available bovine intravaginal insert (CIDR insert) containing progesterone. *J. Control. Release* 85:105-115.
- Rathbone, M. J., J. E. Kinder, K. Fike, F. Kojima, D. Clopton, C. R. Ogle, and C. R. Bunt.** 2001. Recent advances in bovine reproductive endocrinology and physiology and their impact on drug delivery system design for the control of the estrous cycle in cattle. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 50:277-320.

- Rhodes FM, McDougall S, Burke CR, Verkerk GA, Macmillan KL.** 2003. Invited review: Treatment of cows with an extended postpartum anestrous interval. *J. Dairy Sci.* 86:1876-1894.
- Ribeiro, E.S., A.P.A. Monteiro, R.S. Bisinotto, F.S. Lima, L.F. Greco, A.D. Ealy, W.W. Thatcher, and J.E.P. Santos.** 2016a. Conceptus development and transcriptome at preimplantation stages in lactating dairy cows of distinct genetic groups and estrous cyclic statuses. *J. Dairy Sci.* 99: 4761-4777.
- Ribeiro, E.S., L.F. Greco, R.S. Bisinotto, F.S. Lima, W.W. Thatcher, and J.E.P. Santos.** 2016b. Biology of preimplantation conceptus at the onset of elongation in dairy cows. *Biol. Reprod.* 94(4):97, 1-18.
- Ribeiro, E.S., G. Gomes, L.F. Greco, R.L.A. Cerri, A. Vieira-Neto, P.L.J. Monteiro Jr., F.S. Lima, R.S. Bisinotto, W.W. Thatcher, and J.E.P. Santos.** 2016c. Carryover impact of postpartum inflammatory diseases on developmental biology and fertility in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 99:2201-2220.
- Rivera, F. A., L. G. Mendonça, G. Lopes Jr., J. E. P. Santos, R. V. Perez, M. Amstalden, A. Correa-Calderón, and R. C. Chebel.** 2011. Reduced progesterone concentration during growth of the first follicular wave affects embryo quality but has no effect on embryo survival post transfer in lactating dairy cows. *Reproduction* 141:333-342.
- Santos, J.E.P., R.S. Bisinotto, and E.S. Ribeiro.** 2016. Mechanisms underlying reduced fertility in anovular dairy cows. *Theriogenology* 86:254-262.
- Santos, J. E. P., H. M. Rutigliano, and M. F. Sá Filho.** 2009. Risk factors for resumption of postpartum estrous cycles and embryonic survival in lactating dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 110:207-221.
- Santos, J. E. P., W. W. Thatcher, R. C. Chebel, R. L. A. Cerri, and K. N. Galvão.** 2004. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83:513-535.
- Schoenemann, H. M., W. D. Humphrey, M. E. Crowder, T. M. Nett, and J. J. Reeves.** 1985. Pituitary luteinizing hormone-releasing hormone receptors in ovariectomized cows after challenge with ovarian steroids. *Biol. Reprod.* 32:574-583.
- Schumacher, M., R. Guennoun, F. Robert, C. Carelli, N. Gago, A. Ghoumari, M. C. Gonzalez Deniselle, S. L. Gonzalez, C. Ibanez, F. Labombarda, H. Coirini, E. E. Baulieu, and A. F. De Nicola.** 2004. Local synthesis and dual actions of progesterone in the nervous system: neuroprotection and myelination. *Growth Horm. IGF Res.* 14(Suppl A):18-33.
- Shaham-Albalancy, A., Y. Folman, M. Kaim, M. Rosenberg, and D. Wolfenson.** 2001. Delayed effect of low progesterone concentrations on bovine uterine PGF(2alpha) secretion in the subsequent estrous cycle. *Reproduction* 122:643-648.
- Shaham-Albalancy, A., A. Nyska, M. Kaim, M. M. Rosenberg, Y. Folman, and D. Wolfenson.** 1997. Delayed effect of progesterone on endometrial morphology in dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 48:159-174.
- Silva, E., R. A. Sterry, D. Kolb, N. Mathialagan, M. F. McGrath, J. M. Ballam, and P. M. Fricke.** 2009. Effect of interval to resynchronization of ovulation on fertility of lactating Holstein cows when using transrectal ultrasonography or a pregnancy-associated glycoprotein enzyme-linked immunosorbent assay to diagnose pregnancy status. *J. Dairy Sci.* 92:3643-3650.
- Silva, E., R. A. Sterry, and P. M. Fricke.** 2007. Assessment of a practical method for identifying anovular dairy cows synchronized for first postpartum timed artificial insemination. *J. Dairy Sci.* 90:3255-3262.
- Skinner, D. C., A. Caraty, and R. Allingham.** 2001. Unmasking the progesterone receptor in the preoptic area and hypothalamus of the ewe: no colocalization with gonadotropin-releasing neurons. *Endocrinology* 142:573-579.
- Wagner, W. C., R. E. Strohbehn, and P. A. Harris.** 1972. ACTH, corticoids and luteal function in heifers. *J. Anim. Sci.* 35:789-793.
- Walsh, R. B., D. F. Kelton, T. F. Duffield, K. E. Leslie, J. S. Walton, and S. J. LeBlanc.** 2007a. Prevalence and risk factors for postpartum anovulatory condition in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90:315-324.
- Welch, R. A. S., W. D. Andrews, D. R. Barnes, K. Bremner, and T. G. Harvey.** 1984. CIDR dispensers for oestrus and ovulation control in sheep. In: *Roc. 10th Int. Congr. on Anim. Reprod. and Artif. Insem.*, June 10-14, Univ. of Illinois, Urbana-Champaign. Vol. 3, No. 354.
- Welch, R.A.S.** 1984. Development of CIDR dispensers for use in nulliparous ewes. *N. Z. Ministry of Agric. & Fish. Agric. Res. Div. Annu. Rep.*, 1983/84. p 58. Wellington, New Zealand.
- Wiltbank, M. C., A. H. Souza, P. D. Carvalho, A. P. Cunha, J. O. Giordano, P. M. Fricke, G. M. Baez, and M. G. Diskin.** 2014. Physiological and practical effects of progesterone on reproduction in dairy cattle. *Animal* 8(Suppl. 1):70-81.
- Wiltbank, M. C., A. H. Souza, P. D. Carvalho, R. W. Bender, and A. B. Nascimento.** 2012a. Improving fertility to timed artificial insemination by manipulation of circulating progesterone concentrations in lactating dairy cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* 24:238-243.
- Wiltbank, M. C., S. M. Salih, M. O. Atli, W. Luo, C. L. Bormann, J. S. Ottobre, C. M. Vezina, V. Mehta, F. J. Diaz, S. J. Tsai, R. Sartori.** 2012b. Comparison of endocrine and cellular mechanisms regulating the corpus luteum of primates and ruminants. *Anim. Reprod.* 9:242-259.
- Wiltbank, M.C., P.D. Carvalho, A. Keskin, R. Sartori, K.S. Hackbart, M.A. Meschiatti, M.R. Bastos, J.N. Guenther, A.B. Nascimento, M.M. Herlihy, M.C. Amundson, and A.H. Souza.** 2011. Effect of progesterone concentration during follicle development on subsequent ovulation, fertilization, and early embryo development in lactating dairy cows. *Soc. Study Reprod. (Abstract)*.

**Wiltbank, M., H. Lopez, R. Sartori, S. Sangsritavong, and A. Gümen.** 2006. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology* 65:17-29.

**Wiltbank, M. C., A. Gumen, and R. Sartori.** 2002. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology* 57:21-52.

Workshop “Proseando com o embrião in vivo: os idiomas tubárico e uterino”

(IV Workshop do Projeto Temático Assinaturas da Receptividade)

### **A Transcriptômica do Oviduto**

Dimitrios Rizos<sup>1</sup>, Veronica Maillio<sup>1</sup>, Patrick Lonergan<sup>2</sup>

1. Departamento de Reproducción Animal, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Madrid, Spain; 2. School of Agriculture and Food Science, University College Dublin, Belfield, Dublin 4, Ireland

O oviduto fornece o ambiente para o transporte de espermatozóides e óocitos, fertilização e desenvolvimento embrionário inicial. Na vaca, entre os dias 3.5 e 4 após a fertilização, na fase de 8 a 16 células, o embrião se move do oviduto para o útero, onde o desenvolvimento continua, passando pela formação do blastocisto, o alongamento do conceito e a implantação. Há claras evidências indicando que há uma interação bidirecional entre o útero e o conceito em desenvolvimento. No entanto, a evidência de uma comunicação recíproca durante o trânsito do embrião através do oviduto não é tão clara. De fato, a importância do oviduto durante o desenvolvimento embrionário precoce pode ser subestimada, uma vez que embriões podem ser produzidos *in vitro*. No entanto, tem sido claramente demonstrado que a cultura de zigotos bovinos, produzidos *in vitro*, nas tubas uterinas de bovinos, ovinos ou mesmo camundongos melhora a qualidade do embrião medida em termos de morfologia, expressão gênica, criotolerância e taxa de prenhez após a transferência. O lúmen do epitélio ovidutal é constituído por células ciliadas e secretoras; as células secretoras são responsáveis por secretar e transportar ativamente as proteínas, aminoácidos e íons que estão presentes no líquido ovidutal. Durante o ciclo estral tem sido reportadas modificações na proporção de células secretoras e ciliares, no seu transcriptoma e também na composição do fluido ovidutal. Além disso, também tem sido descritas diferenças no transcriptoma entre os oviduto ipsilateral e contralateral ao ovário contendo o corpo lúteo, bem como no epitélio da ampola e istmo de novilhas cíclicas entre as fases folicular e lútea. Em relação ao efeito do embrião (es) no oviduto, estudos em camundongos e porcas reportaram uma alteração na expressão de uma série de genes em resposta à presença dos embriões. Em um estudo recente do nosso grupo, foi necessário transferir vários embriões para o oviduto de novilhas para detectar diferenças no transcriptoma do epitélio do oviduto, enquanto que, quando um único embrião estava presente no oviduto não foram encontradas diferenças, o que sugere um efeito local do embrião. Além disso, uma influência local do embrião sobre o transcriptoma do epitélio do oviduto equino tem sido relatada. Nestes estudos, que empregaram vacas, éguas e porcas, a presença de um embrião induziu alterações sutis na expressão ovidutal de genes relacionados com a função imune. Identificar e compreender os mecanismos envolvidos na comunicação embrião-oviduto durante o período crítico de eventos reprodutivos iniciais levaria a uma melhoria no sucesso de tecnologias de reprodução assistida em mamíferos domésticos e humanos.

**Palavras-chave:** bovinos; oviduto; expressão gênica

Workshop “Proseando com o embrião in vivo: os idiomas tubárico e uterino”

(IV Workshop do Projeto Temático Assinaturas da Receptividade)

### **Transcriptoma e morfologia do oviduto em vacas de corte de alta e baixa fertilidade**

Angela María Gonella-Díaz<sup>1</sup>; Sônia Cristina da Silva Andrade<sup>2</sup>; Mariana Sponchiado<sup>1</sup>; Júlio Cesar de Carvalho Balieiro<sup>1</sup>; Nilton Pedro dos Santos<sup>4</sup>; Guilherme Pugliesi<sup>1</sup>; Fernando Silveira Mesquita<sup>3</sup>; Veerle Van Hoeck<sup>5</sup>; Ricardo de Francisco Strefezzi<sup>4</sup>; Gustavo R. Gasparin<sup>2</sup>; Luiz L. Coutinho<sup>2</sup>; Mario Binelli<sup>1</sup>

1. FMVZ-USP; 2. Laboratório de Biotecnologia Animal, ESALQ-USP; 3. Faculdade de Medicina Veterinária, UNIPAMPA; 4. FZEA-USP; 5. University of Antwerp, Belgium.

Nos bovinos, animais que ovulam folículos de maior tamanho apresentam maiores concentrações de estradiol (E2) na fase folicular e um maior corpo lúteo (CL), que produz maiores quantidades de progesterona (P4) durante a fase luteal. Este perfil de esteroides sexuais favorece a formação de um ambiente ovidutal e uterino mais receptivo ao desenvolvimento e implantação do embrião. O objetivo foi comparar o transcriptoma e a morfologia ovidutal de vacas Nelore tratadas para ovular folículos grandes (grupo FG-CLG, associado com alta receptividade ao embrião; n=21) com o de vacas tratadas para ovularem folículos pequenos (grupo FP-CLP; n=20). No dia 4 do ciclo estral, amostras de ampola e istmo foram colhidas e armazenadas a -80°C para testes moleculares ou fixadas em formalina para serem embebidas em parafina. Após extração de RNA, o transcriptoma (n=3/grupo/região) foi avaliado por sequenciamento de RNA. Amostras fixadas foram cortadas e coradas com hematoxilina-eosina ou ácido periódico de schiff para a avaliação da morfologia e contagem das populações celulares (Primeira contagem: células ciliadas e células secretoras; segunda contagem: células com ou sem grânulos citoplasmáticos), respectivamente. O perfil de transcritos mostrou uma série de genes diferencialmente expressos (GDE) entre os grupos associados com características funcionais do oviduto (ampola: 692 GDE; istmo: 590 GDE). Genes que tem função no remodelamento de matriz extracelular, proliferação e secreção celular foram mais expressos nas vacas do grupo FG-CLG. Adicionalmente, estas vacas também apresentaram um maior número de pregas primárias (P=0.04) e secundárias (P=0.07) na túnica mucosa e um número maior de células secretoras (P=0.004) e de células com grânulos citoplasmáticos (P=0.03). Processos de remodelamento de matriz extracelular e ramificação morfológica, com a subsequente liberação de fatores de crescimento e maior atividade de secreção celular poderiam levar a um melhor desenvolvimento embrionário. Em conclusão, a maior fertilidade das vacas do grupo FG-CLG está associada a alterações moleculares e morfológicas no oviduto que favorecem o transporte e desenvolvimento embrionário.

Agradecimentos: FAPESP, CNPq, CAPES.

**Palavras-chave:** ampola; istmo; esteroides sexuais

Workshop “Proseando com o embrião in vivo: os idiomas tubárico e uterino”

(IV Workshop do Projeto Temático Assinaturas da Receptividade)

**Análise do perfil de microRNAs no oviduto de vacas de corte de alta e baixa fertilidade**

Angela María Gonella-Díaz<sup>1</sup>; Sônia Cristina da Silva Andrade<sup>2</sup>; Mariana Sponchiado<sup>1</sup>; Júlio Cesar de Carvalho Balieiro<sup>1</sup>; Nilton Pedro dos Santos<sup>4</sup>; Guilherme Pugliesi<sup>1</sup>; Fernando Silveira Mesquita<sup>3</sup>; Veerle Van Hoeck<sup>5</sup>; Ricardo de Francisco Strefezzi<sup>4</sup>; Gustavo R. Gasparin<sup>2</sup>; Luiz L. Coutinho<sup>2</sup>; Mario Binelli<sup>1</sup>

1. FMVZ-USP; 2. Laboratório de Biotecnologia Animal, ESALQ-USP; 3. Faculdade de Medicina Veterinária, UNIPAMPA; 4. FZEA-USP; 5. University of Antwerp, Belgium.

Os microRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de RNA endógenos (21 a 25 nucleotídeos) que atuam como silenciadores pós-transcricionais. Os miRNAs estão envolvidos em processos de fertilização, desenvolvimento e implantação embrionária, no entanto, ainda não são conhecidos quais miRNAs estão presentes no oviduto bovino nem se sua abundância varia entre fêmeas de alta e baixa fertilidade. O objetivo foi comparar o perfil de expressão de miRNAs na ampola e istmo de vacas Nelore tratadas para ovular folículos grandes (grupo FG-CLG, associado com alta receptividade ao embrião; n=21) com o de vacas tratadas para ovularem folículos pequenos (grupo FP-CLP; n=20). No dia 4 do ciclo estral, amostras de ampola e istmo foram colhidas e armazenadas a -80°C para a posterior extração de RNA total. A síntese de cDNA foi realizada empregando o kit miScript II RT (Quiagen). O RT-qPCR foi realizado com o kit miScript SYBR® Green PCR (Quiagen) e com primers específicos para a avaliação da abundância de 348 miRNAs alvo e 3 miRNAs endógenos (RNT43, TR-T1 e miR-99b). A partir de um pool de amostras de istmo e de ampola verificou-se a correta amplificação dos miRNAs e selecionaram-se 88 miRNAs na ampola e 88 miRNAs no istmo para comparação entre as regiões e os grupos. Destes, 24 eram comuns para ambas às regiões. Na ampola, encontraram-se 34 miRNAs diferencialmente expressos (DE) entre os grupos ( $p < 0.05$ ), sendo 20 mais expressos no grupo FG-CLG e 14 mais expressos no grupo FP-CLP. No istmo, encontraram-se 48 miRNAs DE entre os grupos ( $p < 0.05$ ), sendo 17 mais expressos no grupo FG-CLG e 31 mais expressos no grupo FP-CLP. Foi realizada predição dos genes alvos e vias biológicas reguladas pelos miRNAs DE, empregando as plataformas miRTarBase e TargetScan. Os resultados indicaram que, no grupo FG-CLG, os miRNAs mais expressos regulam vias como proliferação, secreção, dobramento de proteínas, homeostase e remodelamento de matriz extracelular. Em quanto que no grupo FP-CLP, as vias preditas foram apoptose, apresentação e processamento de antígenos e biossíntese de nucleotídeos. Este estudo é o primeiro a identificar e definir a expressão de miRNAs no oviduto bovino. Os dados gerados a partir deste estudo proporcionam uma base para futuros estudos sobre o papel preditivo de distintos miRNAs na fertilidade bovina e sobre potenciais processos biológicos regulados por estes miRNAs.

Agradecimentos: FAPESP, CNPq, CAPES.

**Palavras-chave:** ampola; istmo; bovinos

Workshop “Proseando com o embrião in vivo: os idiomas tubárico e uterino”

(IV Workshop do Projeto Temático Assinaturas da Receptividade)

**O perfil endócrino peri-ovulatório altera a expressão da DICER e AGO4 mas não de AGO1, AGO2 ou XPO5 no oviduto bovino.**

Kauê Ribeiro da Silva; Angela María Gonella-Díaz; Mario Binelli  
FMVZ-USP.

Em bovinos, sabe-se que as concentrações plasmáticas de estradiol (E2) no pro-estro/estro e de progesterona (P4) no diestro inicial alteram o transcriptoma do oviduto mediante a ativação dos seus receptores específicos. Os receptores interagem com moléculas no interior da célula alvo para desencadear uma cascata de sinalização. Diversos estudos sugerem que o receptor de estradiol afeta a biossíntese de microRNAs (miRNAs) pela sua ligação com proteínas envolvidas neste processo. Sendo assim, objetivou-se estudar se as variações nas concentrações periovulatórias de E2 e P4 poderiam alterar a abundância de transcritos que codificam para XPO5, DICER e proteínas Argonautas (AGO1, AGO2 e AGO4) na ampola e istmo de vacas com diferentes perfis hormonais periovulatórios. Vacas Nelore foram sincronizadas com um protocolo a base de E2 e P4 para ovularem folículos pequenos (FP-CLP, n=20) ou grandes (FG-CLG, n=21) e consequentemente resultar em diferente desenvolvimento luteal e concentrações plasmáticas de E2 e P4 entre os grupos. No dia 4 do ciclo estral, os animais foram abatidos e amostras de ampola e istmo colhidas. Após extração de RNA e síntese de cDNA, a abundância de transcritos foi avaliada empregando qRT-PCR. Os resultados foram analisados empregando ANOVA considerando os efeitos de grupo, região e sua interação. A XPO5 exporta pré-miRNAs do núcleo até o citoplasma e sua abundância foi similar entre grupos e regiões. A DICER é uma Ribonuclease tipo III que é responsável pela clivagem de pré-miRNAs em miRNAs de dupla fita e sua abundância foi 18,71 e 3,0 vezes maior na ampola e no istmo do grupo FP-CLP quando comparado com o grupo FG-CLG, respectivamente (interação grupo\*região;  $P = 0.08$ ). A família AGO desempenha papel catalítico no complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC). A abundância de AGO1 e AGO2 foi 8,3 ( $P = 0.02$ ) e 4,2 ( $P = 0.02$ ) vezes maior na ampola que no istmo, respectivamente, mas não apresentaram efeito de



grupo nem da interação grupo\*região. A expressão de AGO4 foi afetada pela interação região\*grupo ( $P=0.03$ ), onde a abundância de transcrito foi 2,1 vezes maior na ampola que no istmo do grupo FP-CLP e 1,2 vezes maior no istmo que na ampola do grupo FG-CLG. Concluiu-se que o perfil endócrino periovulatório altera a expressão de DICER e AGO4, mas não de XPO5, AGO1 e AGO2. Novos estudos onde sejam avaliados os demais componentes do processo de biossíntese, assim como a identificação de formas maduras e imaturas de miRNAs específicos são necessários para determinar o papel dos hormônios esteroidais sob o controle desta via.

Agradecimentos: FAPESP, CNPq, CAPES.

**Palavras-chave:** microRNAs; RISC; esteroides sexuais

Workshop “Proseando com o embrião in vivo: os idiomas tubárico e uterino”

(IV Workshop do Projeto Temático Assinaturas da Receptividade)

#### **Interações materno-embriônicas e estabelecimento da gestação em bovinos**

P. Lonergan<sup>1</sup>; D. Mathew<sup>1</sup>; C. Passaro<sup>1</sup>; J.M. Sanchez<sup>1</sup>; N. Forde<sup>2</sup>

1. School of Agriculture and Food Science, University College Dublin, Belfield, Dublin 4, Ireland; 2. Division of Reproduction and Early Development, Leeds Institute of Cardiovascular and Molecular Medicine, School of Medicine, University of Leeds, Clarendon Way, Leeds, LS2 9JT, United Kingdom.

O sucesso no estabelecimento da gestação durante o período pré-implantação é dependente de interações temporais entre o embrião/concepto em desenvolvimento e o ambiente uterino. Durante a primeira semana de desenvolvimento, o embrião é de certa forma autônomo e não requer contato com o sistema reprodutivo, como evidenciado pela capacidade de gerar blastocistos *in vitro* e da transferência bem sucedida de embriões de doadoras para fêmeas receptoras. Entretanto, o alongamento do conceito, característica de embriões de ruminantes, não ocorre fora do ambiente uterino ou na ausência de glândulas uterinas *in vivo*, indicando que fatores derivados do útero são responsáveis por esse alongamento. Em bovinos, a progesterona (P4) oriunda do corpo lúteo induz mudanças temporais e espaciais no transcriptoma endometrial necessárias para o estabelecimento da gestação. Estas mudanças incluem a “*down-regulation*” de receptores de P4 (PGR) no epitélio luminal e glandular, que permite a expressão de genes e a secreção de seus produtos proteicos, assim como o transporte ativo de outras moléculas requeridas para o alongamento do conceito. O período de alongamento do conceito é claramente associado com as concentrações circulantes de P4, que atuam através do útero para alterar o momento da regulação dos PGRs e do início da expressão de genes-chaves. Consequentemente, a P4 tem um efeito indireto na secreção de interferon tau (IFNT) pelo conceito (o sinal de reconhecimento da gestação em bovinos). Interessantemente, estudos objetivando aumentar a P4 na primeira semana após o acasalamento tem resultado em nenhum efeito ou resposta modesta e variável sobre a taxa de gestação. Além do IFNT, outros fatores derivados do conceito como as prostaglandinas e o cortisol podem modificar o endométrio antes do reconhecimento da gestação. Por referência cruzada, o conteúdo proteico em fluidos do lúmen uterino (FLU) de novilhas gestantes e cíclicas no Dia 16 após o estro, assim como a expressão gênica por sequenciamento de RNA de tecidos no mesmo estágio, e através das proteínas produzidas pelo conceito no Dia 16 após período curto de cultivo *in vitro*, nós identificamos a mais provável origem destas proteínas (i.e., endométrio, conceito ou os dois). Subsequentemente, caracterizamos as diferenças na composição de micro-vesículas do FLU de novilhas gestantes e cíclicas no Dia 16. Isto gerou uma lista de 299 e 254 proteínas detectadas nos exossomos recuperados das novilhas gestantes e cíclicas, respectivamente. Destas, 232 eram comuns aos dois grupos, 67 foram detectadas apenas nas gestantes e 22 apenas nas cíclicas. Das 67 proteínas apenas identificadas nos exossomos recuperados do FLU das novilhas gestantes, 35 eram as mesmas previamente reportadas no meio de cultura de conceitos de 16 dias após cultivo por período curto e incluem a alfa-1-actinina, creatinina quinase mitocondrial do tipo U, transcetolase, fator de alongamento 2, proteína disulfeto isomerase, e tioredoxina. Estes e outros dados serão discutidos no contexto das interações materno-embriônica e receptividade uterina para o alongamento e implantação do conceito.

**Palavras-chaves:** conceito; estabelecimento da gestação; vaca

Workshop “Proseando com o embrião in vivo: os idiomas tubárico e uterino”

(IV Workshop do Projeto Temático Assinaturas da Receptividade)

#### **Suplementação com progesterona de longa ação no início do diestro em vacas de corte: efeitos na fertilidade em programas de IATF e TETF**

Guilherme Pugliesi<sup>1</sup>; Thiago Martins<sup>1</sup>; Felipe Barbosa Santos<sup>1</sup>; Júlio César Barboza da Silva<sup>4</sup>; Thiago Nishimura<sup>2</sup>; José Ricardo de Garla Maio<sup>3</sup>; Mario Binelli<sup>1</sup>

1. FMVZ-USP; 2. FZEA-USP; 3. Ouro Fino Saúde Animal; 4. Embryo Sys

Em vacas de leite e corte, as concentrações circulantes de progesterona (P4) no início do diestro estão positivamente correlacionadas com a probabilidade de prenhez. Recentemente, vários estudos usando diferentes estratégias hormonais foram desenvolvidos para aumentar as concentrações de P4 durante o início e meio do diestro com o intuito de incrementar a fertilidade em programas de IA em tempo fixo (IATF) e TE em tempo fixo (TETF). A suplementação com P4 usando dispositivos intravaginais de P4 durante o diestro inicial estimulam o desenvolvimento do conceito, mas pode não ser uma estratégia prática para operações em gado de corte. Desta maneira, nós desenvolvemos um sequência de estudos

objetivando avaliar o uso de um tratamento injetável com P4 de longa-ação como uma nova estratégia para suplementar P4 durante o início do diestro e potencialmente aumentar a fertilidade em programas de IATF e TETF em gado de corte. No primeiro estudo, doses de 150 ou 300 mg de P4 de longa-ação foram administradas no Dia 2 ou 3 pós-ovulação e aumentaram eficientemente as concentrações plasmáticas de P4 por pelo menos 3 dias em vacas de corte não-lactantes. Este tratamento não alterou o desenvolvimento e a vascularização do corpo lúteo (CL), mas antecipou em 3 dias o início da luteólise estrutural e funcional em vacas não-inseminadas (Reprod.Dom.Anim.49,85-91, 2014). Apesar deste feito paradoxal, em estudo subsequente (Theriogenology.85,1239-1248, 2016) nós testamos e confirmamos a hipótese que a suplementação com 150 mg de P4 de longa-ação no Dia 4 pós-IATF aumenta a fertilidade em vacas de corte em lactação submetidas à IATF. A taxa de prenhez (P/IATF) foi similar ( $P > 0.1$ ) entre vacas controle e tratadas com P4 (53.2%; 209/393 vs. 56.2%; 219/390), mas quando a P/IATF foi avaliada de acordo com o tamanho do CL, as vacas com  $CL < 0.9 \text{ cm}^2$  foram beneficiadas com o tratamento com P4 e demonstraram um aumento de 35% na P/IATF comparadas às vacas não suplementadas. Este resultado indicou um efeito positivo da suplementação de P4 apenas nas vacas com função luteal comprometida. Observamos também que os efeitos embriotróficos estimulados pela P4 aumentaram em 20% a P/IATF em vacas de corte em anestro pós-parto usando o mesmo protocolo de IATF. Em vacas de leite de alta produção, incrementos ainda maiores na P/IATF foram reportados por outros autores usando 900 mg de P4 de longa-ação. Entretanto, estudos adicionais do nosso grupo usando 150 mg de P4 no Dia 4 pós-IATF não resultaram em aumentos na fertilidade de vacas de corte Nelore e cruzadas no período inicial do pós-parto, indicando a necessidade de conhecimento futuro das potenciais interações entre o status reprodutivo e a dose de P4. Em programas de TETF, nossos dados preliminares têm indicado um potencial aumento de 7 a 12% na P/TETF em receptoras de corte cruzadas recebendo 150 mg de P4, no Dia 4 ou 7 (dia da TE). Em conclusão, o uso da P4 de longa-ação no diestro inicial é uma estratégia promissora para favorecer o desenvolvimento e manutenção do embrião. Apesar das respostas na fertilidade terem sido variadas entre os estudos de IATF, o aumento expressivo na P/IATF em vacas em anestro pós-parto e em vacas com CL pequenos indicam um uso potencial da suplementação com P4 de longa-ação para incrementar a fertilidade em programas de IATF e TETF. Para avanços adicionais ou entendimento da inconsistência nos estudos de fertilidade, as causas da luteólise antecipada e novas combinações de momento e dose da suplementação de P4 para vacas sob diferentes condições ambientais e fisiológicas precisam ser exploradas em estudos futuros.

Agradecimentos: FAPESP, CNPq, CAPES, Ourofino Saúde Animal.

**Palavras-chaves:** embrião; luteólise; bovino

Workshop “Proseando com o embrião in vivo: os idiomas tubárico e uterino”

(IV Workshop do Projeto Temático Assinaturas da Receptividade)

#### **Efeito da IA sobre a incidência de luteólise precoce de vacas suplementadas com P4 no diestro inicial**

Thiago Martins<sup>1</sup>; Guilherme Pugliesi<sup>1</sup>; Mariana Sponchiado<sup>1</sup>; Beatriz Cardoso<sup>1</sup>; Kauê Ribeiro da Silva<sup>1</sup>; Nathália Souza Gomes<sup>1</sup>; Fabian D. Cuellar Cuadros<sup>1</sup>; Maressa Izabel S. da Silva<sup>2</sup>; Barbara Piffero Mello<sup>2</sup>; Diego Kenji C. Miyai<sup>2</sup>; Mario Binelli<sup>1</sup>

1. FMVZ-USP; 2. FZEA-USP

Em bovinos, a suplementação com progesterona (P4-supl) durante o diestro inicial estimula o desenvolvimento do concepto e a proporção de vacas prenhas (P/IA). Apesar desse efeito positivo, uma proporção (~40%) de vacas não inseminadas e P4-supl apresentam encurtamento da vida luteal (luteólise precoce) (Reprod. Dom.Anim. 49,85-91,2014) que pode potencialmente interferir negativamente no incremento das taxas de prenhez. A presença de um embrião ou concepto entre os dias 13 e 16 do diestro altera a expressão gênica no endométrio (Biolreprod. 85,144-156 2011). Portanto, nossa hipótese é que a presença do concepto em vacas P4-supl diminui a incidência de luteólise precoce. Vacas Nelore multíparas, cíclicas e não lactantes (n=94) foram sincronizadas utilizando protocolo a base de estradiol/P4 seguido de detecção de cio duas vezes por dia durante 4 dias. Vacas detectadas em estro (n= 66) foram divididas para receberem 12h depois do estro uma IA com sêmen provado de um único touro (n=23; subgrupo IA) ou apenas o diluente do sêmen (n=43; subgrupo sem IA). No momento da IA, o diâmetro do folículo pré-ovulatório foi mensurado para acompanhamento do momento da ovulação (d0) a cada 12h por ultrassonografia transretal. No d3, uma injeção IM com 150 mg de P4 de longa ação (Sincrogest; Ourofino Saúde Animal, Cravinhos, SP) foi administrada em uma parte do subgrupo sem IA (grupo P4-supl; n= 21) e no subgrupo IA (grupo IA+P4-supl; n= 23). A outra parte do subgrupo sem IA, sem P4-supl, (Controle; n= 22) receberam no mesmo momento (d3) uma solução placebo (NaCL 0,9%). Entre o d3 e d23 o desenvolvimento do CL foi avaliado por exame ultrassonográfico transretal, B-mode, e por Color Doppler. Vacas com área de CL  $< 2,0 \text{ cm}^2$  e sinais coloridos do Doppler que cobrem um fluxo  $\leq 25\%$  da área total do CL foram determinadas em luteólise. Adicionalmente, amostras de sangue foram coletadas a cada 48h entre os d9 e d21 para mensuração das concentrações de P4 por RIA. No d30, a prenhez foi avaliada por ultrassonografia transretal. Os dados foram analisados utilizando SAS v.9.3. A frequência de luteólise foi analisada pelo teste Qui-Quadrado e as variáveis contínuas pelo teste de Kruskal-Wallis. Tratamento com P4 ( $p=0.03$ ) diminuiu a vida luteal (Controle:  $17,6^a \pm 0,37$ ; P4-supl:  $16,4^b \pm 0,37$  e IA+P4-supl vacas não prenhas:  $15,9^b \pm 0,71$  dias). A proporção de vacas em luteólise no d15 não foi afetada pela IA (Controle:  $4,5\%^b [1/22]$ ; P4-supl:  $33,3\%^a [7/21]$  e IA+P4-supl:  $26,1\%^a [6/23]$ ;  $p \leq 0,05$ ), porém, no d16, a proporção foi similar entre os grupos IA+P4-supl e controle, e tendeu a diferir entre os grupos IA+P4-supl e P4-supl (Controle:  $31,8\%^b [7/22]$ ; P4-supl:  $61,9\%^{a,X} [13/21]$  e IA+P4-supl:  $34,8\%^{a,b,Y}$

[8/23]; <sup>a,b</sup>p=0,05; <sup>x,y</sup>p=0,07). No d30, a P/IA foi de 30,4% (7/23). Eliminando-se as vacas prenhas, a proporção de vacas não gestante que demonstraram luteólise até o dia 16 foi de 50,0% (8/16). Conclui-se que a IA afeta a incidência de luteólise precoce, mas esse efeito é limitado pelo estágio de desenvolvimento do conceito.

Agradecimentos: FAPESP, CNPq, CAPES, Ourofino Saúde Animal.

**Palavras-chave:** embrião; luteólise; bovino

Workshop “Proseando com o embrião in vivo: os idiomas tubárico e uterino”

(IV Workshop do Projeto Temático Assinaturas da Receptividade)

**Controle molecular da luteólise antecipada em vacas Nelore (*Bos indicus*) suplementadas com progesterona injetável de longa ação durante o início da fase luteínica**

Emiliana Oliveira Santana Batista<sup>1</sup>; Beatriz Cardoso<sup>1</sup>; Milena Lopes Oliveira<sup>1</sup>; Fabian David Cuellar Cuadros<sup>1</sup>; Lorena G. Zapata<sup>2</sup>; Maressa Izabel Santos da Silva<sup>2</sup>; Barbara Piffero Mello<sup>2</sup>; Mariana Sponchiado<sup>1</sup>; Diego Kenji Codá Miyai<sup>2</sup>; Guilherme Pugliesi<sup>1</sup>; Mario Binelli<sup>1</sup>

1. FMVZ-USP; 2. FZEA-USP.

A suplementação com progesterona (P4) injetável de longa ação (i) no início do diestro aumenta a taxa de concepção em vacas de corte. Entretanto, nestes animais tem sido observada regressão estrutural e funcional do corpo lúteo (CL), resultando em 30 a 50% de perda gestacional. Desta forma, foi testada a hipótese de que a luteólise prematura induzida pela iP4 está associada com uma redução precoce na abundância de transcritos endometrial para receptor de P4 (PGR) e um aumento na abundância de transcritos para receptores de ocitocina (OXTR). Vacas Nelore cíclicas, multíparas (n = 24) foram selecionadas após detecção do CL em pelo menos dois exames consecutivos com intervalo de 12 dias. Todas as vacas receberam um dispositivo intravaginal de P4 (Sincrogest®, Ourofino Saúde Animal), 2 mg de benzoato de estradiol i.m. (Sincrodiol®, Ouro Fino Saúde Animal) e tratamento com PGF<sub>2α</sub> (500 µg de cloprostenol sódico; Sincrocio®, Ouro Fino Saúde Animal). Após 8 dias um tratamento com PGF<sub>2α</sub> foi realizado. O dia da ovulação foi definido como dia 0. As vacas que ovularam foram divididas de acordo com o tamanho do folículo pré-ovulatório em dois grupos experimentais: sem tratamento (Grupo Controle, n = 12) ou 300 mg de iP4 no dia 3 pós-ovulação (Sincrogest®, Ouro Fino Saúde Animal, Brasil; grupo iP4; n=12). Amostras de tecido endometrial foram coletadas transcervicalmente nos dias 3, 5, 7, 9, 11, 13 e 16 utilizando-se escovas citológicas. Imediatamente após a coleta, as amostras eram submersas em 1 mL de Trizol e estocadas à -80°C. Avaliações ultrassonográficas com Color Doppler foram realizadas a cada 12 h do momento da remoção do dispositivo de P4 para verificar ovulação, e do dia 3 ao 25 para avaliação do desenvolvimento e regressão do CL. O dia da luteólise estrutural foi definido como o dia em que a área do CL (cm<sup>2</sup>) diminuiu 25% da área média dos dias 7 e 8. Foi avaliado se os dados apresentavam distribuição normal usando o teste Shapiro-Wilk. Dados que não apresentassem distribuição normal foram transformados para base logarítmica, raiz quadrada ou rank. Para análise dos dados foi utilizado o PROC MIXED, SAS (version 9.2; SAS Institute, Cary, NC, USA). Os dados de frequência foram analisados pelo teste exato de Fisher. Os dados foram apresentados como média ± EPM. Luteólise estrutural ocorreu mais cedo (P = 0,03) no grupo iP4 (16,4 ± 0,9 d) comparada ao grupo controle (18,8±0,7 d). A frequência de vacas que iniciou luteólise antes do dia 17 foi maior (P = 0,03) no grupo iP4 (50,0%), comparado ao grupo controle (8,3%). Foi observada uma interação grupo \* tempo (P < 0,05) para abundância de transcritos para o gene OXTR. Vacas do grupo iP4 que apresentaram luteólise antecipadamente apresentaram maior abundância de transcritos para o gene OXTR no dia 16. Entretanto, nas vacas do grupo iP4 que não apresentaram luteólise antecipada a abundância de transcritos para o gene OXTR foi similar ao longo do experimento. Foi observada uma interação grupo\*tempo (P < 0,10) para abundância de transcritos para o gene PGR. Vacas do grupo iP4 que apresentaram luteólise antecipada apresentaram maior abundância de transcritos para o gene PGR no dia 16 comparado ao dia 13, enquanto em vacas do grupo iP4 que não apresentaram luteólise antecipada observou-se maior abundância de transcritos no dia 5, uma redução no dia 7 e então a expressão de PGR apresentou-se similar até o dia 16. Em conclusão, a luteólise antecipada induzida pelo grupo iP4 está associada com um aumento endometrial na abundância de transcritos para o gene OXTR e PGR. Especula-se que este evento molecular esteja associado com uma liberação precoce de pulsos de PGF<sub>2α</sub> que acarretarão na regressão do CL.

Agradecimentos: FAPESP, CNPq, CAPES, Ourofino Saúde Animal.

**Palavras-chave:** bovinos; corpo lúteo; cytobrush

Workshop “Proseando com o embrião in vivo: os idiomas tubárico e uterino”

(IV Workshop do Projeto Temático Assinaturas da Receptividade)

**Cytobrush: uma ferramenta para avaliação molecular do endométrio bovino**

Beatriz Cardoso; Guilherme Pugliesi; Milena Lopes Oliveira; Emiliana Oliveira Santana Batista; Mario Binelli FMVZ-USP.

Em bovinos, a compreensão molecular da biologia uterina *in vivo* requer um exame do útero por meio de técnicas invasivas, tais como a biópsia. Coletas de amostras repetidamente podem causar inflamação, danos físicos e afetar a fertilidade. Portanto, a validação de técnicas de amostragem menos traumáticas, repetíveis e que permitem a coleta de amostras representativas e confiáveis é necessária. Neste contexto, esse estudo objetivou: (1) comparar os aspectos estrutural e

funcional de amostras endometriais coletadas por biópsia transcervical e por cytobrush e (2) caracterizar o perfil de expressão de genes envolvidos no mecanismo de luteólise no endométrio bovino utilizando a técnica de cytobrush. No Experimento 1, o cio de cinco vacas Nelore foi sincronizado utilizando-se um protocolo a base de progesterona e estradiol. O dia da ovulação foi detectado por ultrassonografia. Dez dias após a ovulação, amostras endometriais foram coletadas do corpo uterino por meio de escova citológica adaptada à extremidade de um aplicador convencional de inseminação artificial e, posteriormente, utilizando-se um aparato de biópsia. As amostras foram submersas em reagente Trizol e armazenadas a -80 °C até a extração do RNA. A abundância de transcritos característicos de epitélio (KRT18), estroma (VIM), células imunes (CD3D) e células endoteliais (FLT1) e transcritos envolvidos na função uterina durante o ciclo estral (PGR, PTGES, AKR1C4) foi medida por RT-qPCR e comparada entre as técnicas de coleta. O efeito fixo da técnica foi analisado por one-way ANOVA utilizando o procedimento PROC MIXED (SAS versão 9.2). A abundância de VIM e FLT1 foi de 9,2 e 275 vezes maior em amostras de biópsia, respectivamente ( $P < 0,05$ ). Em contrapartida, a abundância de KRT18 e CD3D foi de 5,2 e 2,2 maior em amostras cytobrush, respectivamente ( $P < 0,05$ ). Embora tenha havido uma maior abundância do RNAm de PTGES em amostras cytobrush ( $P < 0,05$ ), a abundância dos genes AKR1C4 e PGR não foi alterada pelo método de coleta ( $P > 0,05$ ). No Experimento 2, o cio de cinco vacas Nelore foi sincronizado e o dia da ovulação (D0) foi estimado por ultrassonografia. Nos dias 10, 13, 16 e 19 amostras endometriais foram coletadas utilizando-se o método cytobrush. A abundância dos transcritos OXTR, ESR1 e PGR2 foi medida por qPCR e analisada por medidas repetidas no tempo ANOVA utilizando-se o procedimento PROC MIXED (SAS versão 9.2). O teste de diferença mínima significativa foi utilizado para comparação de médias entre os dias. Houve um efeito de dia na abundância de todos os transcritos (PGR2 e OXTR,  $P < 0,05$ ; ESR1,  $P < 0,1$ ). Houve um aumento gradual na abundância de OXTR ao longo do tempo, sendo a maior abundância notada no dia 19. Em contraste, a abundância do RNAm de PGR2 foi máxima no dia 10 e depois, gradualmente, diminuiu ( $P < 0,05$ ). A abundância de transcritos para ESR1 diminuiu gradualmente entre os dias 10 e 16 e voltou a aumentar no dia 19. Em resumo, amostras obtidas utilizando-se a técnica de cytobrush fornecem amostras representativas, enriquecidas em células epiteliais e imunes, em comparação com amostras de biópsia. As dinâmicas temporais da expressão dos transcritos selecionados foram consistentes com a função uterina no final do ciclo estral. Em conclusão, amostras de cytobrush podem convenientemente substituir amostras de biópsia, proporcionando um método seguro, repetível e menos traumático para estudar a biologia uterina bovina *in vivo*.

Agradecimentos: FAPESP, CNPq, CAPES, Ourofino Saúde Animal.

**Palavras-chave:** cytobrush; útero; bovinos

Workshop “Proseando com o embrião in vivo: os idiomas tubárico e uterino”

(IV Workshop do Projeto Temático Assinaturas da Receptividade)

#### **Sistema Imune Materno e Gestação em Bovinos**

Trudee Fair

School of Agriculture and Food Sciences, University College, Dublin, Room 239, Agricultural Sciences Building, Belfield, Dublin 4, Ireland.

A implantação de embriões de mamíferos requer o priming do sistema imune materno, mas não o estímulo. Existem vários exemplos de condições onde durante a implantação embrionária perfis imunes alterados ou aberrantes levam à perda gestacional. Porém, esses estudos são primariamente associados a humanos e camundongos; os dados em relação a bovinos e animais de produção são geralmente limitados. A maior parte da informação disponível tem foco na resposta endometrial ao interferon tau (IFNT), uma citocina antiviral tipo I, que é o fator de reconhecimento materno para bovinos e ovinos. A secreção de IFNT pelo embrião e a detecção deste pela mãe são fundamentais para a manutenção do corpo lúteo (CL) e permanência da gestação. Porém, o vasto conteúdo de dados de transcriptoma tanto do endométrio quanto do conceito destacam uma função integradora mais ampla do sistema imune materno no estabelecimento da gestação em bovinos. Ao analisar em conjunto os dados disponíveis de imunohistoquímica e citometria de fluxo referentes animais de produção, camundongos e humanos, pode-se perceber um perfil de envolvimento de células imunes desde a ovulação até a concepção e placentação. Os eventos marcantes do estabelecimento da gestação em bovinos e o envolvimento do sistema imune materno serão discutidos.

**Palavras-chave:** embrião; reconhecimento materno; endométrio

Workshop “Proseando com o embrião in vivo: os idiomas tubárico e uterino”

(IV Workshop do Projeto Temático Assinaturas da Receptividade)

#### **A assinatura transcricional espaço-específica do funcionamento do endométrio bovino 7 dias após a inseminação**

Mariana Sponchiado<sup>1</sup>; Nathália Souza Gomes<sup>1</sup>; Guilherme Pugliesi<sup>1</sup>; Thiago Martins<sup>1</sup>; Maite del Collado<sup>2</sup>; Roney dos Santos Ramos<sup>3</sup>; Moana Rodrigues França<sup>1</sup>; Milena Lopes Oliveira<sup>1</sup>; Angela María Gonella-Díaz<sup>1</sup>; Kaue Ribeiro<sup>1</sup>; Fabian David Cuellar Cuadros<sup>1</sup>; Patrícia Kubo Fontes<sup>4</sup>; Athos Pastore<sup>5</sup>; Marcelo Nogueira<sup>6</sup>; Mario Binelli<sup>1</sup>

1. FMVZ-USP; 2. FZEA-USP; 3. Ourofino Saúde Animal; 4. UNESP, Botucatu; 5. CRV Lagoa; 6. UNESP, Assis.

O estabelecimento gestacional depende da interação entre os perfis de hormônios ovarianos, o trato reprodutivo materno e o conceito em desenvolvimento. O endométrio bovino é um tecido dinâmico que sofre modificações funcionais espaço-

temporais dirigidas pelos hormônios ovarianos, estradiol (E2) e progesterona (P4). Devido aos arranjos vasculares locais, o aporte de esteroides sexuais no útero possui um padrão de distribuição que varia longitudinal e transversalmente. O que ainda não se sabe é o quão cedo o sinal do embrião no trato reprodutivo pode modular a sua função. O presente estudo testou duas hipóteses simultaneamente: (1) há uma assinatura transcriptômica espaço-específica no endométrio e, (2) a presença de um embrião influencia tal assinatura 7 dias após a IA (D7). Esperava-se que a abundância de transcritos de genes relacionados à receptividade uterina e de resposta aos esteroides sexuais diminuiria do terço anterior para o terço posterior do corno uterino e do lado mesometrial para antimesometrial. Além disso, devido ao número limitado de células, a presença de um embrião no D7 não afetaria a expressão gênica do endométrio. O ciclo estral de vacas Nelore multíparas e não lactantes foi sincronizado e os animais foram alocados em um dos dois grupos experimentais no momento do estro (D0): Controle (Con; n=8), onde a inseminação foi mimetizada com diluidor seminal; ou Gestante (Gest; n=16), vacas foram inseminadas com a mesma partida de sêmen bovino comercial, 12h após o estro. O tamanho do folículo pré-ovulatório, a área do CL e concentração plasmáticas de P4 no D7 foram semelhantes entre os grupos ( $p > 0,1$ ). As vacas foram abatidas no D7 e o corno uterino ipsilateral ao CL foi isolado e dividido em terços anterior, médio e posterior, a partir da junção útero-tubárica. Cada terço uterino foi lavado individualmente com DMPBS e a presença do embrião no lavado foi confirmada nas vacas do grupo Gest. Todos os embriões (n=10) foram encontrados nos lavados do terço anterior. Subsequentemente, amostras de endométrio intercaruncular foram coletadas de cada terço uterino nas regiões mesometrial e antimesometrial. A abundância relativa de transcritos para 89 genes-alvos foi mensurada por PCR usando a plataforma Fluidigm (Biomark HD). Os dados foram analisados por Split-split-plot ANOVA incluindo os efeitos de grupo (Con vs Gest), terço (anterior, médio e posterior) e região (mesometrial e antimesometrial) e as interações. Uma regulação espacial ao longo do corno uterino foi verificada com o decréscimo de transcritos dos genes associados à atividade de secreção, transportadores, via das prostaglandinas e estresse oxidativo do terço anterior em direção ao terço posterior. Em contraste, para os genes associados ao remodelamento de matriz extracelular e fatores de crescimento verificou-se um aumento na abundância de transcritos do terço anterior em direção ao posterior. Em conclusão, o padrão de expressão de genes específicos varia entre as regiões do trato reprodutivo da fêmea.

Agradecimentos: FAPESP, CNPq, CAPES, CRV Lagoa.

**Palavras-chave:** expressão gênica; útero; desenvolvimento embrionário

Workshop “Proseando com o embrião in vivo: os idiomas tubárico e uterino”

(IV Workshop do Projeto Temático Assinaturas da Receptividade)

#### **Histotrofo e receptividade uterina**

Thiago Martins<sup>1</sup>; Guilherme Pugliesi<sup>1</sup>; Mariana Sponchiado<sup>1</sup>; Frederich Diaz Rodriguez<sup>1</sup>; Roney Ramos<sup>3</sup>; Ângela Maria Gonella-Diazza<sup>1</sup>; Alejandro Ojeda Rojas<sup>1</sup>; Andréa Cristina Basso<sup>4</sup>; Júlio César Barboza da Silva<sup>5</sup>; Paulo Fantinato Neto<sup>2</sup>; Mario Binelli<sup>1</sup>

1. FMVZ-USP; 2. FZEA-USP; 3. Ouro Fino Saúde Animal; 4. In Vitro Brasil; 5. Embryo Sys.

Em bovinos, antes da placentação, o desenvolvimento do conceito depende do secretoma uterino (i.e., histotrofo). Apesar de fundamental, a composição e a dinâmica de síntese do histotrofo durante a fase inicial do diestro são pouco conhecidas, bem como a relevância desse processo dinâmico para o estabelecimento da gestação. Portanto, este estudo teve como objetivo alterar a composição do histotrofo no diestro inicial para avaliar os efeitos sobre (1) a sobrevivência embrionária (2) a reconstituição de sua composição. O crescimento folicular de vacas multíparas, cíclicas e não lactantes foi sincronizado utilizando protocolo a base de estradiol/progesterona seguido de detecção cio (d0) duas vezes ao dia por 4 dias. No Exp1, cada corno uterino foi lavado com 30 mL de D-PBS no d1 (n=15), d4 (n=17), d7 (n=16), ou não foi lavado (controle, n=16). No d7,5, 3 embriões PIV foram transferidos para o corno ipsilateral ao CL. O diagnóstico de gestação foi realizado no d25 por ultrassonografia transretal. No Exp2, cada corno uterino foi lavado três vezes com 30 mL de D-PBS no d1 (n=9), d4 (n=9), d7 (n=9), d1+4+7 (n=9) ou não foi lavado (controle, n=9). O procedimento foi mimetizado (i.e. passagem de sonda de Foley sem infusão de D-PBS no útero) nos dias que não foram realizadas as lavagens. No d7,5, os cornos uterinos de todas as vacas foram lavados com 30 mL de D-PBS e os lavados foram usados para quantificação de proteína total (BCA protein assay kit), abundância de albumina, proteína que é comumente encontrada no soro (ALB; SDS-PAGE seguido de coloração com Coomassie e quantificação por densitometria) e abundância de SERPINA14, proteína específica do útero (SERP; Western Blotting). Os dados preliminares foram analisados pelo SAS utilizando o teste Qui-quadrado, Exp.1, e o PROC MIXED, Exp2. No Exp1, a prenhez (P)/TE foi similar entre os grupos controle, (60%; 9/15) e lavado no d1 (60%; 9/15), mas, comparado ao grupo controle, a prenhez no grupo lavado no d4 (29,4%; 5/17;  $p=0,06$ ) tendeu a ser menor e no grupo lavado no d7 foi numericamente inferior (37,5%; 6/16;  $p=0,16$ ). No Exp2, as lavagens resultaram em aumento da quantidade de proteína. Comparado ao grupo controle, lavagens no d4 ou d7 aumentaram em 4,1 e 3,8 vezes ( $p<0,05$ ) a quantidade de proteína total, enquanto que lavagens no d1 ou d1+4+7 não alteraram ou a aumentaram moderadamente (1,6 vezes,  $p=0,07$ ), respectivamente. Similarmente, lavados no d4 ou d7 aumentaram em 5,8 e 5,2 vezes ( $p<0,05$ ) a abundância de ALB, enquanto que lavagens no d1 ou d1+4+7 resultaram em aumentos de 2,1 e 2,4 vezes, respectivamente. Para SERP, lavagens no d4 ou d7 resultaram em aumentos de 9 e 14,5 vezes ( $p<0,01$ ), respectivamente, e lavagens no d1 ou d1+4+7 não a alteraram. Conclui-se que (1) a sobrevivência embrionária foi prejudicada por lavagens uterinas realizadas próximas a TE, enfatizando a importância de um ambiente intrauterino

adequado para o sucesso gestacional (2) lavagens uterinas, realizadas durante o diestro inicial alteraram a composição do histotrofo, aumentando agudamente a abundância de proteína total, sérica e útero-específica.

Agradecimentos: FAPESP, CNPq, CAPES, In Vitro Brasil.

**Palavras chave:** gestação; serpina; bovino

Workshop “Proseando com o embrião in vivo: os idiomas tubárico e uterino”

(IV Workshop do Projeto Temático Assinaturas da Receptividade)

**Perfis endócrinos peri-ovulatórios influenciam o transporte, metabolismo e disponibilidade de aminoácidos no lúmen uterino de vacas de corte durante o diestro inicial**

Moana Rodrigues França<sup>1</sup>; Maressa Izabel Santos da Silva<sup>2</sup>; Guilherme Pugliesi<sup>1</sup>; Veerle Van Hoeck<sup>3</sup>; Mario Binelli<sup>1</sup>

1. FMVZ-USP; 2. FZEA-USP; 3. University of Antwerp, Belgium.

Em bovinos de corte, folículos pré-ovulatórios (FOP) maiores e decorrentes maiores concentrações de estradiol (E2) no proestro/estro e progesterona (P4) no diestro afetam positivamente o crescimento do conceito e a fertilidade. Porém, os mecanismos mediados pelos esteroides femininos que influenciam a receptividade uterina ao embrião precisam ser esclarecidos. Os aminoácidos (AA) são componentes importantes das secreções uterinas que são cruciais para a sobrevivência do embrião antes da implantação. A hipótese deste trabalho é que o tamanho do FOP e as concentrações de E2 e P4 modulam a abundância de transcritos de proteínas carreadoras do soluto (SLC) relacionadas ao transporte e ao metabolismo de AA no endométrio e consequentemente afetam a concentração luminal de AA. Para isso, o crescimento folicular de vacas Nelore foi manipulado com o objetivo de formar dois grupos: FOP grande e corpo lúteo (CL) grande (FG-CLG) e FOP pequeno e CL pequeno (FP-CLP). No Dia 4 (D4; Experimento 1) e Dia 7 (D7; Experimento 2) após a injeção de GnRH para indução da ovulação, foram coletados tecido endometrial e lavado uterino *post-mortem*. A abundância de transcritos foi avaliada por qRT-PCR e as concentrações de AA nos lavados foram quantificadas por HPLC. No experimento 1, o tamanho do FOP, concentração plasmática de E2 no D-1 e a concentração plasmática de P4 no D4 foram 15.70mm±0.43 vs. 11.31mm±0.23 (p<0.01), 2.44pg/ml±0.19 vs. 0.65pg/ml (p<0.01) e 1.40ng/ml±0.23 vs. 0.80ng/ml±0.10 (p<0.01) para os grupos FG-CLG vs. FP-CLP, respectivamente. No experimento 2, o tamanho do FOP, concentração plasmática de E2 no D-1 e a concentração plasmática de P4 no D7 foram 13.18mm±0.44 vs. 10.63mm±0.30 (p<0.01), 2.30pg/ml±0.57 vs. 0.50pg/ml±0.13 (p<0.01) e 3.68ng/ml±0.38 vs. 2.49ng/ml±0.43 (p=0.04) para os grupos FG-CLG vs. FP-CLP, respectivamente. No D4 a abundância de *SLC1A4*, *SLC38A1*, *SLC6A6*, *SLC7A4*, *SLCY* e *PRMT6* e no D7, *SLC1A4*, *SLC6A1*, *SLC6A14*, *SLC7A4*, *SLC7A8*, *SLC38A1*, *SLC38A7*, *SLC43A2*, *PRMT6* e *DDO* foi maior no endométrio dos animais do grupo FG-CLG (p<0.05). No D4, maiores concentrações de taurina, alanina e ácido α-aminobutírico foram observadas no grupo FP-CLP (p<0.05). Em contraste, menores concentrações de valina e cistationina foram encontradas nos lavados uterinos do D7 dos animais do grupo FP-CLP (p<0.05). No D4, os animais do grupo FG-CLG, associado a maior fertilidade, apresentaram menos quantidade de AA nas secreções uterinas, porém, a abundância dos transportadores de aminoácidos foi compatível com maior transporte em comparação aos animais do grupo FP-CLP. Esses resultados sugerem que antes do embrião se mover do oviduto ao útero, o transporte e metabolismo dos AA prioriza a preparação das células do endométrio para receber o embrião e não o acúmulo nas secreções uterinas. Porém, no D7, quando o embrião está em contato direto com as secreções uterinas, os genes relacionados ao transporte de AA no endométrio e a concentração de AA no histotrofo são estimulados nas vacas do grupo FG-CLG. Esses dados indicam que o metabolismo e transporte de AA no sentido das células endometriais ou das secreções uterinas pode ser um mecanismo importante para a receptividade materna.

Agradecimentos: FAPESP, CNPq, CAPES.

**Palavras chave:** bovino; receptividade uterina; esteroides sexuais

Workshop “Proseando com o embrião in vivo: os idiomas tubárico e uterino”

(IV Workshop do Projeto Temático Assinaturas da Receptividade)

**Estudo dos mecanismos de ação pelos quais o estradiol estimula síntese de PGF2α endometrial em fêmeas bovinas**

Milena Lopes Oliveira<sup>1</sup>; Barbara Piffero Mello<sup>2</sup>; Guilherme Pugliesi<sup>1</sup>; Roney dos Santos Ramos<sup>4</sup>; Saara Carollina Scolari<sup>1</sup>; Ângela Maria Gonella-Díaz<sup>1</sup>; Mario Binelli<sup>1</sup>; Cláudia Maria Bertan Membrive<sup>3</sup>

1. FMVZ-USP; 2. FZEA-USP; 3. UNESP, Dracena-SP; 4. Ouro Fino Saúde Animal.

Em bovinos, o estradiol (E2) exerce importante participação na liberação de PGF2α endometrial associada à luteólise. A hipótese é que o estradiol modula a expressão de genes e proteínas envolvidas na cascata geradora de PGF2α no endométrio de fêmeas bovinas. Vacas Nelore (N=52), cíclicas e não lactantes receberam 2mg de benzoato de E2 (Sincrodiol, Ouro fino®) e um dispositivo intravaginal de progesterona (1g; Sincrogest; Ourofino) por 8 dias. As vacas receberam 0,5mg de cloprostenol sódico (Sincrocio; Ourofino) via IM, 48 horas antes da retirada e uma segunda aplicação na retirada do dispositivo. No dia 15 do ciclo estral (D0; estro), os animais foram divididos para receberem os seguintes tratamentos, na hora 0: placebo (P; 5mL de etanol 50%; via IV), estradiol (E; 5mL de etanol 50% contendo 3mg de 17β E2; IV) ou controle (não tratado). Biópsias endometriais foram coletadas nos momentos 0h (C; n=10), 4 horas (E4; n=11 e P4; n=10) ou 7 horas (E7; n=10 e P7; n=11). Foram obtidas duas biópsias endometriais por vaca, para análise de expressão gênica (qPCR)

e localização (Imunohistoquímica) das proteínas de interesse. A expressão gênica foi analisada por ANOVA de duas vias e comparação de médias, e a imunomarcação por teste T. A expressão do gene PTGS2 foi menor nos grupos P7 e E7 comparado aos grupos P4 e E4, respectivamente ( $P<0,05$ ). Os genes PLA2G4 e ESR1 foram menos expressos no grupo E4 comparados ao grupo E7 ( $P<0,05$ ). A expressão do gene ESR2 foi menor nos grupos E4 e E7 comparada às demais ( $P<0,05$ ). Observou-se maior expressão de OXTR nos grupos E4 e E7 comparada às demais ( $P<0,05$ ). Houve menor expressão de PRKC $\alpha$  no grupo E7 comparada às demais ( $P<0,05$ ). Verificou-se menor expressão de PRKC $\beta$  nos grupos P7 e E7 comparada às demais ( $P<0,05$ ). A expressão de AKR1B1 e AKR1C4 foi menor nos grupos E4 e E7 comparada às dos outros grupos ( $P<0,05$ ). A proteína PKC $\gamma$  apresentou maior imunomarcação ( $P<0,05$ ) no epitélio luminal (EL) nos grupos E4 e E7 comparada aos grupos P4 e P7h ( $P<0,05$ ) e maior imunomarcação no epitélio glandular (EG) no grupo E7 comparada à do grupo P7. A proteína AKR1B1 apresentou maior imunomarcação ( $P<0,05$ ) no EL nos grupos E4 e E7 comparada aos grupos P4 e P7 e maior expressão no EG no grupo E4 comparada ao grupo P4. Para ER $\alpha$  houve maior imunomarcação ( $P<0,05$ ) no EG dos grupos P4 e P7 quando comparados aos grupos E4 e E7 e maior expressão no EL no grupo P4 quando comparado ao E4. Conclui-se que a administração de estradiol reduziu a expressão gênica da maioria das proteínas envolvidas de síntese de PGF2 $\alpha$ , com exceção do OXTR. Além disso, o E2 aumentou a imunomarcação das proteínas PKC $\gamma$  e AKR1B1, e diminuiu ER $\alpha$ . Especula-se que o E2 cause aumento dessas proteínas e que devido ao feedback negativo tenha sido observada a diminuição da abundância dos transcritos. Assim, torna-se necessária a avaliação da quantificação proteica, para identificar se a modulação da expressão gênica e proteica pelo E2 estão associadas ao aumento abundância destas proteínas.

Agradecimentos: FAPESP, CNPq, CAPES.

**Palavras-chave:** luteólise; prostaglandina; estradiol

Workshop “Proseando com o embrião in vivo: os idiomas tubárico e uterino”

(IV Workshop do Projeto Temático Assinaturas da Receptividade)

#### **Explorando o transcriptoma endometrial durante o período de pré-implantação**

Stefan Bauersachs

ETH Zurich, Animal Physiology, Institute of Agricultural Sciences, Zurich, Switzerland.

As funções biológicas do endométrio evoluíram com o desenvolvimento de espécies mamíferas, isto é, a evolução da gravidez. Sua principal função é o suporte do crescimento e desenvolvimento embrionário e a formação do componente materno da placenta após a implantação do conceito. É particularmente interessante o fato de que existem diferenças consideráveis no que diz respeito ao estabelecimento e manutenção da gestação, o que sugere estudar e comparar este tecido em vários organismos mamíferos. Com a invenção de tecnologias ômicas, muitos estudos globais das mudanças na expressão gênica do endométrio durante a fase de estabelecimento da gestação e durante o ciclo estral foram realizados em espécies domésticas para obter uma visão holística dos genes associados a este processo biológico. Vários momentos têm sido analisados durante a fase de pré-implantação no endométrio bovino, porcino e equino, por exemplo, nas fases do reconhecimento materno da gestação e início da implantação. Depois de muitos estudos de transcriptoma usando a tecnologia de microarranjos de DNA, o sequenciamento de RNA (RNA-Seq) tem sido utilizado no decurso do desenvolvimento de tecnologias de sequenciamento de nova geração (Next-Generation Sequencing; NGS) para obter uma visão ainda mais profunda da expressão gênica endometrial. Os resultados obtidos a partir desses estudos para diferentes espécies mamíferas, incluindo os seres humanos, foram comparados a fim de saber mais sobre mudanças comuns e espécie-específicas na expressão gênica endometrial durante a fase de pré-implantação e durante o ciclo sexual. Este rápido desenvolvimento das tecnologias ômicas, particularmente de NGS, implica também um grande desafio na análise de dados, sua interpretação e integração. Mais e mais conjuntos de dados são gerados ao nível do RNA e proteínas, bem como dados de estudos de associação genômica ampla (genome-wide association studies; GWAS) ou estudos de QTL para examinar a fertilidade. Algumas tentativas de integrar estes dados têm sido realizadas em bovinos. Além dos mRNAs que codificam proteínas, moléculas de RNAs não codificadores, tais como os microRNAs (miRNAs) que têm um papel importante na regulação da expressão genética, estão no foco das investigações mais recentes no endométrio, bem como no embrião e conceito. Mais recentemente, novas formas de comunicação celular através de microvesículas e exossomos tem sido encontrados no útero e oviduto, o que introduz um novo grau de complexidade na investigação. Em conclusão, embora muitos estudos tenham sido realizados para explorar o transcriptoma endometrial, ainda estamos no início da compreensão da complexa rede que regula o estabelecimento e manutenção da gestação.

**Palavras-chave:** útero; endométrio; transcriptoma

Workshop “Proseando com o embrião in vivo: os idiomas tubárico e uterino”

(IV Workshop do Projeto Temático Assinaturas da Receptividade)

#### **Função luteal e aspectos morfofuncionais da interação embrio-/feto-maternal em caninos**

Mariusz Kowalewski

Institute of Veterinary Anatomy, Vetsuisse-Faculty, University of Zurich, Zurich Switzerland.

A função reprodutiva de caninos domesticados (*Canis lupus familiaris*) é caracterizada por inúmeros mecanismos regulatórios espécie-específicos. Alguns desses mecanismos, como a inexistência de luteólise na ausência de gestação e a concomitante independência luteal da luteolisina uterina são únicos. Consequentemente, similares concentrações circulantes de esteroides e duração do corpo lúteo são observadas em cadelas gestantes e cíclicas não gestantes. Outra característica importante da função luteal canina é a aparente independência transitória para suporte gonadotrófico durante o diestro precoce, i.e., o momento da formação do corpo lúteo. Durante esse período as prostaglandinas, especialmente a PGE2, estão entre os fatores luteotróficos mais importantes. Posteriormente, durante a manutenção luteal, ambos PRL e LH são luteotróficos, sendo PRL o fator mais importante. Tendo em vista a ausência de um princípio ativo luteolítico na ausência de prenhez, a regressão luteal substancialmente estendida observada em cadelas não prenhes parece ser um processo degenerativo passivo, contrastando intensamente com a luteólise aguda pós-parto. A existência de diferentes mecanismos endócrinos regulatórios modulando a função luteal canina em cada situação, i.e. durante os ciclos de não-gestação e gestação, é portanto óbvia. Além disso, a importância dos esteroides luteais caninos no estabelecimento e manutenção da gestação surge do fato de que cães são a única espécie de animais domésticos sem esteroidogênese placentária. Nesse contexto, nossos dados recentes lançam como foco a placenta como um órgão endócrino envolvido na regulação da duração da gestação canina. Baseado nesses dados, podemos criar a hipótese de que a luteólise pré-parto em cães pode ocorrer devido à progesterona de origem luteal atingir um limiar baixo crítico, levando à ativação da interação placentária feto-maternal e resultando na ativação de vias placentárias de biossíntese de prostaglandinas. As células decíduais maternas derivadas do estroma parecem exercer uma função sinalizadora crítica no suporte da cascata de sinalização mediada pela progesterona. Com a ausência de um princípio anti-luteolítico conhecido de outras espécies de animais domésticos e caracterizado por um ambiente hormonal similar durante o diestro precoce, até o momento nenhum marcador de gestação precoce foi identificado para cães. Apenas após a implantação, a relaxina da placenta fetal pode ser utilizada como um marcador confiável para diagnóstico de prenhez. Recentemente, direcionado pela premissa de que também em cães os mecanismos para sincronização entre o desenvolvimento do blastocisto e a preparação uterina para a gestação devem ter evoluído com o intuito de manter a gestação, diversos genes alvo potencialmente envolvidos no processo de decidualização canina precoce (os também chamados "marcadores de decidualização") foram identificados no útero durante o estágio de pré-implantação. O processo de decidualização em cães foi detalhadamente estudado *in vitro* usando cultivo de células primárias. Considerando isso, os cães parecem ser modelos adequados para investigar mecanismos evolucionários precoces envolvidos na preparação para implantação e assegurando a sobrevivência embrionária posterior. Consequentemente, durante a conferência, aspectos selecionados da função luteal canina em cadelas prenhes e não prenhes serão discutidos. A comparação será feita entre mecanismos envolvendo o término da função luteal em cadelas prenhes e não prenhes juntamente ao envolvimento da interação placentária feto-maternal na cascata luteolítica nessa espécie.

**Palavras-chave:** cadela; corpo lúteo; gestação

Workshop "Proseando com o embrião in vivo: os idiomas tubárico e uterino"

(IV Workshop do Projeto Temático Assinaturas da Receptividade)

**Insulina e função do corpo lúteo: insights a partir de estudos em vacas e cadelas**

Sousa, LMMC; Silva, RS; Bonfim Neto, A; Cardoso, APMM; Papa, PC

School of Veterinary Medicine and Animal Science São Paulo Brazil.

O corpo lúteo (CL) é uma glândula endócrina fantástica, cuja função bem como sua regulação podem diferir entre uma espécie doméstica e outra. Em vacas, por exemplo, o CL cíclico produz progesterona (P4) por 14 dias e o CL gestacional por 9 meses. Não existe a produção de 17 $\beta$ -estradiol (E2) no CL de vacas e as gonadotrofinas e prostaglandina F2a são considerados fatores luteotróficos e luteolítico, respectivamente. No CL canino cíclico também ocorre uma produção considerável de P4, que por sua vez dura 60 dias, tanto quanto no CL gestacional. Ainda, nesta espécie o CL produz E2 e não existe uma luteolisina que desencadeie o processo cíclico de regressão luteínica. Recentemente nosso grupo demonstrou que o CL canino cíclico responde ao estímulo insulínico captando glicose. Proteínas que participam da sinalização insulínica para captação de glicose também foram localizadas e quantificadas, demonstrando uma expressão tempo-dependente. Ao contrário, o transportador de glicose sensível à insulina (GLUT4) e a cascata de proteínas relacionadas ainda não foram estudados no CL bovino. Entretanto, a manipulação hormonal comumente utilizada para promover a superovulação e a estimulação do folículo dominante estão associadas com aumento da produção de P4 e demonstramos que estes tratamentos também estão envolvidos com a modulação de componentes celulares envolvidos na sinalização insulínica. Administrar propilenoglicol, que aumenta a concentração plasmática de insulina, a vacas cíclicas parece aumentar a capacidade reprodutiva. Com base nestes achados, podemos inferir que a insulina regula a função luteínica, por meio de aumento da disponibilidade de glicose e produção hormonal.

Agradecimentos: FAPESP, CNPq, CAPES.

**Palavras-chave:** glicose; progesterona; bovinos

Workshop "Proseando com o embrião in vivo: os idiomas tubárico e uterino"



(IV Workshop do Projeto Temático Assinaturas da Receptividade)

**Suplementação com semente de girassol promove modificações endometriais e aumenta a taxa de concepção em fêmeas bovinas de corte**

Mariângela B. Cordeiro<sup>1</sup>; Mariana S. Peres<sup>2</sup>; Johnny M. de Souza<sup>2</sup>; Leriana G. Reis<sup>2</sup>; Manoel F. Sá Filho<sup>3</sup>; Milton M. Filho<sup>3</sup>; Guilherme P. Nogueira<sup>1</sup>; Guilherme Pugliesi<sup>3</sup>; Mario Binelli<sup>3</sup>; Claudia M. B. Membrive<sup>2</sup>

1. UNESP, Araçatuba, SP, Brazil; 2. UNESP, Dracena, SP, Brazil; 3. USP, Pirassununga, SP, Brazil.

A suplementação estratégica com ácido graxos poliinsaturados, especificamente linoléico e linolênico, melhora a performance reprodutiva de fêmeas bovinas. Os mecanismos pelos quais tal suplementação promoveria benefícios nas taxas de concepção são pouco conhecidos. A semente de girassol constitui uma importante fonte de ácido linoléico. A hipótese é que a suplementação com semente de girassol promove um incremento na taxa de concepção de fêmeas bovinas de corte e que tal efeito decorra de modificações promovidas no endométrio e corpo lúteo. Assim, objetivou-se avaliar: o efeito da suplementação com semente de girassol na taxa de concepção de vacas Nelore submetidas à IATF (Experimento 1); na taxa de concepção de novilhas cruzadas de corte, receptoras de embriões produzidos *in vitro*, submetidas à TETF (Experimento 2); nas concentrações plasmáticas de colesterol total, triglicerídeos, lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e progesterona (P4); assim como no diâmetro, perímetro e área total do corpo lúteo; e ainda a porcentagem de células luteais grandes (LLC) e pequenas (SLC) em relação ao total de células esteroidogênicas existentes no corpo lúteo (Experimento 3); no perfil de ácidos graxos existentes no tecido endometrial (Experimento 4); na abundância relativa nos transcritos dos genes envolvidos na biossíntese de eicosanóides no endométrio (Experimento 5) e seus efeitos no número, diâmetro, perímetro e área total das glândulas endometriais (Experimento 6). No Experimento 1, vacas Nelore submetidas ao protocolo de IATF, suplementadas com semente de girassol por 22 dias a partir da IATF, apresentaram maior taxa de concepção em relação ao grupo controle (66,67% vs. 47,76%;  $P < 0,05$ ). No Experimento 2, novilhas mestiças zebuínas submetidas ao protocolo de TETF, suplementadas com semente de girassol por 22 dias a partir da remoção do dispositivo de progesterona, apresentaram maior taxa de concepção em relação ao grupo controle (55,66% vs. 36,94%;  $P < 0,01$ ). No Experimento 3, vacas Nelore suplementadas com semente de girassol apresentaram maiores concentrações plasmáticas de colesterol total e HDL, maior área total do corpo lúteo no D15 (D0 = dia esperado para o estro) e maior porcentagem de LLC no corpo lúteo no D7 e D15, entretanto, tais características não foram correlacionadas ao aumento das concentrações plasmáticas de progesterona. No Experimento 4, verificou-se modificações no perfil lipídico do tecido endometrial nas vacas Nelore suplementadas com semente de girassol. No experimento 5, a suplementação com semente de girassol não alterou a transcrição de genes envolvidos na biossíntese de eicosanóides em vacas Nelore suplementadas. No experimento 6, vacas suplementadas apresentaram um aumento no número de glândulas endometriais. Conclui-se que tal suplementação promove um incremento na taxa de concepção de fêmeas bovinas de corte e que tal efeito decorra de modificações promovidas no endométrio.

Agradecimentos: FAPESP, CNPq, CAPES.

**Palavras-chave:** ácido linoléico; ômega-6; endométrio

SBTE 001 IATF, TETF e IA

Número de submissão 1457

**Eficiência reprodutiva de vacas nelores submetidas à IATF e repasse com touros**

Joaquim Esquerdo Ferreira; Otávia Reis Silva; Samuel Rodrigues Bonamichi Couto; Lara Nogueira Silencio; Marco Roberto Bourg Mello

*UFRRJ, Seropédica, RJ, Brasil*

O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da IATF associada ao repasse com touros na eficiência reprodutiva de fêmeas Nelores em uma estação de monta no período de novembro de 2013 a junho de 2014. Para tanto, 744 fêmeas Nelores, lactantes e não lactantes, foram divididas em dois tratamentos: Grupo Monta Natural (MN; n=396) no qual as fêmeas foram submetidas à monta natural durante toda a estação de monta (EM) que teve duração de 180 dias (novembro de 2013 a abril de 2014). No outro grupo (IATF+MN; n= 347) foi realizado protocolo de sincronização da ovulação para realização da IATF e posterior repasse com touros (fevereiro a abril 2014). Em dia aleatório do ciclo estral, as fêmeas receberam um dispositivo intravaginal (DIB®, Coopers, São Paulo, Brasil) e 2mg de benzoato de estradiol (ESTROGIN®, Agrolina, São Paulo, Brasil) por via intramuscular (im), sendo este considerado o dia 0 (D0). No D8, receberam (im) 150µg de cloprostenol (CIOSIN®, Intervet Schering Plough Animal Health, São Paulo, Brasil) e 1mg de cipionato de estradiol (ECP®, Pfizer, São Paulo, Brasil) sendo o dispositivo de P4 removido. No D10 foi realizada a IATF e posterior repasse com touro, 15 dias após as inseminações. O diagnóstico de gestação foi realizado por palpação retal com auxílio da ultrassonografia transretal no final da EM para diferenciar as gestações da IATF com as de monta natural. Para a realização das análises estatísticas foi utilizado o teste do qui-quadrado com nível de significância de 5%. Os animais submetidos à IATF+MN apresentaram semelhante taxa de concepção (56,3 vs 56,1) ao grupo MN ( $p>0,05$ ), no entanto, a taxa de prenhez (77,2 vs 56,1) assim como a eficiência reprodutiva (75,6 vs 54,9) foram maiores para o grupo IATF+MN. Essa diferença pode ser explicada pelo fato da sincronização prévia à IATF induzir a retomada da ciclicidade de fêmeas em anestro aumentando o número de prenhez quando estas fêmeas são expostas ao touro após a IATF, corroborando com os resultados de Cunha et al (Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 65, 1041-1048, 2013). No entanto, os achados no presente

trabalho discordam dos resultados de Gutierrez et al (Theriogenology, 81, 918–924, 2014) que não observaram diferenças na taxa de prenhez e ainda na eficiência reprodutiva quando comparado IATF + MN com apenas a MN na estação de monta de novilhas Angus. O que pode ser explicado pela categoria animal (vacas versus novilhas) e a raça dos animais (Nelore versus Angus). Conclui-se que o emprego da IATF associado ao repasse com touros resultou em maior taxa de prenhez e maior eficiência reprodutiva em relação ao uso apenas da monta natural. Adicionalmente tem-se um ganho devido ao valor agregado ao produto proveniente de uma Inseminação Artificial quando comparado com a monta natural.

**Palavras-chave:** Sincronização da ovulação; *Bos taurus indicus*; estação de monta

SBTE 002 IATF, TETF e IA

Número de submissão 1459

### **Efeito do prolongamento do proestro em protocolos estradiol e progesterona sobre a taxa de prenhes em novilhas**

#### ***Bos taurus***

Juan Manuel Persico<sup>1</sup>; Guillermo Esperanza<sup>2</sup>; Juan Cruz Muriel<sup>1</sup>; Gabriel Amilcar Bó<sup>3</sup>; Santiago Callejas<sup>4</sup>

1.Biogénesis Bagó, Garín, Argentina; 2. Grupo GCT, San Vicente, Argentina; 3. IRAC, Pozo del Tigre, Argentina;

4.CIVETAN CONICET UNCPBA, Tandil, Argentina.

O objetivo do presente estudo foi determinar o efeito do prolongamento do proestro sobre a taxa de prenhes em novilhas *Bos taurus* submetidas a um protocolo de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) convencional ou curto (7 vs. 6 dias). Utilizou-se 219 novilhas entre 14 a 15 meses de idade, Aberdeen Angus, com um escore de condição corporal (ECC) de  $3,4 \pm 0,3$  (escala 1-5). Prévio ao início do protocolo (Dia -1) foi realizada ultrassonografia (Honda HS 101V – 5 MHz) para avaliação das estruturas ovarianas (EST): corpo lúteo (20,4%) ou folículos  $\geq 10\text{mm}$  (79,6%), e avaliação para determinar o ECC. As fêmeas foram distribuídas homogeneamente (considerando EST e ECC) em 4 grupos em função da duração do tratamento com dispositivo intravaginal (DIV) com progesterona (P4; 6 ou 7 dias) e ao horário de aplicação do benzoato de estradiol (EB) para indução da ovulação. No Dia 0 foram administrados 2 mg de EB (Bioestrogen®, BiogénesisBagó, Argentina) pela via IM e receberam um DIV (Cronipres® Monodosis, BiogénesisBagó, Argentina) contendo 0,558 g de P4. O DIV foi retirado no Dia 6 (grupos 6D36 e 6D48) ou Dia 7 (grupos 7D24 e 7D36) e neste mesmo momento todos os animais receberam 0,150 mg de D-Cloprostenol (PGF; Enzaprost® D-C, BiogénesisBagó, Argentina) pela via IM. Para indução da ovulação 1 mg de EB foi aplicado pela via IM às 24 h (7D24, n=57), 36 h (7D36, n=55; 6D36, n=53) ou 48 h (6D48, n=54) posteriores à PGF. O horário da IATF foi fundamentado em dados de um experimento prévio de dinâmica ovariana, que resultaram para este estudo: 7D24=53,5h; 7D36=70,5h; 6D36=70,5h; 6D48=80h. A IATF foi realizada por um único veterinário, com sêmen congelado, de um único touro com conhecida fertilidade e de uma única partida. O diagnóstico da gestação foi realizado por ultrassonografia 47 dias após a IATF. Os dados de taxa de prenhes foram analisados estatisticamente por regressão logística (InfoStat, UNC, Argentina, 2015). Não foi encontrada nenhuma diferença entre 6D36 (62,3%) e 7D24 (68,4%;  $P>0,5$ ). Por sua vez, a taxa de prenhes de ambos os grupos foi maior que 7D36 (41,8%;  $P<0,05$ ). A taxa de prenhes do grupo 6D48 (50,0%) não foi diferente da dos grupos 6D36 e 7D36 ( $P>0,2$ ), mas foi menor que do 7D24 ( $P<0,05$ ). Concluindo, o tratamento curto com DIV combinado com um proestro prolongado (protocolo 6D36) resulta em semelhante taxa de prenhes do protocolo convencional do IATF (7D24). Pelo contrário, os protocolos 7D36 e 6D48 tiveram taxas mais baixas do que o convencional.

**Palavras-chave:** Novilhas; proestro; indução da ovulação

SBTE 003 IATF, TETF e IA

Número de submissão 1466

### **Redução do custo em programas de IATF substituindo a fonte de progestágeno em vacas leiteiras**

João Paulo Nascimento Andrade<sup>1</sup>; Fabiana Sonnewend<sup>1</sup>; João Paulo Morais Ferreira<sup>1</sup>; Otávia Reis Silva<sup>1</sup>; Osvaldo Almeida Resende<sup>2</sup>; Rosane Scatanburlo Lizieire Fajardo<sup>2</sup>; Marco Roberto Bourg Mello<sup>1</sup>

1. Universidade Federal Rural do Rio De Janeiro, Seropédica, RJ, Brasil; 2.PESAGRO - RIO, Seropédica, RJ, Brasil.

O presente trabalho teve como objetivo comparar a utilização de duas diferentes fontes de progestágenos (injetável x dispositivo) em vacas leiteiras submetidas à IATF. O estudo foi conduzido na PESAGRO-RIO, onde utilizaram 24 vacas Girolandas, não lactantes, com escore corporal médio de 3,75 (escala de 1 a 5) mantidas a pasto de *Brachiaria decumbens* com suplementação mineral ad libitum. As fêmeas foram distribuídas em dois lotes, grupo controle (GC; n=12) e grupo experimental (GE; n=12). Em dia aleatório do ciclo estral os animais do GC receberam um dispositivo intravaginal contendo 1g de progestágeno (DIB®, Coopers, São Paulo, Brasil) e foram aplicados 2,0 mg de benzoato de estradiol im (SINCRODIOL®, Ourofino, Brasil) sendo este dia considerado D0. No D8 o dispositivo intravaginal foi retirado e foram aplicados 150µg de cloprostenol im (SINCROCIO®, Ourofino, Brasil). No D9 os animais receberam 1,0 mg de benzoato de estradiol im. Os animais do grupo experimental (GE; n=12) receberam tratamento igual aos do GC, exceto no D0 onde, em substituição ao dispositivo intravaginal, foram aplicados 150mg de progesterona injetável im (SINCROGEST injetável® - Ouro Fino, Brasil). A IATF foi realizada no D10 às 18h00min em ambos os grupos. A partir do D8 foram realizadas avaliações ginecológicas com auxílio de ultrassom (Mindray DP-2200 Vet) a cada 12h, nos animais de ambos os grupos a fim de acompanhar a dinâmica folicular e comparar os seguintes parâmetros reprodutivos: crescimento folicular

médio (CFM), taxa de ovulação (TO), diâmetro do folículo ovulatório (DFO), momento da ovulação (MO) em relação à aplicação da prostaglandina e a taxa de concepção (TC). Os grupos foram analisados estatisticamente pelos testes T, para amostras quantitativas, e Qui-Quadrado para amostras qualitativas ambos com significância de 5%. Os grupos controle (dispositivo) e experimental (P4 injetável) apresentaram CFM de 1,03 ( $\pm 0,41$ ) e 0,86 ( $\pm 0,37$ ) mm/dia, TO de, 100 (12/12), 83% (10/12) DFO de 15,74 ( $\pm 4,09$ ) e 14,28mm ( $\pm 3,78$ ), MO de 57h48min ( $\pm 8,26$ ) e 58h48min ( $\pm 12,01$ ) após a aplicação do Sincrocio e TC de 50 (6/12) e 42% (5/6), respectivamente. Não houve diferença estatística para nenhum dos parâmetros avaliados entre os dois tratamentos. Foi verificada uma redução de 48% no custo por tratamento, substituindo P4 injetável (R\$6,03) por dispositivo intravaginal (R\$11,53). Há de se considerar ainda que os dispositivos intravaginais causam vaginite em alguns animais e eventualmente se perdem durante o protocolo, inviabilizando a eficiência da sincronização. O presente trabalho sugere que a progesterona injetável pode ser uma alternativa em protocolos de IATF de vacas leiteiras Girolando, com eficiência similar aos dispositivos intravaginais, além de reduzir consideravelmente o custo. Estudos com maior número de animais estão sendo realizados para consolidação da nossa hipótese de trabalho.

**Palavras-chave:** Bovinos; reprodução; progesterona

SBTE 004 IATF, TETF e IA

Número de submissão 1467

#### **A análise computadorizada da motilidade espermática apresenta boa capacidade de predição da fertilidade do sêmen para PIV ou IATF?**

Leticia Zoccolaro Oliveira<sup>1</sup>; Janaina Torres Carreira<sup>2</sup>; Halim Atique Netto<sup>2</sup>; Rogerio Fonseca Guimaraes Peres<sup>3</sup>; Hugo Borges Graff<sup>3</sup>; Fabio Morato Monteiro<sup>4</sup>; Erika Aline Ribeiro Dias<sup>4</sup>; Clara Slade Oliveira<sup>5</sup>; Rubens Paes de Arruda<sup>1</sup>

1.USP, Pirassununga, SP, Brasil; 2.UNIRP, São José do Rio Preto, SP, Brasil; 3.AFB, Nova Xavantina, MT, Brasil; 4.IZ, Sertãozinho, SP, Brasil; 5.EMBRAPA, Valena, RJ, Brasil.

Têm sido constantemente relatadas variadas taxas de fertilidade na PIV e na IATF de acordo com o sêmen utilizado. Embora diversos sejam os testes laboratoriais disponíveis para avaliar as inúmeras características espermáticas que podem influenciar a capacidade fecundante do sêmen, a análise computadorizada de motilidade espermática avaliada pelo sistema CASA ainda é um dos poucos parâmetros utilizados pelas centrais para a seleção das partidas a serem liberadas no mercado. O presente estudo teve por objetivo avaliar a capacidade de predição da análise computadorizada da motilidade espermática na fertilidade seminal in vivo e in vitro. Foram inseminadas 1324 vacas pluríparas Nelore (40 dias pós-parto), com ECC entre 2,5 e 3,25, sincronizadas com o mesmo protocolo de IATF, utilizando-se sêmen de 7 touros Angus da mesma central de IA. De cada touro, foram utilizadas 1 a 3 diferentes partidas (n=14). A distribuição das partidas foi feita de forma equiparada. A avaliação da taxa de concepção (TC) foi realizada por ultrassonografia aos 40 dias após IATF. As mesmas partidas de sêmen utilizadas na IATF foram utilizadas na PIV. Para a PIV, ovários foram coletados de vacas Nelore oriundas de abatedouro e apenas CCO de qualidade I foram selecionados para maturação, sendo avaliada a produção de blastocistos (PB) no dia 7 após a FIV. Para cada partida de sêmen, realizaram-se três repetições da PIV de embriões (n=42). A motilidade progressiva (MP) foi avaliada nas mesmas partidas utilizadas na IATF e na PIV. As doses foram descongeladas em banho-maria a 37°C/30 seg e uma alíquota de 2 µL foi avaliada pelo CASA. A TC por partida foi analisada por regressão logística e as médias da PB e MP foram comparadas pelo teste de Tukey, considerando nível de significância de 5%. A média geral da TC na IATF foi 48,9%, não sendo observado efeito de inseminador, lote nem ECC na TC da IATF (P>0,05). Porém, foi observada diferença entre partidas (P<0,05), onde TC1a=40% (n=120)a, TC2a=48% (n=104)abc, TC2b=49% (n=76)abc, TC3a=44% (n=134)ab, TC4a=45% (n=71)abc, TC4b=41% (n=93)a, TC4c=55% (n=71)abc, TC5a=50% (n=88)abc, TC5b=54% (n=84)bc, TC6a=49% (n=88)abc, TC6b=54% (n=83)bc, TC6c=51% (n=80)abc, TC7a=47% (n=131)abc, TC7b=58% (n=101)c. A média geral ( $\pm$ DP) da PB (%) na PIV foi 36,8 $\pm$ 11,8, sendo também observada diferença (P<0,05) entre algumas partidas, onde PB1a=23,9 $\pm$ 3,5a; PB2a=23,7 $\pm$ 6,1a; PB2b=40,0 $\pm$ 9,3ab; PB3a=42,2 $\pm$ 1,9b; PB4a=37,8 $\pm$ 4,8ab; PB4b=39,4 $\pm$ 17,6ab; PB4c=44,6 $\pm$ 17,9ab; PB5a=44,3 $\pm$ 11,6ab; PB5b=31,3 $\pm$ 10,9ab; PB6a=26,1 $\pm$ 11,8ab; PB6b=42,2 $\pm$ 14,2ab; PB6c=35,0 $\pm$ 7,6ab; PB7a=34,2 $\pm$ 15,2ab; PB7b=50,0 $\pm$ 5,0b. Por fim, também foram observadas diferenças estatísticas entre algumas partidas na avaliação da MP obtidas pelo CASA. Porém, as partidas que apresentaram menor MP não foram as mesmas que apresentaram menor TC e/ou PB. As MPs (% média $\pm$ DP) obtidas foram: MP1a=40,5 $\pm$ 11,0a; MP2a=43,2 $\pm$ 8,4a; MP2b=41,3 $\pm$ 9,2abc; MP3a=39,3 $\pm$ 8,1a; MP4a=31,8 $\pm$ 3,3abc; MP4b=42,2 $\pm$ 14,2a; MP4c=22,3 $\pm$ 2,2abc; MP5a=30,2 $\pm$ 10,3abc; MP5b=26,2 $\pm$ 3,4ab; MP6a=51,0 $\pm$ 11,0c; MP6b=45,8 $\pm$ 1,8c; MP6c=50,8 $\pm$ 7,4abc; MP7a=38,3 $\pm$ 10,2abc; MP7b=36,3 $\pm$ 9,4a (P<0,05). Concluiu-se que a motilidade progressiva espermática avaliada pelo CASA se apresentou como um fraco parâmetro para estimar a real capacidade fertilizante da amostra seminal, tanto na PIV como na IATF, visto que as partidas que apresentaram maior motilidade não foram as partidas que, necessariamente, apresentaram melhor desempenho nos programas reprodutivos avaliados.

**Palavras-chave:** Qualidade do sêmen; taxa de concepção; produção de embriões

SBTE 005 IATF, TETF e IA

Número de submissão 1468

**Retenção de placenta e endometrite subclínica: prevalência e relação com o desempenho reprodutivo de vacas leiteiras mestiças**

Rodrigo Rossini Buso; Carla Cristian Campos; Thaisa Reis Santos; Tatiane Silva Maia; João Paulo Elsen Saut; Ricarda Maria Santos

*UFU, Uberlândia, MG, Brasil.*

Objetivou-se avaliar os efeitos do tipo de parto (eutócico vs. distócico) e do período do ano (chuvoso vs. seco) sobre a prevalência de retenção de placenta (RP) e de endometrite subclínica (ES), verificar a relação entre as duas patologias, e os efeitos dessas sobre a taxa de descarte, o período de serviço (PS) e número de IA/concepção. A RP foi avaliada no primeiro dia pós-parto (DPP). A citologia endometrial foi realizada entre 30 e 80 DPP, considerando positivos casos  $\geq 5\%$  de neutrófilos. Os dados foram analisados por regressão logística e análise de variância no programa Minitab ( $P < 0,05$ ). A prevalência de RP foi de 14,93% (69/462) e de ES de 27,49% (127/462). Foi detectada tendência de efeito ( $P = 0,10$ ) da RP sobre a prevalência da ES. Partos distócicos aumentaram a prevalência de RP e vacas que pariram nos meses chuvosos tiveram maior prevalência de ES ( $P < 0,05$ ). A RP elevou a taxa de descarte ( $P < 0,05$ ), a duração do período de serviço ( $P < 0,05$ ) e o número de IA por concepção ( $P < 0,05$ ), enquanto a ES não afetou essas variáveis ( $P > 0,05$ ). Conclui-se que a retenção de placenta tende a ser um fator de risco para endometrite subclínica, distocia predispõe à retenção de placenta e partos ocorridos no período chuvoso aumentam os casos de endometrite subclínica. Há um impacto negativo na eficiência reprodutiva de vacas leiteiras mestiças acometidas por retenção de placenta.

**Palavras-chave:** Endometrite subclínica; pós-parto; retenção de placenta

SBTE 006 IATF, TETF e IA

Número de submissão 1469

**Uso de protocolos hormonais para indução da puberdade em novilhas nelores e seu impacto sobre a taxa de prenhez (Relato de caso)**

João Paulo Morais Ferreira; João Paulo Nascimento Andrade; Fabiana Sonnewend; Otávia Reis Silva; Marco Roberto Bourg Mello

*UFFRJ, Seropédica, RJ, Brasil.*

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a indução da puberdade associada a protocolos de IATF em novilhas Nelores pré-púberes. O experimento foi conduzido na fazenda Saco da Prata, em Itaguaí-RJ, entre outubro de 2015 e março de 2016. Para tanto, 43 novilhas (idade média de 23 meses, peso médio de 283 Kg, escore médio de 3,25 em escala de 1 a 5) e acíclicas foram divididas em três grupos de acordo com o peso que apresentaram no dia da primeira avaliação, de forma que a distribuição de peso fosse semelhante entre os grupos. Sessenta dias antes do início da estação de monta, os animais do grupo experimental 1 (GE1; n=15) receberam em dia aleatório do ciclo estral um dispositivo intravaginal (DIB, Coopers, São Paulo, Brasil) de terceiro uso, sendo este considerado dia 0 (D0). No D12 foi aplicado 1mg de cipionato de estradiol (ECP, Pfizer, São Paulo, Brasil) por via intramuscular. O grupo experimental 2 (GE2; n=14) recebeu tratamento semelhante ao GE1 exceto no D0 onde, em substituição ao dispositivo intravaginal, foram aplicados 150mg de progesterona injetável de longa ação (SINCROGEST injetável - Ouro Fino, Brasil) via subcutânea. No grupo controle (GC; n=14) nenhum tratamento hormonal foi realizado. O diagnóstico da indução da puberdade foi realizado 10 dias após a aplicação do ECP, no D22 por uma única avaliação ultrassonográfica. A estação de monta foi igual para os três grupos: IATF com posterior repasse com Touro e teve duração de 3 meses. A sincronização da ovulação foi iniciada em todos os animais no dia 04 de dezembro com a colocação de um dispositivo intravaginal de terceiro uso e aplicação de 2mg de benzoato de estradiol - D0 (Sincrodol, Ouro Fino, Brasil). No D8 o dispositivo foi retirado e foram aplicados 0,5mg de ECP, 150µg de cloprostenol (SINCROCIO, Ourofino, Brasil) e 300UI de eCG, SincroeCG- Ouro Fino, São Paulo, Brasil) via intramuscular. As inseminações foram realizadas no D10 (15 de dezembro), sendo o touro colocado com as fêmeas no dia 05 de janeiro e retirado no dia 06 de março. O diagnóstico de gestação foi realizado por palpação retal 60 dias após a retirada do touro. Os resultados foram analisados estatisticamente pelos testes T, para amostras quantitativas e Qui-Quadrado para amostras qualitativas ambos com significância de 5%. As taxas de indução de ciclicidade foram de 80 (12/15), 29 (4/14) e 14% (2/14), respectivamente para os grupos GE1, GE2 e GC sendo observada diferença estatística ( $P < 0,05$ ) do GE1 frente aos demais grupos. As taxas de prenhez após IATF foram de 13 (2/15); 36 (5/14) e 36% (5/14) e de prenhez total após o repasse com touro de 60 (9/16); 57 (8/14) e 64% (9/14), respectivamente, para GE1, GE2 e GC não sendo observada diferença entre os tratamentos. Portanto, pode-se concluir que o protocolo GE1 foi eficiente para induzir a ciclicidade de novilhas Nelore.

**Palavras-chave:** Bovinos; maturidade sexual; progesterona

SBTE 007 IATF, TETF e IA

Número de submissão 1475

**Inseminação cervical profunda em ovelhas leiteiras sincronizadas com dispositivos intravaginais sem uso de antibiótico (dados parciais)**

Renata Casali; Luana Zanferari; Maicon Lorena Gaissler Pinto; Rafael Toazza; Paulo Gregianin; Gabriel Bittencourt Camargo; Giselle Dias; Alceu Mezzalira  
 UDESC, Lages, SC, Brasil.

A transposição dos anéis cervicais pode otimizar a inseminação artificial (IA) na ovelha, já que possibilita reduzir o refluxo observado nas IA superficiais. Este estudo avalia a eficiência da inseminação cervical profunda em ovelhas leiteiras, sincronizadas com um dispositivo intravaginal, confeccionado com tampão vaginal de uso humano (OB™), ao qual foi incorporado 60 mg de MAP e 0,5 mL de uma solução de violeta de genciana 1%. Os implantes foram mantidos por 12 dias em 33 ovelhas Lacone, sendo que no momento da retirada foi aplicado 500 UI de eCG e 12,5 mg de dinoprost trometamina por via intramuscular. Os tampões retirados apresentavam discreta deposição de secreção mucopurulenta. Após 24 h foi realizada a observação deaios a cada 12 h, sendo a IA realizada 12 h após a sua manifestação. Todas as ovelhas demonstraram cio sendo 5 ovelhas com 24 h (2 IA superficial e 3 profunda), 19 com 36 h (11 IA superficial e 8 profunda) e 9 com 48 h (4 IA superficial e 5 profunda). As IA foram realizadas com um pool de sêmen fresco de dois carneiros diluído em Tris com 5% de gema de ovo, com dose inseminante de 200 milhões de espermatozoides em 0,25 mL. As ovelhas eram contidas e os membros posteriores elevados em um cavalete, com inclinação de 45° em relação ao solo. Na IA superficial o sêmen era depositado na entrada da cervix com auxílio de espêculo vaginal. Na IA cervical profunda, após a localização da cervix era borrifado xilocaína 10% spray (Xylestesin – Cristália). O fundo de saco vaginal era pinçado e tracionado até aproximar a cervix do orifício vaginal. A cateterização era realizada com um aplicador (Alta Genetics®), por um período não superior a 2 minutos, sendo a deposição do sêmen realizada a partir do terceiro anel cervical. O refluxo de sêmen foi percebido em 16 de 17 (94,1%) animais inseminados por via cervical superficial contra 1 de 16 (6,2%) com IA profunda. O diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias após a inseminação por ultrassonografia. A taxa de prenhez foi de 47,0% para a IA cervical e 68,7% para IA profunda, que não diferiram por X2 (P<0,05), provavelmente pelo número reduzido de animais (dados preliminares). O momento da IA influenciou as taxas de prenhez nos tratamentos. Na IA com 24h (superficial 0% - 0/2 e profunda 33,3% - 1/3 de prenhez). Na IA com 36h (superficial 45,4% - 5/11 e profunda 87,5% - 7/8 de prenhez). Na IA com 48h (superficial 75% - 3/4 e profunda 60% - 3/5 de prenhez). Os dados obtidos sugerem que o dispositivo empregado, sem o uso de antibióticos, é indicado para sincronizar o cio de ovelhas em lactação; que o reduzido refluxo na IA profunda pode permitir a redução da concentração espermática, o que traria um melhor aproveitamento do carneiro; que a concentração deaios entre as 36 e 48h após o tratamento torna possível a opção por IATF entre 48h e 60h. Todavia, essas observações devem ser melhor investigadas.

**Palavras-chave:** Cateterismo cervical; refluxo de sêmen; sincronização deaios

SBTE 008 IATF, TETF e IA

Número de submissão 1477

**Efeito da suplementação à base de milho por 41 dias durante o início do protocolo de IATF no perfil metabólico e desempenho reprodutivo de fêmeas nelore.**

Rogério Fonseca Guimarães Peres<sup>1</sup>; Rafael Carvalho<sup>1</sup>; Hugo Borges Graff<sup>2</sup>; Jose Humberto Furlan Junior<sup>2</sup>; Adnan Darin Pereira Rodrigues<sup>1</sup>; Gessica Araujo Franco<sup>3</sup>; Duane Keisler<sup>4</sup>; Michael F Smith<sup>4</sup>; Ky Pohler<sup>3</sup>; Jose Luiz Moraes Vasconcelos<sup>1</sup>

1.UNESP Botucatu, Botucatu, SP, Brasil; 2.AFB, Barra do Garças, MT, Brasil; 3.University of Tennessee, Knoxville, Estados Unidos; 4.University of Missouri, Columbia, Estados Unidos.

Esse estudo avaliou o efeito da suplementação utilizando milho moído no início do protocolo de IATF (D0) até o diagnóstico de gestação (D41) no perfil metabólico (Exp1) e desempenho reprodutivo de fêmeas Nelore (Exp1 e 2). Todas as fêmeas foram sincronizadas com o protocolo sugerido por Meneghetti et al. (Theriogenology, 72, 179-189, 2009), sendo que a IA foi realizada no D11. No Exp1, foram utilizadas 681 primíparas (P) com ECC médio de 2,84±0,36 e PV: 407,12±42,58 kg; coletas de sangue foram realizadas no D0, D11, D41 e D52 para dosagem de IGF-1, GH e Leptina. No Exp2, 2.395 fêmeas foram utilizadas, incluindo novilhas (N, n=648; 4 lotes), P (n=635; 6 lotes) e multíparas (M, n=1112; 10 lotes) com ECC médio de 2,96±0,36 e PV: 401,32±50,06 kg. Vacas P e M foram ressincronizadas caso estivessem vazias no D41. Após o parto, cada grupo de vacas foi aleatoriamente distribuído em: sem suplementação (SS) ou 1,0 kg de milho/vaca/dia do D0 ao D11 e 2,2 kg/vaca/dia do D11 ao D41 (SM). Os grupos permaneceram em pastagens de Brachiaria brizantha com livre acesso a água e sal mineral. Variáveis contínuas foram avaliadas pelo PROC MIXED e variáveis binomiais pelo PROC GLIMMIX e PROC LOGISTIC do programa SAS. Pasto foi a unidade experimental utilizada. Houve interação tratamento e dia na concentração de IGF-1, sendo que o grupo SM apresentou maior IGF-1 no D11 (138,4±2,2 vs 130,8±2,1 ng/mL) e menor no D41 (135,5±2,2 vs 141,5±2,1 ng/mL) do que o grupo SS, além disso a concentração sérica média de IGF-1 foi maior para o grupo SM do que SS (140,3±1,7 vs. 122,7±1,8 ng/mL). Independentemente de tratamento, a probabilidade de prenhez no D11 foi correlacionada positivamente com a concentração de IGF-1 no D11 (p=0,02), de leptina (p=0,02) e GH (p=0,04) no D0 e negativamente com concentração de IGF-1 no D41 (p=0,04). Houve efeito linear positivo da concentração de IGF-1 no D52 na probabilidade de prenhez na segunda IA (p=0<01) e efeito linear positivo de IGF-1 no D11 na probabilidade de prenhez final (p<0,01). No Exp2, não houve efeito do tratamento (p=0,50) na taxa de prenhez (TP) a 1ª IA (SS: 51,0% e SM: 52,4%), entretanto na 2ª IA o grupo SM (44,3%) tendeu (P=0,1) a ter maior TP comparado a SS (38,5%). Independente de tratamento vacas M (56,6%) tiveram

maior ( $p<0,01$ ) TP que N (48,0%) e P (50,5%) na 1ª IA e maior que P na 2ª IA (46,2% vs 36,6%). Vacas com ECC abaixo de 2,75 tiveram menor ( $p<0,01$ ) TP (44,08% vs. 55,50%). Houve interação entre tratamento e categoria na TP ao final da estação de monta. P do grupo SM tiveram maior TP final comparadas as P do grupo SS (77,8 vs 65,7%), entretanto, M do grupo SM tiveram menor TP final do que M do grupo SS (87,0 vs 92,0%) sem qualquer efeito nas N (89,3%). A TP final foi diferente ( $P<0,01$ ) entre as categorias N, P e M (89,32%a, 71,74%b e 89,46%a). Bezerros de vacas P do grupo SM foram mais pesados ( $p<0,01$ ) a desmama quando comparados aos bezerros de vacas P do grupo SS ( $207,79\pm1,54$  vs.  $194,57\pm1,73$ ). Vacas P e M do grupo SM foram mais pesadas ( $425,31\pm2,36$  e  $464,25\pm1,81$  kg) no final da EM comparado ( $p=0,01$ ) as vacas do grupo SS ( $415,17\pm2,47$  e  $457,83\pm1,84$  kg). A suplementação à base de milho moído por 41 dias aumentou IGF-1 no momento da primeira e segunda IA, que foi positivamente correlacionada a TP e aumentou a TP na segunda inseminação em vacas P e M, aumentou a TP final em P, entretanto diminuiu a TP final em M. Apesar disso, o peso das vacas P e M no final da estação de monta foi superior, assim como aumentou o peso a desmama dos bezerros de vacas P.

Agradecimento: FAPESP nº 2014/03209-0.

**Palavras-chave:** Hormônios metabólicos; reprodução; nelore

SBTE 009 IATF, TETF e IA

Número de submissão 1480

#### **Indutores de ovulação em protocolo de curta duração em ovelhas de leite**

Luana Zanferari; Renata Casali; Rafael Toazza; Giselle Dias; Guilherme dos Santos; Paulo Gregianin; Alceu Mezzalana  
*UDESC, Lages, SC, Brasil.*

A ovinocultura de leite está em franco crescimento, especialmente no estado de Santa Catarina. O sucesso da ovinocultura leiteira depende de uma adequada distribuição de partos durante o ano, que permita uma constante produção de leite. Todavia, poucos estudos têm avaliado protocolos de indução de cio fora da estação reprodutiva, em ovelhas leiteiras, especialmente os que avaliam os indutores de ovulação. Este estudo teve como objetivo avaliar as taxas de prenhez de ovelhas leiteiras (Lacaune e Milchaf) sincronizadas com um protocolo curto de progesterona e empregando dois indutores de ovulação (GnRH e Benzoato de estradiol). As ovelhas ( $n=132$ ) receberam um implante de progesterona (Progespon® Syntex) por 6 dias, e a seguir submetidas aos grupos experimentais: Grupo controle ( $n=44$ ) nas quais foi aplicado 500 UI de eCG (Novormon® Syntex) e 1 mL de prostaglandina (Lutalyse® Pfizer) na retirada do implante; Grupo BE ( $n=42$ ) nas quais, além do eCG e prostaglandina, foi aplicado 1,0 mL de benzoato de estradiol (RICBE® Tecnopec) 24 horas após a remoção do implante e o grupo GnRH, ( $n=43$ ), semelhante ao controle, porém com a aplicação de 2,0 mL de GnRh (Sincroforte® Ourofino) 36 horas após a retirada do implante. A inseminação artificial foi realizada 52 horas após a retirada dos implantes, por laparoscopia. Para a laparoscopia, os animais passaram por jejum alimentar de 24 horas e um jejum hídrico de 12 horas. Antes do procedimento, foi ministrado 0,2 mL de acepram (Apromazin 1%, Syntec) intramuscular e 0,5 mL de lidocaína (Lidovet® Bravet) no local da introdução dos trocateres. Em seguida, foi inflada a cavidade abdominal com CO<sub>2</sub>, para melhor visualizar os cornos uterinos. Com auxílio de uma ocular eram localizados os cornos uterinos e com a pipeta de inseminação (WTA) era procedida a inseminação. O sêmen utilizado foi coletado de carneiros da raça Lacaune e Milchaf, sexualmente maduros. A coleta foi realizada com vagina artificial em temperatura de 38 °C e o sêmen avaliado segundo critérios do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Após a avaliação do pool de sêmen, de cada raça, foi diluído em Tris com 5% de gema de ovo, de maneira a obter uma dose inseminante de 100 milhões de espermatozoides em volume de 0,25. O diagnóstico de gestação foi realizado através da ultrassonografia via trans-retal 30 dias após a inseminação artificial. Os dados de prenhez foram analisados pelo teste de  $\chi^2$  com 5% de significância. A taxa de prenhez no Grupo Controle foi 45,4% (24/44), não diferindo ( $P>0,05$ ) do grupo GnRH 49,0% (21/43), demonstrando que não houve efeito positivo nas taxas de prenhez, com o emprego do GnRH. Em contrapartida, observou-se uma significativa redução ( $P<0,05$ ) na taxa de prenhez no grupo BE 8,9% (4/45), demonstrando que o Benzoato de estradiol não é adequado para induzir a ovulação em ovelhas leiteiras, no momento em que foi aplicado (24 horas após a retirada do implante).

**Palavras-chave:** GnRH; protocolo curto; estradiol

SBTE 010 IATF, TETF e IA

Número de submissão 1485

#### **Impacto na manifestação de estro, diâmetro do folículo ovulatório, taxa de ovulação e prenhez utilizando CE ou GnRH como indutores da ovulação em protocolos de IATF em novilhas de corte**

Eduardo Pradebon da Silva<sup>1</sup>; Marcelo Maronna Dias<sup>1</sup>; Amanda Bilha Machado<sup>1</sup>; Lais Steffen Gambin<sup>1</sup>; Humberto Binsfeld Bonadiman<sup>1</sup>; Mariana da Silva<sup>1</sup>; Martin Viana Klafke<sup>1</sup>; Andressa Varella Gonsioroski<sup>1</sup>; Marcio Flores Cunha Chaiben<sup>2</sup>; João Batista Souza Borges<sup>1</sup>

*1. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil; 2. Agener União, Porto Alegre, RS, Brasil.*

O objetivo deste estudo foi comparar a manifestação de estro, diâmetro do folículo ovulatório, taxa de ovulação e prenhez em novilhas Angus (*Bos taurus*) utilizando cipionato de estradiol (CE) ou GnRH como indutores da ovulação em protocolos

de inseminação artificial à tempo fixo (IATF). No dia 0, as novilhas ( $n=415$ ) com escore de condição corporal (ECC) médio de  $3,0 \pm 0,2$  e peso médio de  $315 \pm 23$  kg, foram avaliadas por ultrassonografia transretal para verificar a ausência de corpo lúteo (ACL  $n=202$ ) ou presença de corpo lúteo (PCL  $n=213$ ). As novilhas receberam um dispositivo intravaginal com 1g de progesterona (P4) (Primer®, Agener União, São Paulo - Brasil) e 2mg de benzoato de estradiol (BE), im, (RIC-BE®, Agener União, São Paulo - Brasil). No dia 8, o dispositivo de P4 foi removido, e foram aplicados 500 mcg de cloprostenol sódico, im, (ESTRON®, Agener União, São Paulo - Brasil). As novilhas tiveram a região sacral pintada (TELL TAIL®, GEA, New Zealand) para controlar a manifestação de estro. Quatro grupos foram formados de acordo com os tratamentos e o status ovariano: CE-ACL [( $n=101$ ); 0,5mg CE, im, (SincroCP®, Ouro Fino, São Paulo - Brasil) no dia 8 e IATF 48h após]; GnRH-ACL [( $n=101$ ); 25mcg de Licerelina, im, (GestranPlus®, Agener União, São Paulo - Brasil) no momento da IATF dia 10]; CE-PCL [( $n=113$ ); 0,5mg CE, im, no dia 8 e IATF 48h após] e GnRH-PCL [( $n=101$ ); 25mcg de Licerelina, im, no momento da IATF no dia 10]. No dia 10 (IATF) e 11, as novilhas foram examinadas (7.5 MHz linear transducer MediSono® P3V, USA) para avaliação do diâmetro do folículo ovulatório e taxa de ovulação, e, no dia 30, para realizar o diagnóstico de gestação. A detecção do estro foi confirmada quando a tinta estava removida no dia 10. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o PROC GLIMMIX do software SAS (SAS® 9.3). A expressão de estro foi maior ( $P=0,0001$ ) nos grupos CE (ACL=93% e PCL=94%) comparada aos grupos GnRH (ACL=63,37% e PCL=72%). O diâmetro do folículo ovulatório foi diferente ( $P<0,05$ ) de acordo com o CL (ACL= $9,6 \pm 0,1$ ; PCL= $10,3 \pm 0,1$ ), mas não diferiu entre os tratamentos hormonais. A taxa de ovulação não foi diferente ( $P>0,05$ ) entre os grupos e tratamentos, CE-ACL (80%, 8/10); GnRH-ACL (87,5%, 7/8); CE-PCL (90%, 9/10), GnRH-PCL (100%, 10/10). A taxa de prenhez foi maior ( $P<0,05$ ) nas novilhas GnRH-PCL (68%, 68/100), comparada aos grupos CE-ACL (50,5%, 51/101); GnRH-ACL (50,5%, 51/101); CE-PCL (54,8%, 62/113). Neste estudo concluímos que a presença do CL, no início do protocolo de IATF, tem um efeito positivo no diâmetro do folículo ovulatório e na taxa de prenhez da IATF. Considerando o protocolo hormonal, novilhas tratadas com CE tiveram maior manifestação de estro, contudo o uso do GnRH como indutor da ovulação determinou uma maior taxa de prenhez.

**Palavras-chave:** Novilhas de corte; estro; IATF

SBTE 011 IATF, TETF e IA

Número de submissão 1487

#### **Ressincronização em ovelhas: efeito sobre a função luteal e taxa de prenhez**

Vladinis Oliveira Miranda; Fernando Caetano de Oliveira; Karina Lemos Goularte; Jenniffer Hauschildt Dias; Henrique Schneider Pestano; Carlos Eduardo Ranquetat Ferreira; Sergio Farias Vargas Jr; Thomaz Lucia Jr; Arnaldo Diniz Vieira; Bernardo Garziera Gasperin

*UFPEL, Pelotas, RS, Brasil.*

Na produção animal há uma necessidade do estabelecimento de técnicas que permitam concentrar as atividades reprodutivas. Em bovinos a realização de duas IATF consecutivas (ressincronização) se mostrou vantajosa; entretanto, em ovinos não existem relatos. Desta forma, este estudo foi delineado com o objetivo de determinar o efeito da ressincronização sobre a função luteal e taxa de prenhez em ovinos. Os experimentos foram realizados de março a maio de 2016, na região Sul do Rio Grande do Sul ( $31^{\circ}48'09.8''S$   $52^{\circ}30'55.7''W$ ). No primeiro experimento, 19 ovelhas Texel receberam (D-10) um dispositivo intravaginal (DIV; 60mg acetato de medroxiprogesterona) e aplicação de 250UI de eCG (Novormon, Zoetis, São Paulo, Brasil) no dia da remoção (D0). Doze dias após, nove ovelhas receberam um novo DIV (RES) por oito dias e dez ovelhas permaneceram como controle (CON). Os níveis séricos de progesterona (P4) foram determinados nos dias 12, 15 e 19. A função luteal foi influenciada (Mixed procedure SAS) pelo dia e grupo, sendo que no dia da inserção dos DIV (D12) foram observados  $6,6 \pm 0,6$  vs.  $6,2 \pm 0,7$  ng/mL P4, não diferindo entre CON e RES, conforme esperado ( $P>0,05$ ). Já no dia 15, observou-se  $5,8 \pm 0,5$  vs.  $4,7 \pm 0,5$  ng/mL de P4 ( $P<0,05$ ), para CON e RES, respectivamente. No dia 19 os níveis de P4 foram  $<1$  ng/mL em todos os animais, indicando luteólise ( $P>0,05$ ). Em um segundo experimento, 68 ovelhas Corriedale receberam um implante vaginal (CIDR®, Zoetis, São Paulo, Brasil) em D-12, 250UI eCG e retirada do CIDR em D0 e IATF 54 h após (cervical superficial;  $200 \times 10^6$  espermatozoides). Posteriormente foram formados três grupos: CON = repasse com monta natural ( $n=28$ ); RES sem diagnóstico de gestação (s/DG) = CIDR de D10 a D20, eCG em D20 e IATF 54h após ( $n=20$ ); RES com DG (c/DG) = CIDR D16 a D25, DG no D25 com aplicação de eCG nas não gestantes e IATF 54 h após. As taxas de prenhez na primeira IATF dos grupos CON (52%), RES s/DG (60%) e RES c/DG (50%) não diferiram ( $P>0,05$ ; Qui quadrado). A segunda IATF sem o conhecimento do status gestacional (RES s/DG), não afetou a manutenção da gestação (US com 35 dias) da primeira IATF. No terceiro experimento, 45 ovelhas Corriedale foram submetidas a uma IATF (D2) e após 11 dias (D13) receberam um CIDR de segundo uso. Após sete dias (D20) o CIDR foi retirado e os animais receberam uma aplicação de 250UI de eCG, seguida da IATF 54h após (D22). A taxa de prenhez na primeira IATF (38%; 17/45) não diferiu ( $P>0,05$ ) da segunda IATF (43%; 12/28). Conclui-se que a suplementação de progestágeno após a IATF diminui a síntese de progesterona pelo corpo lúteo, sem afetar a luteólise. A ressincronização e a realização de uma segunda IATF em fêmeas com status gestacional desconhecido não afeta a prenhez da primeira IATF e possibilita a obtenção de taxas de prenhez semelhantes entre as duas IATFs. Esta ferramenta permitiu a obtenção de 65% de prenhez nos primeiros 20 dias da estação reprodutiva. Os autores agradecem à Zoetis pela cedência dos hormônios.

**Palavras-chave:** IATF; ressincronização; ovelhas

SBTE 012 IATF, TETF e IA

Número de submissão 1494

**Aumento da recuperação embrionária e da qualidade dos embriões após tratamento intrauterino: relato de caso**

Otávia Reis Silva; Hellen de Sousa Fernandez; Joaquim Esquerdo Ferreira; Marco Roberto Bourg Mello

*UFRRJ, Seropédica, RJ, Brasil.*

A produção de embriões é uma biotécnica da reprodução que permite otimizar o mérito genético de uma doadora (correspondente feminino da IA) permitindo que o mesmo animal gere um maior número de descendentes em menor tempo. A produção de embriões in vivo, por meio da superovulação (SOVs), é influenciada por vários fatores, como o estresse térmico, a nutrição, o estado fisiológico e ainda causas infecciosas que podem alterar o microambiente uterino, comprometendo a quantidade e a qualidade dos embriões produzidos. O útero é considerado um ambiente estéril que por vezes pode sofrer contaminação por patógenos oportunistas acarretando problemas na viabilidade dos embriões produzidos pela doadora. O objetivo deste resumo é relatar um tratamento intrauterino (infusão uterina) realizado em uma doadora Nelore pertencente à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), no município de Seropédica, Rio de Janeiro. A doadora apresentava histórico de baixa eficiência na produção de embriões viáveis em superovulação realizada anteriormente. Objetivando melhorar o ambiente uterino e consequentemente aumentar a recuperação e a viabilidade embrionária foi realizado um único tratamento na doadora, sete dias antes do início do protocolo de superovulação. Sendo o mesmo feito através de infusão uterina com associação de 300 mg de gentamicina, 150 mg de cloridrato de bromexina, 100 mg de cloreto de benzalcônio (Gentrin® - Infusão uterina, São Paulo, Brasil) acrescidos de 75 mg de cefquinoma (Cobactan® intramamário Schering Plough Animal Health, São Paulo, Brasil). Os medicamentos foram administrados empregando uma pipeta de infusão uterina para bovinos com auxílio de uma seringa. Após a lavagem uterina no dia da colheita, o filtro coletor foi levado ao laboratório para procura e avaliação morfológica dos embriões recuperados. A superovulação e a colheita dos embriões, antes e depois do tratamento uterino, foram realizadas empregando o mesmo protocolo hormonal, o mesmo sêmen e sendo feita pelo mesmo técnico. A doadora em questão não produziu nenhum embrião viável e apresentou taxa de recuperação embrionária de 33% (três corpos lúteos sendo recuperada somente uma estrutura não transferível) antes do tratamento uterino. Após o tratamento, o mesmo animal produziu 24 estruturas, sendo 22 embriões transferíveis (92% de embriões viáveis) e uma taxa de recuperação de 141%. Essa alta recuperação ocorreu devido à impossibilidade de contagem precisa dos corpos lúteos em função da alta resposta superovulatória. Portanto, foi observado um aumento da recuperação embrionária e uma melhora na qualidade dos embriões da doadora Nelore do presente estudo após o tratamento intrauterino.

**Palavras-chave:** Biotécnica; transferência de embrião; reprodução

SBTE 013 IATF, TETF e IA

Número de submissão 1499

**Efeito do hcg em baixas doses na dinâmica folicular e ovulação em durante o estro em ovelhas sincronizadas no anestro**

José Francisco Cox<sup>1</sup>; Jesús Dorado<sup>2</sup>; Fernando Saravia<sup>1</sup>

*1.Universidad de Concepción, Chillán, Chile; 2.Universidad de Córdoba, Córdoba, Espanha.*

A sincronização convencional de estro utiliza eCG para estimular o final do desenvolvimento folicular sem considerar que este controle depende principalmente do LH (Campbell et al., Biol. Reprod, 76, 719-727, 2007). Este estudo objetivou estudar o efeito do hCG, que se liga especificamente ao receptor de LH, até o final do desenvolvimento folicular, ovulação e fertilidade na ovulação em ovelhas em anestro. No Experimento 1, 34 ovelhas Highlander em programa nutricional foram tratadas com progesterona (CIDR G, Pfizer, Chile) por 6 dias e cloprostenol (0,125 mg, im, Ciclase, Syntex, Chile) no momento da remoção do dispositivo. Naquele momento, as ovelhas foram agrupadas como segue: Controle (sem gonadotrofina, n=8), eCG (350 UI im Novormon, Syntex; n= 9), hCG-200 e hCG-300 (200 e 300 UI im Chorulon, Intervet, Chile; n= 8 e 9 respectivamente). As ovulações foram induzidas por estradiol (0,2 mg im Estradiol Benzoato, Syntex, Chile) 24 h após CIDR. Folículos com diâmetro  $\geq 4$  em 24 h após CIDR, na ovulação e o CL 10 dias após a ovulação foram medidos por US transretal (sonda 10 MHz, Honda 2100 Vet) e registrados em arquivos individuais enquanto o momento da ovulação foi detectado acessando o ovário a cada 8 h desde 48 h após CIDR (tempo médio entre a última observação de um folículo e seu desaparecimento). O intervalo para ovulação foi considerado o período entre a remoção do CIDR e a ovulação. No Experimento 2 outro grupo de 20 ovelhas foi sincronizado como descrito acima e no momento da remoção do CIDR foram alocadas em Grupo eCG (350 UI, n=10) e Grupo hCG (300 UI, n=10), as ovulações foram induzidas como descrito acima e 24 h depois, as ovelhas foram expostas para os mesmos carneiros com fertilidade conhecida (razão 1:10). As ovelhas foram escaneadas para estradiol, aos 7 e 35 dias após a monta para acessar o desenvolvimento folicular, ovulação funcional e a fertilidade da ovulação. Análises estatísticas descritivas e paramétricas foram realizadas por meio do pacote STATISTICA 10.1 (StatSoft Inc, Tulsa, OK, USA). Resultados do Exp. 1 mostraram que as ovelhas apresentaram um número similar de folículos com 24 h, mas naquelas tratadas com hCG foram maiores do que nas controle



(4,5 ± 0,11 vs. 5,0 ± 0,18, 5,6 ± 0,27 e 5,7 ± 0,24 mm para controles, eCG, hCG-200 e 300, média ± SEM; P < 0,05); ovelhas controle quase não ovularam (12,5%) enquanto ovelhas tratadas com eCG, hCG-200 e hCG-300 não apresentaram diferença em relação à taxa de ovulação (77,8%, 100% e 100%), folículos ovulados (1,2, 2,0 e 1,8), diâmetro do folículo ovulatório (5,1 ± 0,19; 5,9 ± 0,34 e 6,1 ± 0,52 mm), diâmetro do CL (9,8 ± 0,46, 10,1 ± 0,47 e 9,8 ± 0,28 mm) e intervalo para a ovulação (62,2 ± 2,06, 59,5 ± 1,27 e 63,0 ± 1,92 h; P > 0,10). Exp. 2 mostrou que ovelhas tratadas com eCG e hCG exibiram número e diâmetro de folículos e CLs similar assim como a fertilidade da ovulação (2,1 vs. 2,0; 5,2 ± 0,21 vs. 5,0 ± 0,2 mm; 1,7 vs. 1,9; 10,5 ± 0,32 vs. 10,2 ± 0,25 mm; e 67,7% vs. 67,7% de taxa de gestação, respectivamente; P > 0,10). Coletivamente os resultados sugerem que hCG possa estimular o desenvolvimento terminal do folículo com a mesma eficiência do eCG.

Campbell et al. Biol. Reprod, 76, 719-727, 2007.

**Palavras-chave:** hCG; sincronização do estro, ovino

SBTE 014 IATF, TETF e IA

Número de submissão 1500

**Avaliação do atraso do momento da inseminação em novilhas nelore cíclicas que não apresentaram cio após a remoção do dispositivo de P4**

João Paulo Mendes Lollato<sup>1</sup>; Talita Lara Conti<sup>2</sup>; Reuel Luiz Gonçalves<sup>3</sup>; Guilherme Pizzo Santos<sup>3</sup>; Juan Manuel Rodriguez Persico<sup>3</sup>; Arlindo José Saran Junior<sup>4</sup>; José Nélcio de Sousa Sales<sup>5</sup>; Pietro Sampaio Baruselli<sup>6</sup>; Roberta Machado Ferreira<sup>6</sup>

1.Universidade Estadual de Maringá, Arapongas, PR, Brasil; 2.Departamento de Medicina Veterinária - FZEA-USP, Pirassununga, SP, Brasil; 3.Biogénesis-Bagó, Curitiba, PR, Brasil; 4.Profissional Autônomo, Casa Branca, SP, Brasil; 5.Departamento de Medicina Veterinária - UFLA, Lavras, MG, Brasil; 6.Departamento de Reprodução Animal - FMVZ - USP, São Paulo, SP, Brasil.

Diversos estudos prévios reportaram que a taxa de concepção de novilhas que não apresentam cio durante o protocolo de IATF é inferior à daquelas que apresentam cio. O objetivo dos estudos foi avaliar se o atraso do momento da inseminação de novilhas Nelore cíclicas submetidas à IATF e que não apresentaram cio até 48h da retirada do dispositivo intravaginal aumentaria a taxa de concepção destas, aproximando-a da taxa de novilhas que apresentaram cio. Nos estudos 1 e 2 foram utilizadas 1004 novilhas com ECC médio 3,17 ± 0,02 e 328 novilhas com ECC médio 3,30 ± 0,02 (escala de 1 a 4). Todas as novilhas eram da raça Nelore, tinham entre 18 e 24 meses de idade e eram provenientes de duas fazendas de Nova Bandeirantes – MT. Todas as novilhas estavam cíclicas e foram tratadas com protocolo para sincronização de emergência de onda folicular e ovulação para IATF. Brevemente, em dia aleatório do ciclo estral (D0) as novilhas receberam um dispositivo intravaginal Cronipres<sup>®</sup> Mono Dose com 1 g de progesterona (P4, Biogénesis Bagó, Brasil), 1 a 2 mg de benzoato de estradiol i.m. (BE; Bioestrogen<sup>®</sup>, Biogénesis Bagó, Brasil) e 75 a 150 µg de D-cloprostenol i.m. (PGF; Croniben<sup>®</sup>, Biogénesis Bagó, Brasil). No D8, o dispositivo foi removido e foram administrados 75 a 150 µg de D-cloprostenol, 200 UI de gonadotropina coriônica equina (eCG, Ecegon<sup>®</sup>, Biogénesis Bagó, Brasil) e 0,5 mg de cipionato de estradiol (Croni-Cip<sup>®</sup>, Biogénesis Bagó, Brasil) IM. Bastão marcador de cio foi aplicado na base da cauda de todas as novilhas. No D10, 48h após a retirada do dispositivo, foi realizada a avaliação da ocorrência e intensidade do cio (D10). No estudo 1, todas as novilhas foram inseminadas 48h após a remoção do dispositivo, independente da apresentação e intensidade de cio. No estudo 2, as novilhas que haviam apresentado cio forte (sem marca de bastão) ou moderado (marca de bastão bem fraca) até 48h da remoção do dispositivo foram imediatamente inseminadas (48h) e aquelas que não haviam apresentado cio (bastão bem marcado ou intacto) foram inseminadas 6h mais tarde (54h). Todas as inseminações foram realizadas pelo mesmo veterinário com sêmen de touros da raça Aberdeen Angus e Senepol. O diagnóstico de gestação foi realizado 40 dias após a IA (Mindray DP2200VET). Os dados foram analisados por regressão logística (PROC GLIMMIX do SAS). Não houve efeito de dose de BE, PGF ou touro (P > 0,05). No Estudo 1, 76,3% (766/1004) das novilhas apresentaram cio. Novilhas inseminadas 48h após a remoção do dispositivo e que apresentaram cio tiveram maior taxa de concepção [55,2% (423/766)] que novilhas que não apresentaram cio [40,8% (97/238), P = 0,001]. No Estudo 2, 60,7% (199/328) das novilhas apresentaram cio. A taxa de concepção foi superior (P = 0,0001) em novilhas que apresentaram cio e foram inseminadas 48h após a retirada do dispositivo [63,3% (126/199)] em relação às que não apresentaram cio e foram inseminadas 54h [38,8% (50/129)], não havendo indícios sobre o benefício do atraso da IA. Portanto, independente do horário de inseminação (48 ou 54h após a remoção do dispositivo de P4), novilhas Nelore cíclicas que não apresentaram cio até 48h da retirada do dispositivo de P4 apresentam menor taxa de concepção à IATF comparadas àquelas que apresentaram cio e foram inseminadas 48h após a remoção do dispositivo de P4.

Agradecimentos: Fazendas Beira Rio e Novo Brasil, CNPq 486089/2013-4 e 152030/2016-6.

**Palavras-chave:** Estro; fertilidade em novilhas; momento de inseminação

SBTE 015 IATF, TETF e IA

Número de submissão 1501

**Indução de ciclicidade em novilhas nelore pré-púberes com dispositivo cronipres<sup>®</sup> mono dose com 1 g de P4 novo ou previamente utilizado por 8 dias**

Reuel Luiz Gonçalves<sup>1</sup>; Talita Lara Conti<sup>2</sup>; Guilherme Pizzo Santos<sup>1</sup>; Juan Manuel Rodriguez Persico<sup>1</sup>; Arlindo José Saran Junior<sup>3</sup>; José Nélio de Sousa Sales<sup>4</sup>; Pietro Sampaio Baruselli<sup>5</sup>; Roberta Machado Ferreira<sup>5</sup>

1.Biogénesis-Bagó, Curitiba, PR, Brasil; 2.Departamento de Medicina Veterinária - FZEA - USP, Pirassununga, SP, Brasil; 3.Profissional Autônomo, Casa Branca, SP, Brasil; 4.Departamento de Medicina Veterinária - UFLA, Lavras, MG, Brasil; 5.Departamento de Reprodução Animal - FMVZ - USP, São Paulo, SP, Brasil.

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia da utilização e reutilização do dispositivo intravaginal Cronipres Mono Dose com 1 g de P4 (Biogénesis Bagó, Brasil) para indução de ciclicidade em novilhas Nelore pré-púberes. Para tal, 227 novilhas Nelore entre 16 e 24 meses de idade, pesando no mínimo 250 kg e com ECC mínimo de 2,5 (escala de 1 a 4), provenientes de duas fazendas localizadas em Nova Bandeirantes – MT, passaram por avaliação ultrassonográfica (útero e ovários; Mindray DP2200VET). Novilhas com ausência de CL nos ovários e útero infantil (classificação 1 e 2, em escala de espessura de 1 a 4) foram consideradas pré-púberes e submetidas à indução de ciclicidade. Tais novilhas foram homogeneamente (ECC, peso e idade) divididas para receber um dispositivo Cronipres Mono Dose com 1 g de P4 novo ou previamente utilizado por 8d (D0). A remoção do dispositivo foi realizada após 10d (D10) concomitante à administração de 0,5 mg de cipionato de estradiol (Croni-Cip, Biogénesis Bagó, Brasil) IM. Todas as novilhas foram reavaliadas (útero e ovários) 30 dias após a remoção do dispositivo (D40). Os dados foram analisados por regressão logística (PROC GLIMMIX do SAS). Semelhantes médias de ECC ( $2,91 \pm 0,02$  e  $2,91 \pm 0,02$ ;  $P = 0,77$ ), peso ( $269,0 \pm 3,9$  e  $267,7 \pm 3,9$ ;  $P = 0,64$ ) e escore de desenvolvimento uterino no D0 ( $1,55 \pm 0,05$  e  $1,53 \pm 0,05$ ;  $P = 0,64$ ) foram observados nas novilhas tratadas com dispositivo novo ou previamente usado, respectivamente, demonstrando a homogeneidade entre os grupos antes do tratamento. Na avaliação de ciclicidade realizada 30 dias após o término do tratamento, observou-se aumento do escore de desenvolvimento uterino em novilhas de ambos os grupos, não havendo diferença ( $P = 0,88$ ) entre aquelas tratadas com dispositivo novo ( $3,00 \pm 0,06$ ) ou previamente utilizado ( $3,00 \pm 0,06$ ). Também não foi observada diferença na proporção de novilhas com CL no D40 (dispositivo novo: 65,5%, usado: 68,7%;  $P = 0,55$ ). Finalmente, a taxa de indução de ciclicidade foi semelhante ( $P = 0,99$ ) entre novilhas tratadas com dispositivo novo (81,3%, 91/112) ou previamente usado por 8d (81,7%, 94/115). Portanto, protocolos com dispositivo Cronipres Mono Dose com 1 g de P4 novos ou previamente utilizados por 8d são igualmente eficientes em induzir ciclicidade em novilhas Nelore pré-púberes.

Agradecimentos: Fazendas Beira Rio e Novo Brasil, CNPq 486089/2013-4 e 405770/2015-4.

**Palavras-chave:** Puberdade; *Bos indicus*; progesterona

SBTE 016 IATF, TETF e IA

Número de submissão 1502

#### **Redução das doses de benzoato de estradiol e PGF2 em protocolos de IATF de novilhas nelore cíclicas tratadas com dispositivo cronipres® mono dose com 1g de P4**

Roberta Machado Ferreira<sup>1</sup>; Talita Lara Conti<sup>2</sup>; Arlindo José Saran Junior<sup>3</sup>; Reuel Luiz Gonçalves<sup>4</sup>; Guilherme Pizzo Santos<sup>4</sup>; Juan Manuel Rodriguez Persico<sup>4</sup>; José Nélio de Sousa Sales<sup>5</sup>; Pietro Sampaio Baruselli<sup>1</sup>

1.Departamento de Reprodução Animal - FMVZ - USP, São Paulo, SP, Brasil; 2.Departamento de Medicina Veterinária - FZEA - USP, Pirassununga, SP, Brasil; 3.Profissional Autônomo, Casa Branca, SP, Brasil; 4.Biogénesis Bagó, Curitiba, PR, Brasil; 5.Departamento de Medicina Veterinária - UFLA, Lavras, MG, Brasil.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da redução das doses de benzoato de estradiol (BE) e de PGF2α no protocolo de IATF com dispositivo intravaginal Cronipres® Mono Dose com 1 g de progesterona (P4; Biogénesis Bagó, Brasil) em novilhas Nelore cíclicas. Para tal, 588 novilhas Nelore entre 18 e 24 meses de idade, pesando em média  $316,5 \pm 2,0$  kg e com ECC médio  $3,17 \pm 0,02$  (escala de 1 a 4), provenientes de duas fazendas localizadas em Nova Bandeirantes - MT foram utilizadas. Todas as novilhas possuíam CL e foram tratadas com o mesmo protocolo de sincronização de emergência de onda folicular e ovulação para IATF, diferindo apenas quanto à administração de diferentes doses de BE e PGF2α no protocolo. Brevemente, em dia aleatório do ciclo estral (D0) todas as novilhas receberam um dispositivo intravaginal Cronipres® Mono Dose com 1 g de P4 e foram homogeneamente (ECC, peso e idade) divididas para receber 1 ou 2 mg de BE (Bioestrogen®, Biogénesis Bagó, Brasil) no D0 e 150 ou 75 µg de D-cloprostenol (PGF2α, Croniben®, Biogénesis Bagó, Brasil) IM tanto no D0 como D8, em arranjo fatorial 2x2. No D8, o dispositivo foi removido e foram administrados 150 ou 75 µg de D-cloprostenol, exatamente a mesma dose administrada no D0, 200 UI de eCG (Ecegon®, Biogénesis Bagó, Brasil) e 0,5 mg de cipionato de estradiol (Croni-Cip®, Biogénesis Bagó, Brasil) IM. Bastão marcador de cio foi aplicado na base da cauda de todas as novilhas. A IATF foi realizada por um único veterinário 48h após a retirada do dispositivo e conjuntamente a avaliação da ocorrência e intensidade do cio (D10). Sêmen de dois touros Aberdeen Angus foram utilizados. O diagnóstico de prenhez por IA (P/IA) foi realizado 40d após a IATF (Mindray DP2200VET). Os dados foram analisados por regressão logística (PROC GLIMMIX do SAS). Não houve efeito de touro ( $P = 0,86$ ) ou interação entre dose de BE e de PGF2α ( $P = 0,51$ ). A proporção de novilhas em cio e P/IA não diferiu entre os tratamentos com 1 ou 2 mg de BE no D0 [cio: 74,4% (218/293) vs. 78,0% (230/295);  $P = 0,30$  e P/IA: 54,9% (163/293) vs. 49,8% (147/295);  $P = 0,18$ , respectivamente]. Da mesma forma, não foi observado efeito da redução da dose de 150 para 75 µg de PGF2α sobre a ocorrência de cio [77,1% (226/293) vs. 75,3% (222/295);  $P = 0,57$ ] e a P/IA [51,5% (151/293) vs. 53,2% (157/295);  $P = 0,74$ ]. Além disso, novilhas que apresentaram cio tiveram maior P/IA do que aquelas que não apresentaram cio [56,5% (253/448) vs. 39,3% (55/140);  $P = 0,001$ ], independentemente do tratamento. O peso vivo, no entanto, não influenciou a

P/IA, a qual não diferiu ( $P = 0,56$ ) entre novilhas com peso  $< 300\text{kg}$  (51,3%) ou  $\geq 300\text{ kg}$  (53,0%), provavelmente pelo fato de todas estarem com maturidade uterina (escore de desenvolvimento uterino 3 a 4, em escala de 1 a 4). Conclui-se que é possível reduzir a dose de BE para 1 mg (D0) e de PGF2 $\alpha$  para 75  $\mu\text{g}$  de D-Cloprostenol (D0 e D8) em protocolos de IATF de novilhas Nelore cíclicas sem prejuízos à detecção de cio ou P/IA.

Agradecimentos: Fazendas Beira Rio e Novo Brasil, CNPq 486089/2013-4 e 152030/2016-6.

**Palavras-chave:** Eficiência reprodutiva; novilha *Bos indicus*; inseminação artificial em tempo fixo

SBTE 017 IATF, TETF e IA

Número de submissão 1503

**Comparação da taxa de concepção de novilhas nelore cíclicas com ou sem CL no início do protocolo de IATF com dispositivo intravaginal Cronipres® mono dose com 1g de P4**

Arlindo José Saran Junior<sup>1</sup>; Talita Lara Conti<sup>2</sup>; Reuel Luiz Gonçalves<sup>3</sup>; Guilherme Pizzo Santos<sup>3</sup>; Juan Manuel Rodriguez Persico<sup>3</sup>; José Nélío de Sousa Sales<sup>4</sup>; Pietro Sampaio Baruselli<sup>5</sup>; Roberta Machado Ferreira<sup>5</sup>

1.Profissional Autônomo, Casa Branca, SP, Brasil; 2.Departamento de Medicina Veterinária - FZEA - USP, Pirassununga, SP, Brasil; 3.Biogénesis Bagó, Curitiba, PR, Brasil; 4.Departamento de Medicina Veterinária - UFLA, Lavras, MG, Brasil; 5.Departamento de Reprodução Animal - FMVZ - USP, São Paulo, SP, Brasil.

O objetivo deste estudo foi avaliar comparativamente as taxas de estro e concepção de novilhas Nelore cíclicas com ou sem corpo lúteo (CL) no dia do início do protocolo de IATF, utilizando-se dispositivo intravaginal Cronipres® Mono Dose com 1 g de progesterona (P4; Biogénesis Bagó, Brasil). Para tal, 577 novilhas Nelore entre 18 e 24 meses de idade, pesando em média  $308,1 \pm 2,4\text{ kg}$  e com ECC médio  $3,13 \pm 0,02$  (escala de 1 a 4), provenientes de duas fazendas localizadas em Nova Bandeirantes – MT foram utilizadas. Foram consideradas novilhas cíclicas aquelas que possuíam maturidade uterina detectada por palpação transretal (classificação 3 e 4 na escala de 1 a 4 para espessura uterina), independente da presença de CL. Todas as novilhas cíclicas foram tratadas com o mesmo protocolo base de sincronização de emergência de onda de crescimento folicular e ovulação para IATF. Brevemente, em dia aleatório do ciclo estral (D0) as novilhas com e sem CL receberam um dispositivo intravaginal Cronipres® Mono Dose com 1 g de P4 e 2 mg de benzoato de estradiol (Bioestrogen®, Biogénesis Bagó, Brasil). As novilhas com CL receberam também 150  $\mu\text{g}$  de D-Cloprostenol (PGF; Croniben®, Biogénesis Bagó, Brasil) IM. No D8, o dispositivo foi removido e foram administrados 150  $\mu\text{g}$  de D-Cloprostenol, 200 UI de eCG (Ecegon®, Biogénesis Bagó, Brasil) e 0,5 mg de cipionato de estradiol (Croni-Cip®, Biogénesis Bagó, Brasil) IM em todas as novilhas. Bastão marcador de cio foi aplicado na base da cauda de todas as novilhas. A IATF foi realizada por um único veterinário e com sêmen de três touros da raça Aberdeen Angus 48h após a retirada do dispositivo, conjuntamente a avaliação da ocorrência de cio (D10). O diagnóstico de gestação foi realizado 40d após a IATF (Mindray DP2200VET). Os dados foram analisados por regressão logística (PROC GLIMMIX do SAS). Semelhante taxa de estro ( $P = 0,87$ ) foi observada em novilhas com CL no D0 [78,0% (230/295)] ou sem CL no D0 [77,0% (217/282)]. Da mesma forma, mesma taxa de concepção ( $P = 0,22$ ) foi observada independentemente da presença de CL no D0 [com CL: 49,3% (144/292) vs sem CL: 54,5% (153/281)]. Portanto, novilhas Nelore com CL que receberam PGF no D0 apresentaram semelhantes taxas de estro e concepção à IATF às novilhas sem CL no D0 e que possuíam adequada maturação uterina. Assim, novilhas com adequada maturação uterina alcançam similar fertilidade à IATF, independente da presença de CL no D0.

Agradecimentos: Fazendas Beira Rio e Novo Brasil, CNPq 486089/2013-4 e 405770/2015-4.

**Palavras-chave:** Maturidade uterina; puberdade; novilhas *Bos indicus*

SBTE 018 IATF, TETF e IA

Número de submissão 1504

**Efeito do uso de PGF2 $\alpha$  no D0 e diferentes doses de eCG no D8 de protocolos de IATF com dispositivo cronipres® mono dose 1g sobre a taxa de concepção de novilhas nelore cíclicas**

Renato Wihby Girotto<sup>1</sup>; Talita Lara Conti<sup>2</sup>; Althuir Arthur Schneider<sup>1</sup>; José Luiz Baldassari Leite Neto<sup>1</sup>; Reuel Luiz Gonçalves<sup>3</sup>; Guilherme Pizzo Santos<sup>3</sup>; Juan Manuel Rodriguez Persico<sup>3</sup>; José Nélío de Sousa Sales<sup>4</sup>; Pietro Sampaio Baruselli<sup>5</sup>; Roberta Machado Ferreira<sup>5</sup>

1.RG Genética avançada, Água Boa, MT, Brasil; 2.Departamento de Medicina Veterinária - FZEA - USP, Pirassununga, SP, Brasil; 3.Biogénesis Bagó, Curitiba, PR, Brasil; 4.Departamento de Medicina Veterinária - UFLA, Lavras, MG, Brasil; 5.Departamento de Reprodução Animal - FMVZ - USP, São Paulo, SP, Brasil.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da utilização de uma dose de PGF2 $\alpha$  no início do protocolo de IATF (D0) e de 0, 200 ou 300 UI de eCG no momento da retirada do dispositivo intravaginal com 1 g de P4 sobre a taxa de concepção de novilhas Nelore com corpo lúteo no D0. Para tal, 877 novilhas Nelore provenientes de duas fazendas em Barra do Garças e Campinápolis-MT e com ECC médio  $3,01 \pm 0,02$  no D0 integraram o estudo. No D0, todas as novilhas receberam um dispositivo intravaginal com 1g de P4 (Cronipres® Mono Dose, Biogénesis Bagó, Brasil), 2 mg de benzoato de estradiol (Bioestrogen®, Biogénesis Bagó, Brasil) IM e foram homogeneamente distribuídas para receber ou não 150  $\mu\text{g}$  de D-Cloprostenol (PGF2 $\alpha$ , Croniben®, Biogénesis Bagó, Brasil) IM. No D8, o dispositivo foi removido e todas as novilhas

receberam 150 µg de D-Cloprostenol e 0,5 mg de cipionato de estradiol (Croni-Cip®, Biogénesis Bagó, Brasil) IM. Nesse mesmo dia, novilhas que receberam ou não PGF2α no D0 foram redistribuídas para receber 0, 200 ou 300 UI de eCG (Ecegon®, Biogénesis Bagó, Brasil), em arranjo fatorial 2x3. A IATF foi realizada 48h após a remoção do dispositivo por um único veterinário, com sêmen de seis touros das raças Nelore e Aberdeen Angus distribuídos homogeneamente entre os seis grupos. O diagnóstico de gestação foi feito 45d após a IATF (Mindray DP2200VET). Os dados foram analisados por regressão logística (PROC GLIMMIX do SAS). Não houve efeito de touro (P = 0,79) nem interação entre o uso de PGF2α no D0 e eCG no D8 (P=0,76). Semelhante taxa de concepção (P = 0,65) foi observada em novilhas tratadas (42,0%, 188/443) ou não (39,4%, 171/434) com PGF2α no D0. No entanto, maior taxa de concepção (P = 0,04) foi detectada em novilhas tratadas com 200 UI de eCG (45,8%, 132/288) comparadas àquelas que não receberam esta gonadotrofina (35,5%b, 103/290). Não foi observada diferença na taxa de concepção quando 200 ou 300 UI de eCG (40,8%ab, 122/299) foram utilizadas. Apesar de não haver efeito da administração de PGF2α no D0 do protocolo de IATF sobre a taxa de concepção de novilhas Nelore, a necessidade de seu uso pode estar relacionada ao nível de produção de P4 pelo CL e ao nível de metabolização hepática deste hormônio, que por sua vez, podem ser dependentes da nutrição. Assim, novos estudos devem ser realizados antes que se possa recomendar a exclusão da PGF2α no D0 de tais protocolos. Em contrapartida, o uso da eCG aumentou a taxa de concepção de novilhas Nelore em protocolos de IATF e a redução da dose de 300 para 200 UI desta gonadotrofina pôde ser realizada sem causar prejuízos à eficiência reprodutiva de tais animais. Assim, com base com presente estudo, não há necessidade do uso da PGF2α no D0 e pode-se reduzir a dose de eCG de 300 para 200 UI no D8 do protocolo de IATF de novilhas tratadas com dispositivo intravaginal Cronipres® Mono Dose com 1g de P4.

Agradecimentos: Fazendas Estrela do Vale e Água Preta, CNPq 486089/2013-4 e 405770/2015-4.

**Palavras-chave:** Progesterona; fertilidade de novilhas; gonadotrofina coriônica equina

SBTE 019 IATF, TETF e IA

Número de submissão 1505

**Comparação da taxa de concepção de novilhas nelore cíclicas tratadas com dispositivo cronipres® mono dose com 0,558g ou 1g de progesterona**

Talita Lara Conti<sup>1</sup>; Arlindo José Saran Junior<sup>2</sup>; Reuel Luiz Gonçalves<sup>3</sup>; Guilherme Pizzo Santos<sup>3</sup>; Juan Manuel Rodriguez Persico<sup>3</sup>; José Nélío de Sousa Sales<sup>4</sup>; Pietro Sampaio Baruselli<sup>5</sup>; Roberta Machado Ferreira<sup>5</sup>

1.Departamento de Medicina Veterinária - FZEA - USP, Pirassununga, Brasil; 2.Profissional Autônomo, Casa Branca, SP, Brasil; 3.Biogénesis Bagó, Curitiba, PR, Brasil; 4.Departamento de Medicina Veterinária - UFLA, Lavras, MG, Brasil; 5.Departamento de Reprodução Animal - FMVZ - USP, São Paulo, SP, Brasil.

O objetivo deste estudo foi avaliar comparativamente as taxas de cio e concepção de novilhas Nelore cíclicas submetidas à IATF utilizando-se dispositivo intravaginal Cronipres® Mono Dose com 0,558g ou 1 g de progesterona (P4; Biogénesis Bagó, Brasil). Para tal, 288 novilhas Nelore entre 18 e 24 meses de idade, pesando em média 316,1 ± 2,0 kg e com ECC médio 3,15 ± 0,02 (escala de 1 a 4), provenientes de duas fazendas localizadas em Nova Bandeirantes – MT foram utilizadas. Todas as novilhas possuíam CL e foram tratadas com o mesmo protocolo base de sincronização de emergência de onda de crescimento folicular e ovulação para IATF, diferindo apenas quanto à concentração de P4 do dispositivo intravaginal utilizado. Brevemente, em dia aleatório do ciclo estral (D0) as novilhas foram homogeneamente (ECC, peso e idade) divididas para receber um dispositivo intravaginal Cronipres® Mono Dose com 0,558 g ou 1 g de P4. Neste mesmo momento, todas as novilhas foram tratadas com 1 mg de benzoato de estradiol (Bioestrogen®, Biogénesis Bagó, Brasil) e 75 µg de D-Cloprostenol (Croniben®, Biogénesis Bagó, Brasil) IM. No D8, o dispositivo foi removido e foram administrados 75 µg de D-Cloprostenol, 200 UI de eCG (Ecegon®, Biogénesis Bagó, Brasil) e 0,5 mg de cipionato de estradiol (Croni-Cip®, Biogénesis Bagó, Brasil) IM. Bastão marcador de cio foi aplicado na base da cauda de todas as novilhas. A IATF foi realizada por um único veterinário e com sêmen de apenas um touro da raça Aberdeen Angus 48h após a retirada do dispositivo, conjuntamente a avaliação da ocorrência e intensidade do cio (D10). O diagnóstico de gestação foi realizado 40 dias após a IATF (Mindray DP2200VET). Os dados foram analisados por regressão logística (PROC GLIMMIX do SAS). Semelhantes taxas de cio (P = 0,61) e concepção (P = 0,16) foram observadas quanto novilhas foram tratadas com dispositivo Cronipres® Mono Dose com 0,558 g de P4 [cio: 76,2% (109/143) e concepção: 45,8% (65/142)] ou de 1 g de P4 [cio: 73,1% (106/145) e concepção: 54,2% (78/144)]. Portanto, o aumento da concentração de P4 de 0,558 g para 1 g no dispositivo intravaginal não afetou negativamente a taxa de concepção de novilhas zebuínas. Logo, é possível inferir que ambos os dispositivos Cronipres® Mono Dose (0,558 g e 1 g de P4) podem ser utilizados em protocolos de IATF de novilhas Nelore cíclicas, resultando em semelhantes taxas de cio e concepção.

Agradecimentos: Fazendas Beira Rio e Novo Brasil, CNPq 486089/2013-4.

**Palavras-chave:** Eficiência reprodutiva; novilha *Bos indicus*; inseminação artificial em tempo fixo

SBTE 020 IATF, TETF e IA

Número de submissão 1506

**Comparativo da taxa de prenhez entre inseminação artificial em tempo fixo e monta natural no estado de Sergipe**

Felipe Costa Almeida<sup>1</sup>; Fábio Franco Almeida<sup>1</sup>; Daniel Castro Burgos<sup>2</sup>; André Mariano Batista<sup>3</sup>; Sildivane Valcácia Silva<sup>4</sup>

1.FertVet, Aracaju, SE, Brasil; 2.Criar Veterinária, Aracaju, SE, Brasil; 3.UFRPE, Recife, PE, Brasil; 4.UFPB, João Pessoa, PB, Brasil.

Este estudo teve como objetivo comparar dois diferentes sistemas de manejo reprodutivo: inseminação artificial em tempo fixa (IATF) associada a repasse com monta natural (MN) e apenas monta natural, em relação aos ganhos em número de prenhez e redução de custos. O estudo foi conduzido na Fazenda Moreira, Município de Riachão do Dantas, Sergipe, Brasil. Foram utilizadas 512 vacas Nelore (*Bos indicus*), entre 35 a 60 dias pós-parto, distribuídas ao acaso entre os grupos IATF+MN (n = 256) ou MN (n = 256), utilizando proporção touro/vaca de 1/25, durante três meses de estação de monta. O protocolo para IATF iniciou-se com a inserção de dispositivo intra-vaginal com 1g de progesterona (CronipressBiogenesis-Bagó) associado à aplicação i.m. de 2 mg de benzoato estradiol (Bioestrogen®, Biogenesis-Bagó), no D0. No D8, os dispositivos foram removidos e administrados 150µg de D-cloprostenol i.m. (Cronibem®, Biogenesis-Bagó); 0,75 mg de cipionato de estradiol i.m. (Croni-CIP®, Biogenesis-Bagó); e 300 UI de eCG i.m. (Ecegon®, Biogenesis-Bagó). No D10, 48h após a remoção dos dispositivos, todas as fêmeas foram inseminadas. Quinze dias pós-inseminação, foram introduzidos touros na proporção touro/vaca de 1/20 durante 15 dias e no restante do período para 1/32. No D45, realizou-se diagnóstico de gestação no grupo IATF+MN para análise da taxa de concepção dos animais inseminados. Ao final de três meses, os touros de todos os lotes foram removidos e o diagnóstico de gestação realizado após 35 dias. Para avaliação estatística foi utilizado o teste do qui-quadrado. O resultado de prenhez da IATF no grupo IATF+MN, no D45 foi de 65% (166/256). Ao final da estação de monta, o grupo IATF+MN apresentou taxa de prenhez de 91% (232/256), sendo significativamente maior ( $P<0,001$ ) quando comparado ao grupo MN, que apresentou taxa de prenhez de 72% (184/256). Em Sergipe, um protocolo de IATF custa em torno de R\$70,00/vaca inseminada (incluindo sêmen, hormônios e serviço veterinário) e o preço médio do produto apartado em torno de R\$ 1.400,00. Considerando que no grupo IATF+MN foram obtidas 48 prenhez a mais que no grupo MN, e diminuído o valor gasto do rendimento estimado em relação ao número de bezerros em cada lote, obteve-se 20% a mais de rendimento financeiro no grupo IATF+MN. Conclui-se que, o uso da IATF associada ao repasse com monta natural, além de ganhos diretos, a exemplo de um maior número de prenhez, aumenta a receita das propriedades e ainda, apresenta ganhos indiretos, como aproximar as vacas para o início da estação de monta e utilizar reprodutores com alto valor genético.

**Palavras-chave:** Reprodução; IATF; bovinos

SBTE 021 IATF, TETF e IA

Número de submissão 1511

**A qualidade do sêmen utilizado na IATF é capaz de alterar a concentração sérica de proteína de fase aguda?**

Eneiva Carla Carvalho Celeghini<sup>1</sup>; Bruna Marcele Oliveira<sup>1</sup>; Rubens Paes De Arruda<sup>1</sup>; Milton Maturana Filho<sup>1</sup>; Daniela Becker Birgel<sup>2</sup>; Fabio Celidonio Pogliani<sup>3</sup>; Eduardo Harry Birgel Junior<sup>2</sup>

1.Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal - Departamento de Reprodução Animal - FMVZ-USP, Pirassununga, SP, Brasil; 2.Departamento de Medicina Veterinária - FZEA-USP, Pirassununga, SP, Brasil; 3.Departamento de Clínica Médica - FMVZ-USP, São Paulo, SP, Brasil.

Durante um processo inflamatório, além da reação local, ocorre também uma reação sistêmica, chamada de resposta de fase aguda. Esta resposta é caracterizada pela alteração das concentrações de proteínas de fase aguda que se desenvolve rapidamente após qualquer injúria tecidual. Sabe-se que após a deposição do sêmen no trato reprodutivo da fêmea ocorre uma reação inflamatória e que esta pode ser intensificada devido à presença de maior quantidade de células mortas. Sendo assim, o objetivo deste experimento foi estudar os efeitos da qualidade do sêmen utilizado na inseminação artificial em tempo fixo (IATF) sobre a concentração sérica da albumina, que é uma proteína de fase aguda negativa, ou seja, tem sua concentração reduzida durante processos inflamatórios. Para isso, 362 vacas Nelore foram divididas em três grupos de acordo com a qualidade do sêmen, baseado no percentual de células com membrana plasmática intacta, acrossomo íntegro e alto potencial mitocondrial (PIAIAP): 44,5% (Boa, n=121), 23% (Média, n=121) e 8,5 (Regular, n=120). O sêmen foi avaliado pela técnica de associação de sondas fluorescentes descrita por Celeghini et al. (Anim Reprod Sci, 104:119-131, 2008). Quatro horas após a IATF, amostras sanguíneas foram coletadas da veia jugular externa de todos os animais e a albumina sérica foi dosada utilizando analisador bioquímico automático (RX Daytona), com auxílio de kit específico da Randox® (Londres, Reino Unido) (AB3800). Os dados foram analisados pelo PROC MIXED (SAS, versão 9.2, 2010), para comparação das médias foi utilizado o teste de Tukey e foram consideradas diferenças estatísticas quando  $P<0,05$ . Os grupos apresentaram valores de albumina semelhantes entre si (Boa=3,16±0,02 g/dL; Média=3,19±0,02 g/dL; Regular=3,11±0,02 g/dL). Tendo em vista que os grupos foram divididos de acordo com a quantidade de células viáveis no sêmen e que o sêmen regular apresentava maior quantidade de células lesadas, esperava-se que este grupo tivesse maior reação inflamatória local e assim, menores valores desta proteína já que a albumina é uma proteína de fase aguda negativa e em situações de injúria tecidual tem sua concentração diminuída. No entanto, esse fato não foi observado. Sendo assim, os resultados desta pesquisa sugerem que a reação inflamatória que acontece após a deposição do sêmen com maior número de células lesadas não é capaz de causar uma reação sistêmica de modo a afetar a produção de albumina quatro horas após a IATF.

Suporte financeiro pela FAPESP (processos 2011/22833-9 e 2014/12757-1).

**Palavras-chave:** Espermatozoides; albumina; fertilidade

SBTE 022 IATF, TETF e IA

Número de submissão 1524

# **Refluxo de espermatozoides em bainhas utilizadas para inseminação artificial em bovinos**

Gilson Antonio Pessoa<sup>1</sup>; Ana Paula Martini<sup>1</sup>; Aline Policarpo Baioco<sup>1</sup>; Trajano Gomes Jacques<sup>1</sup>; Jean Mussoi Weigert<sup>2</sup>; Thainá Minela<sup>1</sup>; Carlos Eduardo Porciuncula Leonardi<sup>3</sup>; Manoel Francisco Sá Filho<sup>4</sup>; Mara Iolanda Batistella Rubin<sup>1</sup>

1.Laboratório de Embriologia Animal (Embryolab), DCGA, CCR, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil; 2.Médico Veterinário-Autônomo, Santa Maria, RS, Brasil; 3.University of Saskatchewan, Saskatoon, Canadá; 4.Alt Genetics, Uberaba, MG, Brasil.

O objetivo desta pesquisa foi verificar a presença de refluxo de espermatozoides em 4 marcas de bainhas no momento da IA: A (n=580), B (n=1178), C (n=775) e D (n=1173), sendo que somente a marca “D” apresenta sistema antirrefluxo. A pesquisa foi conduzida em 3706 bainhas utilizadas na IATF em vacas de corte na estação reprodutiva 2015-16 no sul do Brasil. As 4 marcas de bainhas foram distribuídas de forma homogênea (lote/fazenda) e as palhetas de 0,25 ou 0,5 mL da seguinte forma: A0,25 (n=378), A0,5 (n=202), B0,25 (n=966), B0,5 (n=212), C0,25 (n=494), C0,5 (n=281), D0,25 (n=685) e D0,5 (n=488). A montagem do conjunto palheta-bainha foi efetuada sempre pelo mesmo operador e a IA por dois veterinários experientes. Para a contagem de espermatozoides refluídos no interior da bainha foram escolhidos aleatoriamente 1128 conjuntos que não desacoplaram após a retirada do aplicador e que apresentavam curso do embolo da palheta até o final. A verificação do refluxo e contagem de espermatozoides nos 1128 conjuntos foi assim distribuído: A0,25 (n=179) e A0,5 (n=67); B0,25 (n=141) e B0,5 (n=83); C0,25 (n=122) e C0,5 (n=78); D0,25 (n=366) e D0,5 (n=92). Imediatamente após a IA, a porção da bainha (3cm) e palheta foram cortadas e colocadas em tubo de ensaio de 10mL contendo 4mL de formol-citrato. O conteúdo do tubo foi submetido a contagem em câmara de Neubauer em microscopia (400x). Os dados foram submetidos a análise estatística (Proc Glimmix) no programa SAS 9.3. O desacoplamento foi verificado em 9,7% (358/3706) das bainhas [A=23,8% (138/580), B=10,9% (129/1178), C=5,3% (41/775), D=4,3% (50/1173); P<0,0001]. O desacoplamento foi maior (P = 0,0255) nas palhetas de 0,25 mL (12,3%, 274/2229) em comparação com as palhetas de 0,5 mL (7,6%, 84/1099). O refluxo ocorreu em 39,4% (97/246), 21,0% (47/224), 13,5% (27/200) e 12,7% (58/458) das bainhas das marcas A, B, C e D, respectivamente e foi significativamente maior para as marcas A e B (P = 0,0001). O refluxo em bainhas/palhetas de 0,25 foi maior nas marcas A (41,9%; 75/179) e B (24,1%; 34/141), quando comparado com C (16,4; 20/122%) e D (15,0%;35/366), (P < 0,0001). Ao avaliar as palhetas de 0,5 a marca A (32,8%; 22/67) apresentou maior refluxo (P = 0,0001) e as marcas B, C e D os valores foram 15,7 (13/83); 9,0 (7/78) e 3,3% (3/92), respectivamente. O número médio  $\pm$  SE de espermatozoides ( $\times 10^3$ ) encontrados nas bainhas que apresentaram refluxo foi: A0,25 ( $66,4 \pm 10,7$ ), A0,5 ( $19,3 \pm 5,2$ ), B0,25 ( $10,63 \pm 2,8$ ), B0,5 ( $6,0 \pm 2,6$ ), C0,25 ( $4,7 \pm 1,5$ ), C0,5 ( $2,7 \pm 1,4$ ), D0,25 ( $1,5 \pm 0,3$ ) e D0,5 ( $0,17 \pm 0,1$ ). A diferença foi encontrada para maior número de espermatozoides (P = 0.0004) nas palhetas de 0,25 comparadas às de 0,5 mL e também para as marcas A e B (P < 0,0001) comparadas as marcas C e D. Os resultados demonstraram que durante a IA ocorre desacoplamento, ou refluxo parcial de espermatozoides. Recomenda-se que a qualidade da bainha seja incluída como um item no planejamento da estação reprodutiva.

Agradecimentos: CAPES, CNPQ, UFSM. Fazendas: Tapera, Baviera, Posto Branco, Nova Querência.

**Palavras-chave:** IATF; bovino de corte; bainhas

SBTE 023 IATF, TETF e IA

Número de submissão 1542

# **Características da dinâmica folicular de novilhas girolandas submetidas a diferentes protocolos de IATF**

Sílvio Costa e Silva<sup>1</sup>; Álan Maia Borges<sup>1</sup>; Emílio César Martins Pereira<sup>2</sup>; Ricarda Maria Santos<sup>2</sup>; Fernanda Augusta de Oliveira Silva<sup>2</sup>; Jordana Lemos Andrade De Andrade<sup>2</sup>; Giselle Maria Souza<sup>2</sup>; Deize de Cássia Antonino<sup>2</sup>; Alex De Matos Teixeira<sup>2</sup>

1.UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil; 2.UFU, Uberlândia, MG, Brasil.

A inseminação artificial em tempo fixo (IATF) é uma biotecnica da reprodução amplamente utilizada nos rebanhos de carne e leite em território nacional. A utilização desta ferramenta representa vantagens substanciais no manejo reprodutivo de gado de leite, permitindo a melhoria dos índices reprodutivos de vacas de alta produção de leite, já que estas apresentam redução da fertilidade. Entretanto, os resultados das taxas de concepção dos protocolos são variáveis em razão de diversos fatores, como diferenças entre hormônios indutores de ovulação, concentrações e doses hormonais, além do diâmetro dos folículos dominantes no momento da inseminação artificial (IA). Diante disso, o presente estudo objetivou avaliar o diâmetro do maior folículo presente em novilhas recebendo dois protocolos de IATF, com diferentes métodos de sincronização da onda folicular. Foram utilizadas novilhas Girolando (3/4 a 7/8 holandês), submetidas a dois protocolos de IATF: Protocolo 1 (P1) (n = 30): administração de 10,5 $\mu$ g de GnRH via intramuscular (IM) no dia da colocação do implante intravaginal de progesterona (P4) (D0); administração IM de 150 $\mu$ g de Prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ), juntamente a retirada do implante de P4 no quinto dia (D5), aplicação IM de PGF2 $\alpha$  no sexto dia (D6), IA e aplicação IM de 10,5 $\mu$ g de GnRH no oitavo dia do protocolo (D8). Protocolo 2 (P2) (n = 30): administração IM de 2,0mg de Benzoato de Estradiol (BE) no dia da colocação do implante de P4 (D0), administração IM de 150 $\mu$ g de PGF2 $\alpha$  no dia sete (D7), retirada do

implante de P4 e aplicação IM de 1mg de Cipionato de Estradiol (ECP) no nono dia (D9), IA no décimo primeiro dia do protocolo (D11). Os implantes vaginais utilizados foram o Primer (Tecnopec, São Paulo, Brasil) e hormônios GnRH (Gonaxal), BE (Bioestrogen), CE (Croni-cip), PGF2 $\alpha$  (Croniben) da Biogenesis Bagó SA (Garín, Buenos Aires, Argentina). Realizou-se ultrassonografias transretais no dia do início dos protocolos (D0), dois dias após início (D2), e no dia da IA (D8 no P1 e D11 no P2). Objetivando confirmar a ovulação foi realizado também ultrassonografia sete dias após IA de cada protocolo. Diâmetros foliculares nos diferentes dias do protocolo foram submetidos a ANOVA, e as médias comparadas pelo teste Mann-Whitney e a taxa de ovulação pelo teste Qui-quadrado, considerando  $P < 0,05$ . Os resultados estão apresentados como média $\pm$ EPM. O diâmetro do maior folículo não diferiu entre P1 e P2 no D0 ( $13,1 \pm 0,4$  vs.  $12,8 \pm 0,6$ mm, respectivamente,  $P > 0,05$ ), porém foram observadas diferenças no D2 e no dia da IA ( $8,1 \pm 0,5$  vs.  $12,0 \pm 0,6$ mm e  $12,6 \pm 0,6$  vs.  $10,6 \pm 0,7$ mm, respectivamente,  $P < 0,05$ ). As taxas de ovulação foram de 83,3% e 60,0% para P1 e P2, respectivamente. Verificou-se diferenças nos diâmetros foliculares associadas às diferentes formas de sincronização da onda de cada protocolo.

**Palavras-chave:** Novilha girolanda; GnRH; IATF

SBTE 024 IATF, TETF e IA

Número de submissão 1543

**Avaliação da taxa de prenhez de vacas *Bos indicus* submetidas à sincronização da ovulação com progesterona injetável**

Marcelo Marcondes Seneda; Jefferson Tadeu Campos; Fabio Morotti; Camila Bortoliero Costa; Larissa Zamparone Bergamo; Nathalia Covre da Silva

UEL, Londrina, PR, Brasil.

Neste estudo avaliou-se a taxa de prenhez de vacas Nelore (*Bos indicus*) submetidas a diferentes protocolos de IATF a base de progesterona (P4) injetável ou dispositivo intravaginal impregnado com P4. Vacas multíparas entre 72 e 84 meses de idade, com 30 a 45 dias pós-parto foram previamente selecionadas com base na ausência de corpo lúteo (CL) e folículos  $< 8$  mm após palpação e exame ultrassonográfico transretal. Em um dia aleatório do ciclo estral (D0), os animais selecionados ( $N = 135$ ) foram aleatoriamente distribuídos em um dos três grupos experimentais ( $N = 45$  / grupo). O grupo I (P4 injetável/IATF 36 horas) recebeu 250 mg de P4 injetável e 2 mg BE no D0. No D7 aplicou-se 500  $\mu$ g de Cloprostenol. No D8 300 UI de eCG e 1 mg de BE foram administrados, sendo que a IATF foi realizada 36 horas após a aplicação do BE. O grupo II (P4 injetável/IATF 48 horas) recebeu o mesmo protocolo, exceto pela IATF que foi realizada 48 horas após indução da ovulação. Os animais do grupo III (Controle/CIDR) receberam um protocolo convencional de IATF com dispositivo intravaginal (D0 - P4 e 2 mg BE, D8 - remoção do dispositivo, 500  $\mu$ g Cloprostenol, 300 UI eCG, 1 mg BE e IATF realizada 48 horas após a remoção dos dispositivos). As vacas sincronizadas com protocolo convencional de IATF (Controle/CIDR) apresentaram maior taxa de prenhez (60 %; 27/45) do que aquelas submetidas à sincronização da ovulação com P4 injetável/IATF 36 horas (33.3 %; 15/45;  $p = 0,01$ ). Porém, o grupo P4 injetável/IATF 48 horas demonstrou uma taxa de prenhez semelhante (48.9 %; 22/45;  $p = 0,290$ ) ao grupo com protocolo convencional e ao grupo de P4 Injetável/IATF 36 horas ( $p = 0,134$ ). A utilização de P4 injetável em vacas inseminadas 48 horas após a indução da ovulação propiciou taxas de prenhez semelhantes às vacas que receberam dispositivo intravaginal.

**Palavras-chave:** IATF; nelore; progesterona injetável

SBTE 025 IATF, TETF e IA

Número de submissão 1549

**Sincronização da ovulação com o protocolo 5-day PRID® para o primeiro serviço diminuiu a idade ao primeiro parto e os custos de criação de novilhas holandesas**

Carlos Eduardo Cardoso Consentini<sup>1</sup>; Paulo David Carvalho<sup>2</sup>; Vanda Santos<sup>3</sup>; Rafael Vilella Barletta<sup>2</sup>; Carolina Maia<sup>2</sup>; Bruno Carneiro<sup>2</sup>; Alessio Valenza<sup>4</sup>; Alexandre Henryli Souza<sup>4</sup>; Paul Milton Fricke<sup>2</sup>

1.Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo - FMVZ-USP, Jacutinga, MG, Brasil;

2.University of Wisconsin - Madison, Madison, Estados Unidos; 3.Diessen Servicos Veterinarios Lda, Évora, Portugal;

4.Ceva Sante Animale, Libourne, França.

O objetivo do presente estudo foi comparar a performance reprodutiva e os custos com a criação de novilhas holandesas após a sincronização da ovulação e inseminação artificial em tempo fixo (IATF) para o primeiro serviço e monta natural (MN) para os serviços subsequentes ou utilização de monta natural para todos os serviços. Um total de 366 novilhas holandesas nulíparas foram homogeneamente distribuídas, de acordo com escore de condição corporal e idade ao início do experimento, em dois grupos (IATF e MN), utilizando-se assim, dois manejos reprodutivos diferentes. No grupo IATF, as novilhas foram submetidas ao protocolo 5-day PRID® (Dia 0, GnRH+PRID®; Dia 5, PGF+Retirada do PRID®; Dia 6, PGF; Dia 8, IATF) e foram inseminadas em tempo fixo no primeiro serviço e submetidas a monta natural, na relação de 1 touro para 30 novilhas, nos serviços subsequentes. Já no grupo MN, as novilhas foram expostas à monta natural, na relação de 1 touro para 30 novilhas, em todos os serviços. As novilhas tinham  $420 \pm 7$  dias de idade quando receberam a inseminação do primeiro serviço no grupo IATF ou quando foram colocadas com os touros no caso do grupo MN. Um

orçamento foi desenvolvido para calcular as diferenças econômicas entre os programas reprodutivos. A estrutura da análise econômica incluiu despesas com hormônios para a sincronização da ovulação, mão de obra associada a aplicação dos hormônios e inseminação artificial, sêmen e equipamentos usados na inseminação artificial, custos de diagnóstico de prenhez, custos de touro, e custos de alimentação; assim como, ganho genético associado com o uso de sêmen de touros de maior potencial genético. Os dados foram analisados pelo ANOVA e por regressão logística usando MIXED e GLIMMIX do SAS. Idade ao primeiro parto foi menor no grupo IATF comparado com o grupo MN [23.7 vs. 24.9 meses,  $P<0,01$ ]. Além disso, um maior número de novilhas do grupo IATF pariram com menos de 24 meses em relação às novilhas do grupo MN [77% (141/183) vs. 44% (81/183);  $P<0,01$ ]. Considerando as variáveis econômicas analisadas, os custos de criação foram 67.5€ menor por novilha no grupo IATF quando comparado ao grupo MN [1430.9€ vs. 1498.4€;  $P<0,01$ ]. Conclui-se que, realizar IATF no primeiro serviço de novilhas holandesas diminuiu a idade ao primeiro parto e reduziu os custos de criação destas novilhas. Patrocinado por CEVA Sante Animale.

**Palavras-chave:** IATF; fertilidade; novilhas

SBTE 026 IATF, TETF e IA

Número de submissão 1555

#### **Efeito de diferentes tipos de gonadotrofinas na taxa de prenhez de vacas nelore paridas submetidas à IATF**

Izaías Claro Junior<sup>1</sup>; Lucas Sartor Valino<sup>2</sup>; Fabrício Martini Mantelo<sup>2</sup>; Lucas Cutaia<sup>3</sup>; Santiago Pérez Wallace<sup>4</sup>; Jose Luiz Moraes Vasconcelos<sup>2</sup>

1.Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, SP, Brasil; 2.UNESP, Botucatu, SP, Brasil; 3.SYNTEX, Buenos Aires, Argentina; 4.ZOETIS, Buenos Aires, Argentina.

O objetivo do estudo foi avaliar a taxa de prenhez de vacas sincronizadas com protocolo de IATF a base de estrógeno e progesterona (E2/P4), usando diferentes gonadotrofinas. O experimento foi conduzido na Agropecuária União com 1142 vacas Nelore primíparas e múltiparas, com média de escore de condição corporal (ECC) de  $3,0\pm0,5$ . As vacas foram sincronizadas com o seguinte protocolo de IATF: D0 – 2,0mg de BE im (2,0ml Gonadiol®, Syntex, Buenos Aires, Argentina) e dispositivo intravaginal de P4 (CIDR®, Zoetis, SP, Brasil); D8 – 12,5mg de dinoprost im (2,5ml Lutalyse®, Zoetis, SP, Brasil), mais 0,5mg de ECP (0,25ml ECP®, Zoetis, SP, Brasil) e retirada do dispositivo intravaginal. Neste momento (D8), as vacas foram distribuídas aleatoriamente para receberem um dos quatro tratamentos: T1 – 1,5ml de eCG (300UI Novormon®, Zoetis, SP, Brasil); T2 – 1,5ml de eCG (300UI Produto A, Cerro Largo, Uruguai); T3 – 10mg de FSH (0,5ml Produto B, Ontário, Canadá) e T4 – Controle, sem tratamento adicional. No D10 (48 horas após a retirada do dispositivo) as vacas foram inseminadas por técnicos e foi utilizado sêmen com fertilidade conhecida. No D8 as vacas tiveram a base da cauda pintada com bastão para observação de cio, porém 180 animais foram retirados dessa variável devido às chuvas. As proporções foram calculadas por regressão logística e as variáveis foram analisadas usando PROC GEN-MOD, SAS. No geral, a taxa de prenhez foi maior para T1 ( $P<0,05$ ; 42,5% [127/299]) do que T3 (30,3% [88/290]) e T4 (33,2% [82/247]), e semelhante ao T2 (36,6% [112/306]). Vacas que expressaram estro tiveram maiores ( $P<0,01$ ) taxa de prenhez (48,1% [177/368]) do que as que não expressaram (28,9% [172/594]). Não houve interação entre estro e tratamentos na taxa de prenhez, mas vacas do T1 ( $P=0,08$ ; 43,4% [106/244]) expressaram mais estro do que o T3 (36,5% [88/241]) e T4 (35,0% [79/226]), e foi semelhante ao T2 (37,8% [95/251]). Houve interação entre ECC (Alto  $\geq 3,00$  e Baixo  $\leq 2,75$ ) e tratamentos na taxa de prenhez ( $P<0,05$ ). A taxa de prenhez não foi diferente para vacas com Alto ( $P>0,1$ ; T1=53,5%, T2=50,7%, T3=45,8% e T4=49,2%). No entanto, para Baixo o T1 ( $P<0,05$ ) teve maior taxa de prenhez (34,3% [59/172]) comparado com T2, T3 e T4 (22,7% [35/154], 15,1% [22/146] e 16,1% [19/118], respectivamente). Houve interação entre ordem e tratamentos ( $P=0,07$ ), onde a taxa de prenhez para múltiparas não foi diferente entre tratamentos ( $P>0,1$ ; T1=57,3% [78/136], T2=56,2% [77/137], T3=46,6% [63/135], T4=51,5% [63/128]). Entretanto, primíparas do tratamento T1 tiveram mais vacas prenhes (30,1% [67/130]) do que T2, T3 e T4 (20,7% [35/169], 16,1% [25/155], e 12,8% [15/117], respectivamente). O tratamento com Novormon® proporcionou maior taxa de prenhez em primíparas e em vacas com baixo ECC quando comparado com outras gonadotrofinas.

**Palavras-chave:** IATF; eCG; nelore

SBTE 027 IATF, TETF e IA

Número de submissão 1556

#### **Taxa de prenhez à IATF de novilhas nelore e cruzadas submetidas ao protocolo J-Synch (6 DIAS)**

Jessica Cristina Lemos Motta<sup>1</sup>; Marcos Henrique Alcantara Colli<sup>1</sup>; Luciano Penteado<sup>1</sup>; Bernardo Marcozzi Bayeux<sup>1</sup>; Rodolfo Daniel Mingoti<sup>2</sup>; Gabriel Amilcar Bó<sup>1</sup>; Lisbek Cruz Lugo<sup>1</sup>; Romulo Germano Rezende<sup>3</sup>; Pietro Sampaio Baruselli<sup>1</sup>

1.Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ – USP), São Paulo, SP, Brasil; 2.Empresa Firmasa, Londrina, PR, Brasil; 3.Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC), Córdoba, Argentina.

O objetivo do presente estudo foi determinar a taxa de prenhez ao protocolo J-Synch quando comparado ao protocolo convencional para IATF. Foram utilizadas 785 novilhas cíclicas (presença de corpo lúteo no início do protocolo) das raças Nelore (n=211) e Cruzadas (½ Nelore vs. Angus; n=574). Os animais foram mantidos a pasto com suplementação mineral ad libitum e distribuídos homogeneamente em dois grupos, Controle (n=394) e J-Synch (n=391) de acordo com o escore



de condição corporal médio (Controle =  $3,45 \pm 0,19$ ; J-Synch =  $3,40 \pm 0,25$ ). No D0 todas as fêmeas receberam um dispositivo intravaginal de liberação lenta de progesterona (1,2g de P4; Ferticare 1200®, Valée, previamente utilizado por 16 dias) e 2 mg de benzoato de estradiol i.m. (Ferticare Sincronização®, Vallée). As novilhas pertencentes ao grupo J-Synch tiveram o dispositivo removido no D6, seguido da administração de 200 UI de eCG (Folligon®, MSD Saúde Animal) e 0,265 mg de cloprostenol sódico i.m. (Ciosin®, MSD Saúde Animal). Após 72 horas foram administrados 100 µg de gonadorelina i.m. (Cystorelin®, Merial Saúde Animal) e realizada a IATF. No grupo Controle a remoção do implante e o tratamento com 0,5 mg de cipionato de estradiol i.m. (ECP®, Zoetis), 200 UI de eCG i.m. (Folligon®, MSD Saúde Animal) e 0,5mg de cloprostenol sódico i.m. (Ciosin®, MSD Saúde Animal) ocorreu no D8. A IATF foi realizada no D10 (48 horas após a retirada do dispositivo de P4). O diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias após a IATF. Os dados foram analisados utilizando o procedimento GLIMMIX do SAS® 9.3. Não houve interação entre protocolo e raça para taxa de prenhez [J-Synch\*Nelore = 47,1% (48/102); J-Synch\*Cruzada = 55,0% (159/289); Controle\*Nelore = 48,6% (53/109); Controle\*Cruzada = 55,4% (158/285);  $P = 0,89$ ]. Não houve diferença na taxa de prenhez entre os tratamentos, sendo de 53,6% (211/394) para o grupo Controle e 52,9% (207/391) para o grupo J-Synch ( $P = 0,80$ ). Não foi observado diferença na taxa de prenhez entre as raças Nelore 47,9% (101/211) e Cruzadas 55,2% (317/574;  $P = 0,07$ ). Concluiu-se que o protocolo J-Synch apresenta taxa de prenhez similar ao protocolo convencional para IATF de novilhas Nelore e cruzadas. Esses resultados são indicativos de que existe a possibilidade de utilizar esses diferentes protocolos com a mesma eficiência. O protocolo J-Synch representa nova alternativa de agenda reprodutiva para IATF de novilhas Nelore e cruzadas.

Agradecimentos: Merial Saúde Animal

**Palavras-chave:** 6 dias vs. 8 dias; novilha de corte; sincronização

SBTE 028 IATF, TETF e IA

Número de submissão 1559

**Influência do diâmetro do folículo dominante 48 horas após a retirada do dispositivo de progesterona na dinâmica folicular de vacas Bos indicus submetidas a protocolo de sincronização da ovulação**

Luiz Manoel Souza Simões<sup>1</sup>; Miguel Pizzolante Bottino<sup>1</sup>; Gabriel A Crepaldi<sup>2</sup>; Renato Wihby Giroto<sup>3</sup>; Pietro Sampaio Baruselli<sup>4</sup>; José Nélío De Sousa Sales<sup>1</sup>

1.Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil; 2.ST Repro, Indaiatuba, SP, Brasil; 3.RG Genética Avançada, Água Boa, MT, Brasil; 4.Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

O objetivo desse estudo foi avaliar a influência do diâmetro do folículo dominante (FD) 48 horas após a retirada do dispositivo de progesterona (P4) na dinâmica folicular de vacas Bos indicus submetidas a protocolo de sincronização da ovulação a base de progesterona (P4) e estradiol (E2). No estudo foram utilizadas 357 vacas Nelore lactantes com escore de condição corporal (ECC) de  $2,73 \pm 0,1$  (escala de 1 a 5) e entre 30 e 60 dias pós-parto. Em dia aleatório do ciclo estral (D0), os animais receberam 2 mg de benzoato de estradiol (BE; Sincrodiol®, Ouro Fino, Brasil) e um dispositivo intravaginal de P4 (Sincrogest®, Ouro Fino, Brasil). No dia 8 (D8), o dispositivo de P4 foi removido e as vacas receberam 500mg de cloprostenol (Sincrocio®, Ouro Fino, Brasil) e 300 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG; Folligon®, MSD, Brasil). A indução da ovulação foi realizada com 1 mg de cipionato de estradiol (CE; ECP®, Zoetis, Brasil) no D8 ou 1 mg de BE no D9. Exames ultrassonográficos foram realizados a cada 12 horas a partir do D10 até a ovulação ou 96 horas da retirada do dispositivo de P4. Foram avaliados o diâmetro máximo do folículo dominante (DMFD), diâmetro do folículo ovulatório (DFO), momento da ovulação (MOV) e taxa de ovulação (TOV). Após a avaliação ultrassonográfica, as vacas foram classificadas em 4 grupos de acordo com o diâmetro do FD 48 horas após a retirada do dispositivo de P4, perfazendo os grupos FD9 (FD $\leq 9,0$ mm), FD9-11 (9,013,0mm). A análise estatística foi realizada pelo procedimento GLIMMIX do SAS. Nos resultados, verificou-se diferença entre os grupos para o diâmetro máximo do folículo dominante [FD9 (9,4 $\pm 0,3$ d), FD9-11 (11,6 $\pm 0,2$ c), FD11-13 (13,5 $\pm 0,1$ b), FD13 (15,5 $\pm 0,1$ a),  $P < 0,01$ ], diâmetro do folículo ovulatório [FD9 (11,3 $\pm 0,3$ c), FD9-11 (11,7 $\pm 0,2$ c), FD11-13 (13,5 $\pm 0,1$ b), FD13 (15,0 $\pm 0,2$ a),  $P < 0,01$ ], momento da ovulação [FD9 (78,0 $\pm 4,5$ a), FD9-11 (69,7 $\pm 1,2$ a), FD11-13 (71,4 $\pm 0,9$ a), FD13 (66,0 $\pm 0,7$ b),  $P < 0,01$ ] e taxa de ovulação [FD9: 13,2% (7/53)c, FD9-11: 66,2% (49/74)b, FD11-13: 89,0% (89/100)a, FD13: 93,9% (122/130)a,  $P < 0,01$ ]. Conclui-se que o diâmetro do folículo dominante 48 horas após a retirada do dispositivo de P4 influencia a dinâmica folicular de vacas Nelore lactantes submetidas a protocolo de sincronização da ovulação.

**Palavras-chave:** Bovinos; IATF; reprodução

SBTE 029 IATF, TETF e IA

Número de submissão 1561

**Fertilidade de ovelhas texel sincronizadas com progesterona, melengestrol ou acetato de medroxi-progesterona**

Eliaana Burtet Parmeggiani<sup>1</sup>; Matheus Meneghello Carvalho Bernardes<sup>2</sup>; Guilherme Meneghello Carvalho Bernardes<sup>2</sup>; Amanda Souto Tatsh<sup>2</sup>; Ana Paula Martini<sup>1</sup>; Mara Iolanda Batistella Rubin<sup>1</sup>; Gilson Antonio Pessoa<sup>1</sup>

1.Laboratório de Embriologia Animal (Embryolab), DCGA, CCR, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil; 2.Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

Neste estudo avaliou-se o efeito de diferentes fontes de progesterona na pré-estação reprodutiva sobre a fertilidade de ovelhas acíclicas. O experimento foi conduzido no RS/Brasil. Ovelhas da raça Texel (n=89) com escore de condição corporal médio de 2,50 (Escala 1 a 5: 1-magra e 5-obesa) foram randomizadas em 4 grupos antes do início da estação reprodutiva (Janeiro 2016). As ovelhas do Grupo Controle (GC, n=12) não receberam qualquer tratamento durante o período de sincronização. Todas as ovelhas tiveram útero e ovários avaliados por ultrassonografia transretal com transdutor linear (5-10Mhz, Mindray DP2200, Shenzhen, China) antes da sincronização. No dia 0 (D0), as ovelhas do Grupo Melengestrol 12 dias (GMGA, n=25) receberam na ração 1,4g/dia/ovelha de acetato de melengestrol (MGA PREMIX, Zoetis, Brasil) até o D12, quando também foram administrados 300UI de eCG (Novormon, Zoetis, Brasil) e 1mL de prostaglandina (Lutalyze, Zoetis, Brasil), via IM. As ovelhas do Grupo P4 injetável (GP4, n=25) receberam 200mg de progesterona IM no D0 e no D6 (Sincrogest, Ourofino, Brasil), seguido por 300UI de eCG (Sincro eCG, Ourofino, Brasil) e 0,5mg de cloprostenol sódico (Sincrocio, Ourofino, Brasil) IM no D12. O Grupo de fêmeas que recebeu Pessário Intravaginal (GPI, n=25) no D0 foi tratado via intravaginal com uma esponja contendo acetato de medroxiprogesterona (Progespon, Zoetis, Brasil). No D12, o pêsário intravaginal foi removido e as ovelhas receberam 300UI IM de eCG (Novormon, Zoetis, Brasil) e 10mg IM de Dinoprost Tromethamine (Lutalyze, Zoetis, Brasil). As fêmeas de todos os grupos tiveram o estro observado no período do D12 ao D42 e o acasalamento foi conduzido por monta controlada (1 carneiro:20 fêmeas). Todos os carneiros passaram por exame andrológico antes de serem alocados com as fêmeas. Após o D42, os machos foram separados das fêmeas e no D80 efetuou-se o diagnóstico de gestação por ultrassonografia. Os dados foram analisados pelo Proc Means, Proc Freq e Proc GLIMMIX do programa estatístico SAS 9.3. A expressão de estro foi inferior ( $P=0,05$ ) nas fêmeas do grupo controle 64,3% (9/14), quando comparado ao GP4: 72% (18/25), GMGA: 84% (21/25) e GPI: 80% (20/25). O tempo médio (h) para expressão do estro após a aplicação do agente luteolítico não diferiu ( $P=0,09$ ) entre os tratamentos GC ( $101,4\pm 7,7$ ), GP4 ( $86\pm 6,1$ ), GMGA ( $69\pm 5,2$ ) e GPI ( $57,7\pm 4,8$ ). A prenhez no primeiro ciclo foi inferior ( $P<0,0004$ ) no GC (35,7%, 5/14) e GP4 (24%, 6/25), comparados aos grupos GMGA (80%, 20/25) e GPI (76%, 19/25). A prenhez aos 80 dias (D80) no grupo GMGA foi maior ( $P<0,0089$ ) (91,3%, 23/25) do que no GC (42,9%, 6/14), no entanto os grupos GMGA, GP4 (56,0%, 14/25) e GPI (83,3%, 21/25) não diferiram ( $P>0,05$ ). Os tratamentos com Melengestrol ou Acetato de Medroxiprogesterona foram mais eficientes em proporcionar maior número de prenhez no primeiro ciclo.

Agradecimentos: Zoetis, Ouro Fino Saúde Animal e Fazenda do Rancho.

**Palavras-chave:** Ovelha; prenhez; progesterona

SBTE 030 IATF, TETF e IA

Número de submissão 1565

#### **Efeito da suplementação mineral e vitamínica injetável (kit adaptador<sup>®</sup> MIN e adaptador<sup>®</sup> VIT, Biogénesis Bagó) sobre as taxas de prenhez em vacas de corte**

Milton Maturana Filho<sup>1</sup>; Kleber Menegon Lemes<sup>2</sup>; Manuel Agustin Silva<sup>2</sup>; Thiago Santin<sup>2</sup>; Reuel Luiz Gonçalves<sup>3</sup>; Guillermo Alberto Mattioli<sup>4</sup>; Joao Paulo Mendes Lollato<sup>3</sup>; Juan Manuel Persico<sup>3</sup>; Ed Hoffmann Madureira<sup>2</sup>

1.MF Vetplan Consultoria Pecuária/Universidade de São Paulo, Águas da Prata, SP, Brasil; 2.Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, Brasil; 3.Biogénesis Bagó, Curitiba, PR, Brasil; 4.Universidade Nacional La Plata, La Plata, Argentina.

A suplementação estratégica de vitaminas e minerais durante o período pré IATF tem sido associada a melhoria do desempenho reprodutivo em vacas de corte, no entanto, a carência de selênio, Zinco e Cobre, ocorre em grande parte do Brasil. Estes microminerais são essenciais a atividades antioxidativas, que podem contribuir com melhoria da fertilidade em vacas de corte. A suplementação mineral injetável é opção economicamente viável para atender a demanda desses micronutrientes, principalmente em períodos de maior demanda. O Objetivo desse estudo foi verificar a eficiência da suplementação mineral e vitamínica injetável (Kit Adaptador<sup>®</sup> MIN e Adaptador<sup>®</sup> VIT, Biogénesis Bagó) durante a estação de monta na melhoria da fertilidade de vacas da raça nelore (n=1232). O experimento foi conduzido no setor de bovinos de corte do campus administrativos da USP de Pirassununga nos anos de 2014 e 2015. Os animais foram tratados 20 dias antes do início do protocolo de IATF e receberam uma segunda dose no dia da colocação do implante. O protocolo hormonal utilizado foi: D0= inserção do implante Cronipres<sup>®</sup> Mono Dose com 1 g de P4+ aplicação de 2 mg de BE (Bioestrogen<sup>®</sup>, Biogénesis Bagó, Brasil); D8,5= retirada do implante intravaginal de P4+ aplicação de 300 UI de eCG (Ecegon<sup>®</sup>, Biogénesis Bagó, Brasil), + 75 µg de D-Cloprostenol (PGF2α, Croniben<sup>®</sup>, Biogénesis Bagó, Brasil) + 1mg BE (Bioestrogen<sup>®</sup>, Biogénesis Bagó, Brasil). No D10 foi realizada a IATF no período da manhã. A taxa de ciclicidade e a taxa de prenhez (TP) foram avaliadas por ultra-sonografia (Mindray DP2200 Vet, com probe linear de 5,0 MHz). A avaliação de Prenhez foi realizada nos dias 30 e 60 dias após a IATF Os dados obtidos foram submetidos à análise de frequência pelo PROC FREQ e análise de regressão logística pelo PROC LOGISTIC, utilizando-se o programa Statistical Analyses System (SAS, 9.3) adotando-se nível de significância de 5%. Houve uma melhoria de 7% na ciclicidade no grupo das vacas tratadas (C=51,3% vs Trat=58,3%), 20 dias após a primeira aplicação do Kit Adaptador<sup>®</sup> ( $P<0,05$ ). Não houve diferença na taxa de ciclicidade entre os grupos na primeira avaliação de ciclicidade (C=52,5% vs Trat= 51,3%). No início do protocolo, a taxa de ciclicidade do grupo tratado, foi superior ( $P<0,05$ ) a do grupo controle (58,3% vs 48,5%, respectivamente). A taxa de prenhez aos 30 foi superior no grupo tratado (C=51,5% vs Trat=57,6%). A taxa de prenhez aos 60 dias ( $P<0,05$ ) também

foi superior no grupo tratado ( $C=49,5\%$  vs trat-  $55,7\%$ ). Adicionalmente, foi observado que as vacas do grupo tratado, tiveram um maior diâmetro folicular no momento da IATF ( $P<0,05$ ) com uma menor variação ( $C=13,1\pm0,4$  vs Trat=  $14,1\pm0,2$ ). Portanto, a suplementação estratégica com Kit Adaptador® MIN e Adaptador® VIT, Biogénesis Bagó é eficiente e economicamente viável na melhoria de resultados em programas de IATF de bovinos de Corte, principalmente por auxiliar na melhoria da ciclicidade dos animais.

**Palavras-chave:** Fertilidade; suplementação injetável; vacas nelore

SBTE 031 IATF, TETF e IA

Número de submissão 1574

#### **Desempenho reprodutivo em uma fazenda orgânica de produção de leite no sul dos Estados Unidos**

Roney Santos Ramos<sup>1</sup>; Kelsey Bryan<sup>2</sup>; Juan Velez<sup>3</sup>; Mario Binelli<sup>4</sup>; Pablo Pinedo<sup>5</sup>

*1.Ourofino Saúde Animal, Cravinhos, SP, Brasil; 2.Texas A&M Agrilife Research, Amarillo, Estados Unidos; 3.Aurora Organic Dairy, Hereford, Estados Unidos; 4.Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, Brasil; 5.Colorado State University, Fort Collins, Estados Unidos.*

Fazendas orgânicas enfrentam limitações no uso de antibióticos e hormônios, o que reduz as opções de tratamento de desordens reprodutivas e impossibilita o uso de programas de IATF. Além disso, há pouca informação sobre o desempenho reprodutivo de vacas sob sistemas orgânicos de produção. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos das desordens reprodutivas no desempenho reprodutivo de vacas em uma grande fazenda (8,319 vacas) de leite sobre sistema orgânico de produção no Texas (Estados Unidos). O manejo reprodutivo foi baseado na IA por observação de cio. Os animais foram classificados conforme o período parto-primeiro serviço (PPS1:  $\leq 100$ ; PPS2:  $\leq 150$  ou PPS3:  $>150$ DEL) e parto-concepção (PC1:  $\leq 100$ ; PC2:  $\leq 150$  ou PC3=vazia ou prenha após 150DEL). As variáveis independentes foram paridade, produção de leite ajustada aos 305 dias, número de serviços e ocorrência de desordens reprodutivas. Associações estatísticas foram testadas por regressão logística (PROC GLIMMIX, SAS 9.2) e LSMEANS foram estimadas para os períodos parto-primeiro serviço e parto-concepção com ajuste para múltiplas comparações (Turkey-Kramer teste, PROC GLM, SAS). A média de dias para o primeiro serviço e dias para a concepção foram 69 ( $N=6037$ ) e 118 DEL ( $N=3869$ ), respectivamente. A média de serviços por prenhez foi 2,38. A taxa de prenhez a cada 21 dias foi de 17%, com 90% das vacas (5433/6036) inseminadas até 100 DEL e 97,6% até 150 DEL. A taxa de probabilidade (odds ratio, OR) de ter pelo menos um serviço até 100 DEL foi significativamente maior para vacas que não foram afetadas por endometrites (OR= 3.43,  $P<0.0001$ ) ou piometra (OR= 8.10,  $P<0.0001$ ). Houve também um efeito nos dias para o primeiro serviço conforme a produção de leite ( $P<0.0001$ ), paridade ( $P<0.0001$ ) e época da parição. A OR para ter pelo menos um serviço até os 100 DEL para vacas parindo no outono, primavera ou verão foram 6,87, 2,03 e 3.06 vezes a OR de vacas parindo no inverno. Entretanto, não houve diferença em vacas que apresentaram metrite ou retenção de membranas fetais (RMF). LSMEANS para produção de leite (305ME) por período de serviço foram: PS1: 8,030a, PS2: 8,281bc e PS3: 8,343c (Kg). A concepção até 100 DEL foi associada com a ausência de endometrite (OR= 5.07,  $P<0.0001$ ), metrite (OR: 2.287,  $P<0.0001$ ), piometra (OR: 49.51,  $P<0.001$ ) e RMF (OR=1.89,  $P<0.001$ ). Houve também uma significativa associação com a paridade ( $P=0,01$ ), produção de leite ( $P<0.001$ ) e época de parição ( $P<0.001$ ). A OR de prenhez até os 100 DEL para vacas parindo no outono, primavera ou verão foram 39.5, 5.82 e 9.05 vezes a OR de vacas parindo no inverno. LSMEANS para produção de leite por período parto-concepção foram: PC1: 7,733a, PC2: 7,950 b e PC3: 8,208c (Kg). Em conclusão, problemas pós-parto atrasaram o primeiro serviço e consequentemente a concepção das vacas na fazenda orgânica estudada. Adicionalmente, a produção de leite foi maior nas vacas que não conceberam antes dos 100 DEL.

**Palavras-chave:** Leite orgânico; vacas; reprodução

SBTE 032 IATF, TETF e IA

Número de submissão 1577

#### **Taxa de concepção, perdas de gestação e proporção de fêmeas nascidas em rebanhos leiteiros, que utilizam inseminação artificial ou transferência de embriões *in vitro* como técnica reprodutiva para vacas em lactação**

Marcos Henrique Colombo Pereira; Maurício Silveira Coelho

*Fazenda Santa Luzia, Passos, MG, Brasil.*

O objetivo deste trabalho, foi de avaliar diferentes índices reprodutivos em rebanhos leiteiros que utilizam inseminação artificial (IA) ou transferência de embriões *in vitro* (TE) como técnica reprodutiva para vacas em lactação. Foi realizado um estudo retrospectivo em 8 fazendas, localizadas em um raio de 100 km no estado de Minas Gerais. Quatro fazendas utilizavam inseminação artificial ( $n = 16315$ ) e 4 fazendas utilizavam transferência de embriões *in vitro* ( $n = 12084$ ) como técnica reprodutiva, sendo que os embriões *in vitro* foram gerados com sêmen sexado. Apenas vacas em lactação foram utilizadas nas avaliações, onde os seguintes índices reprodutivos foram avaliados: taxa de concepção aos 30, 60 e 120 dias, taxa de parição, perdas de gestação entre 30 e 60 dias, 30 dias ao parto, 60 dias ao parto, percentual de natimortos e proporção de fêmeas nascidas. Em fazendas que utilizaram IA como técnica reprodutiva, a taxa de concepção aos 30 dias foi 29,3% ([4785/16315] mín 27,9% máx 33,9%), aos 60 dias 25,0% ([4076/16312] mín 23,1% máx 27,2%), aos 120 dias 22,9% ([3732/16315] mín 20,5% máx 25,6%) e ao parto 20,3% ([3307/4785] mín 18,0% máx 23,2%). A perda de gestação

entre 30 e 60 dias foi 14,8% ([706/4782] mín 9,2 máx 20,1) entre 30 e parto 30,8% ([1475/4782] mín 22,7% máx 36,1%), entre 60d e o parto 18,9% ([769/4076] mín 14,8% máx 21,9%). O percentual de fêmeas nascidas foi 50,0% ([1655/3307] mín 42,6% máx 55,8%) e o percentual de natimortos 6,1% ([184/2995] mín 2,0% máx 9,8%). Em fazendas que utilizam TE como técnica reprodutiva, a taxa de concepção aos 30 dias foi 42,6% ([5147/12084] mín 38,9 % máx 43,0%), aos 60 dias 35,8% ([4327/12084] mín 32,5% máx 38,1%). A taxa de concepção aos 120 dias e a taxa de parição foram avaliadas em apenas 2 rebanhos, a taxa de concepção aos 120 dias foi 32,9% ([3785/11483] mín 30,9% máx 33,2) e a taxa de parição 29,7% ([3407/11483] mín 24,8% máx 30,1%). A perda de gestação entre 30 e 60 dias foi 15,9% ([820/5147] mín 7,4% máx 18,8%), entre 30 dias e parto 30,5% ([1492/4899] mín 29,9% máx 38,5%), entre 60 dias e parto 16,9% ([692/4099] mín 16,4% máx 24,2%). O percentual de fêmeas nascidas foi 86,7% ([2639/3045] mín 81,7% máx 87,0%). O percentual de natimortos foi 4,9% ([169/3407] mín 4,8% máx 8,0%). Quando os dados de cada técnica reprodutiva foram agrupados, a taxa de concepção aos 30 dias foi 29,3% na IA e 42,6% na TE, aos 60 dias 25,0% na IA e 35,8% na TE, aos 120 dias 22,9% na IA e 32,9% na TE, a taxa de parição 20,3% na IA e 29,7% na TE. A perda de gestação entre 30 e 60 dias foi 14,8% na IA e 15,9% na TE, a perda de gestação entre 30 dias e parto foi 30,8% na IA e 30,5% na TE, a perda de gestação entre 60d e parto foi 18,9% na IA e 16,9% na TE, o percentual de fêmeas nascidas foi 50% na IA e 86,7% na TE, o percentual de natimortos foi 6,1% na IA e 4,9% na TE. Em resumo, a cada 100 vacas IA nasceram 9,9 fêmeas vivas e a cada 100 TE realizadas nasceram 24,5 fêmeas vivas. Este estudo retrospectivo realizado em vacas em lactação de fazendas localizadas na mesma região demonstram que em torno de um terço dos animais gestantes aos 30 dias perdem a gestação até o parto, tanto na IA como na TE. Que existem diferenças entre rebanhos, e sugere que a utilização de embriões *in vitro* produzidos com sêmen sexado permitem maior número de fêmeas nascidas.

**Palavras-chave:** Perda de gestação; fêmeas; embriões *in vitro*

SBTE 033 IATF, TETF e IA

Número de submissão 1580

#### **Capacidade da dupla dose de PGF2 $\alpha$ associada ao eCG em ajustar o proestro de vacas mestiças submetidas a um protocolo de IATF**

Gabriel Felipe Oliveira de Menezes<sup>1</sup>; Alexandra Soares Rodrigues<sup>2</sup>; Mariana Alves de Andrade Silva<sup>1</sup>; Tiago Oliveira Brandão<sup>1</sup>; Aloisio Bitencourt Nascimento<sup>1</sup>; Bia Santos Souza Carôso<sup>1</sup>; Ailton Batista Pereira<sup>2</sup>; Rodrigo Freitas Bittencourt<sup>1</sup>; Marcos Chalhoub<sup>1</sup>; Antonio de Lisboa Ribeiro Filho<sup>1</sup>

1.UFBA, Salvador, BA, Brasil; 2.UFOB, Barra, BA, Brasil.

Objetivou-se avaliar o efeito de uma ou duas doses de prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ) associada ou não a gonadotrofina coriônica equina (eCG) sobre a dinâmica folicular, a função luteal pré-ovulatória, assim como as características morfofuncionais pós-ovulatórias do corpo lúteo (CL) em fêmeas mestiças submetidas a um protocolo de inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Para tanto, 29 vacas multíparas foram submetidas ao exame de ultrassonografia (US) transretal e após a detecção do CL iniciou-se um protocolo de IATF em um dia denominado zero (D0), por meio da inserção do implante de progesterona (P4) associado à aplicação de 2,0mg de benzoato de estradiol. No D7 esses animais receberam 12,5mg de dinoprost trometamina. No D9 realizou a remoção dos dispositivos de P4 e aplicou 0,6mg de cipionato de estradiol. Nesse momento, as fêmeas foram subdivididas nos seguintes tratamentos: Grupo Controle (n=7) - foi administrado 2,5mL de solução fisiológica, Grupo 2PGF (n=7) - aplicou 12,5mg de dinoprost trometamina, Grupo eCG (n=7) - administrou-se 300UI de eCG, Grupo 2PGF+ eCG (n=8) - realizou a aplicação de 300UI de eCG e 12,5mg de dinoprost trometamina. Para avaliar a dinâmica folicular foram realizados exames de US em modo B e doppler colorido (Mindray Z5, Shenzhen, China) a cada 12h do D7 até o momento da ovulação ou 96h após a remoção dos implantes de P4, mensurando-se o diâmetro folicular (DFOL), a área da parede folicular (AFOL) e a área de vascularização da parede folicular (VFOL). Concomitante a cada exame, foram coletadas amostras de sangue sendo determinada a concentração plasmática de P4 pré-ovulatória por meio da metodologia de quimioluminescência utilizando o imunoensaio Access immunoassay systems progesterone. No D24 foi realizada a US modo B e doppler colorido analisando-se o diâmetro luteal (DCL), área luteal (ACL) e área de vascularização do CL (VCL), assim como, foi coletada amostra de sangue para averiguar a concentração plasmática de P4 pós-ovulatória. Os dados foram avaliados pelo ANOVA empregando-se o teste Tukey e análise de medidas repetidas, P<0,05. Não houve diferença significativa entre os protocolos de sincronização para as variáveis DFOL, AFOL e VFOL ao longo do tempo da dinâmica folicular. Os grupos experimentais apresentaram uma concentração plasmática de P4 semelhante em cada momento da avaliação. Não foi observada distinção do DCL, ACL e VCL entre os tratamentos hormonais. Contudo, houve uma tendência (P=0,07) a maiores concentrações de P4 no D24 nos animais do grupo eCG (11,00 $\pm$ 3,32ng/mL) em relação ao 2PGF (6,37 $\pm$ 1,31ng/mL), enquanto o Controle e 2PGF+eCG demonstraram resultados intermediários que se assemelham a ambos os grupos, com concentrações de 8,43 $\pm$ 3,85 e 9,18 $\pm$ 2,82 ng/mL, respectivamente. Os resultados deste estudo sugerem que em animais cíclicos protocolos de IATF com a utilização de uma única dose PGF2 $\alpha$  e sem o suporte gonadotrófico do eCG parece promover adequadas respostas folicular e luteal.

**Palavras-chave:** Bovinos; gonadotrofina coriônica equina; luteólise

SBTE 034 IATF, TETF e IA

Número de submissão 1582

**Semên bovino refrigerado utilizado na IATF contendo ou não glicerol no diluidor**

Juliana Correa Borges<sup>1</sup>; Marcio Ribeiro Silva<sup>2</sup>; Erikliis Nogueira<sup>1</sup>; Deiler Sampaio Costa<sup>3</sup>; Luiz Orcirio Fialho de Oliveira<sup>1</sup>; Urbano Pinto Gomes De Abreu<sup>1</sup>; Daniel Barros Marinho<sup>4</sup>; Roberto Sartori<sup>5</sup>

1.Embrapa, Corumbá, MS, Brasil; 2.Melhor Animal Consultoria Ltda, Jaboticabal, SP, Brasil; 3.UFMS, Campo Grande, MS, Brasil; 4.EMA Pantanal Agropecuária Ltda, Corumbá, MS, Brasil; 5.ESALQ-USP, Piracicaba, SP, Brasil.

O sêmen refrigerado não é submetido ao processo de congelamento/descongelamento e por isso sofre menos injúrias resultando em maior viabilidade e aumento da prenhez comparado com o sêmen criopreservado (J. C. Borges-Silva et al., Reproduction Fertility and Development, on line, 2015). Entretanto, a composição do diluidor merece atenção, a começar pelo glicerol, agente crioprotetor, que até o presente momento, permanece sem o conhecimento de sua atuação na célula espermática e, portanto, poderia ter efeito tóxico durante o período de refrigeração. Assim, o estudo avaliou o uso do sêmen refrigerado contendo ou não glicerol no diluidor TRIS - gema utilizado nos protocolos de IATF de bovinos de corte. Foram coletados ejaculados de três touros, no dia 9 do protocolo de IATF, e divididos em dois tratamentos: 1) sêmen refrigerado com glicerol (6%) e 2) sêmen refrigerado sem glicerol. Palhetas (25x106 espermatozoides) foram submetidas ao processo de refrigeração a 5°C por 24 h, até o momento da IATF. Vacas Nelore (n=346) submetidas a IATF receberam 2mg de BE (RIC-BE®, Tecnopec-Agener União, Brasil) e um dispositivo intravaginal com 1g de progesterona (Primer®, Tecnopec-Agener União, Brasil), em dia aleatório do ciclo estral (Dia 0). No Dia 8, momento da retirada do dispositivo de progesterona, os animais receberam 150µg de d-cloprostenol (Prolise®, Arsa, Argentina) e 1mg de BE (RIC-BE®, Tecnopec-Agener União, Brasil). No Dia 10, 44 horas aproximadamente após a retirada do dispositivo, todas as vacas foram inseminadas, aleatoriamente, com o sêmen refrigerado com e sem glicerol. O diagnóstico de gestação foi realizado 40 dias após a IATF por ultrassonografia (DP-2200 Vet®, Mindray, China). Os dados foram analisados pelo PROC FREQ e PROC MEANS do SAS (SAS/STAT® 9.2, SAS Institute Inc., Estados Unidos). Não houve diferença de prenhez por IA (P/IA) comparando o diluidor contendo ou não o glicerol, respectivamente (50,0 ± 4,7 vs. 53,0 ± 5,0%; P>0,05). Não houve diferença na P/IA entre touros (P=0,44) e entre tratamentos (com e sem glicerol) no sêmen refrigerado quando avaliado a motilidade espermática (81,7 vs. 79,0%), teste de termo resistência lento (68,1 vs. 66,7%) e teste hiposmótico (55,3 vs. 53,7%), respectivamente (P>0,05). Conclui-se que o diluidor com glicerol pode ser utilizado para sêmen refrigerado sem interferir na taxa de prenhez, assim pode-se utilizar diluidor comercial com 6% de glicerol para refrigeração de sêmen a ser utilizado em IATF.

**Palavras-chave:** Diluidor; taxa de prenhez; viabilidade espermática

SBTE 035 IATF, TETF e IA

Número de submissão 1585

**O momento da expressão de estro impacta na fertilidade de protocolo de IATF?**

Carlos Alberto Rodrigues<sup>1</sup>; Marcos Henrique Colombo Pereira<sup>2</sup>; Camila Bortoletto<sup>1</sup>; Andressa Lavezzo Ranieri<sup>3</sup>

1.SAMVET, São Carlos, SP, Brasil; 2.Fazenda Santa Luzia, Passos, MG, Brasil; 3.ZOETIS, São Paulo, SP, Brasil.

O objetivo do estudo foi avaliar se o momento da expressão do estro impacta na prenhez por IA (P/IA) e perda de gestação de vacas Holandesas em lactação submetidas à IATF. Vacas holandesas em lactação no D-11 do protocolo receberam 2mg de Benzoato de Estradiol (Gonadiol/Zoetis/Brasil) + 0,1 mg de gonadorelina (Fertagyl/MSD/Brasil) + dispositivo intravaginal de P4 (1,9g CIDR/Zoetis/Brasil); seguidos por 25mg de PGF (Lutalyse/Zoetis/Brasil) no D-4, e retirada do CIDR + 25mg de PGF e 1mg de ECP (ECP/Zoetis/Brasil) no D-2. No momento da retirada do CIDR as vacas foram divididas aleatoriamente em 2 grupos: um grupo recebeu IATF 48 hs após a retirada do CIDR (D0, IATF); e no outro grupo os animais foram inseminados 12hs após a observação do estro (esquema AM/PM) e quando não observado estro foram inseminados em tempo fixo 48 hs após a retirada do CIDR (estro). A P/IA foi determinada por US nos D 30 e 60. As variáveis P/IA e perda de gestação foram analisadas pelo PROC GLIMMIX. Não houve diferença entre os grupos (IATF vs. ESTRO) na P/IA aos 30d (IATF 30d = 36% [151/414] vs. Estro = 34% [143/420]; P>0.1), e aos 60d (IATF 30d = 29% [122/414] vs. Estro = 26% [110/420]; P>0.1) e na perda de gestação entre 30 e 60 dias (IATF 30d = 19% [29/151] vs. Estro = 23% [33/143]; P>0.1). Não houve interação entre número de partos e tratamento na P/IA aos 30 e 60d (P>0.1). A distribuição de estro após a retirada do CIDR foi: 2% dos animais apresentaram estro em 12 hs, 48% dos animais em 24hs, 27% em 36hs, 13% em 48hs e 11% não apresentou estro. Não houve efeito do tratamento na P/IA aos 30d independente do momento da expressão de estro após a retirada do CIDR: 12hs - IATF = 33% (2/6) vs. Estro = 38% (3/8); 24hs - IATF = 38% (71/188) vs. Estro = 36% (74/203); 36hs - IATF = 42% (48/113) vs. Estro = 42% (45/108); 48hs - IATF = 37% (24/65) vs. Estro = 29% (11/38). Vacas que não apresentaram estro apresentaram P/IA inferior (14% [12/86]) a vacas que expressaram estro 38% (278/729) independente do tratamento (P>0.1). Aos 60d o mesmo padrão nos resultados foi observado: 12hs - IATF = 33% (2/6) vs. Estro = 25% (2/8); 24hs - IATF = 29% (55/188) vs. Estro = 27% (55/203); 36hs - IATF = 37% (42/113) vs. Estro = 33% (36/108); 48hs - IATF = 28% (18/65) vs. Estro = 29% (11/38). Vacas que não apresentaram estro apresentaram P/IA no D 60 inferior (10% [9/86]) a vacas que expressaram estro (30% [221/729]) independente do tratamento (P>0.1). Protocolo de IATF permite manter a prenhez nas vacas inseminadas em momentos

pré determinados em relação à inseminação 12 hs após a detecção de estro. Vacas que apresentam estro apresentam prenhez superior a vacas que não apresentam estro.

**Palavras-chave:** Estro; IATF; prenhez

SBTE 036 IATF, TETF e IA

Número de submissão 1587

**Progesterona injetável pode ser utilizada para indução de ciclicidade em novilhas da raça nelore**

Augusto Rodrigues Felisbino Neto<sup>1</sup>; Bruno Gonzalez de Freitas<sup>1</sup>; Roney Santos Ramos<sup>1</sup>; Marcus Luciano Guimarães Rezende<sup>1</sup>; Rogério Fonseca Guimarães Peres<sup>2</sup>; João Pozzobon<sup>3</sup>; Denis Fernando<sup>4</sup>; Michele Richeri Bastos<sup>1</sup>

1.Ourofino Saúde Animal, Cravinhos, SP, Brasil; 2.Agropecuária Fazenda Brasil, Barra do Garças, MT, Brasil; 3.Pozzobon Assessoria e Representações, Barra do Garças, MT, Brasil; 4.Fazenda Santa Vera, Barra do Garças, MT, Brasil.

A indução de ciclicidade (IC) com dispositivo vaginal de progesterona (P4) associado ao tratamento IM com estradiol aumenta a taxa de ciclicidade e a concepção à inseminação artificial em tempo fixo em novilhas zebuínas (IATF; Sá Filho, et al., Anim. Reprod. Sci., v.160, 2015). Porém, existem poucos dados na literatura acerca da substituição da fonte de P4 via vaginal pela via intramuscular (P4 injetável de longa ação). Portanto, objetivou-se comparar a eficiência do protocolo de IC utilizando P4 injetável ou dispositivo vaginal de P4. O Experimento 1 foi realizado em 3 fazendas localizadas no sudeste do MT. Um total de 557 novilhas da raça Nelore com ECC =  $3,42 \pm 0,15$ ,  $24,0 \pm 3,10$  meses de idade e sem corpo lúteo no D-24 foram distribuídas aleatoriamente em 2 grupos experimentais: Dispositivo P4 (n=281) e P4 Injetável (n=276). No D-24, fêmeas do grupo Dispositivo P4 receberam um dispositivo vaginal de P4 (Sincrogest®, Ourofino Saúde Animal) previamente utilizado por 24 dias (4º uso) e o grupo P4 injetável recebeu 150 mg IM de P4 injetável de longa ação (Sincrogest® injetável, Ourofino). No D-12, os dispositivos foram removidos e todas as fêmeas receberam 1,0 mg IM de cipionato de estradiol (SincroCP, Ourofino). Após 12 dias (D0), todas as novilhas receberam o mesmo protocolo de sincronização da ovulação para IATF [D0 = aplicação de 2 mg IM de benzoato de estradiol (BE; Sincrodiol, Ourofino) e inserção de um dispositivo de P4 (Sincrogest®, Ourofino); D8 = remoção do dispositivo, aplicação IM de 530 µg de cloprostenol sódico (Sincrocio, Ourofino), 1,0 mg de CE (SincroCP, Ourofino) e 300 UI de eCG (SincroeCG, Ourofino)]. Todas as fêmeas foram inseminadas em tempo fixo 48 horas após a retirada do dispositivo de P4. Exames ultrassonográficos transretais foram realizados no D-24 e D0 para avaliação da presença de corpo lúteo (CL) nos ovários e 30 dias após a IATF para diagnóstico de gestação. Os dados foram analisados pelo proc GLIMMIX do SAS® 9.3. Não foi verificada diferença entre os grupos experimentais quanto à presença de CL no D0 [Dispositivo P4 = 80,8% (227/281) e P4 Injetável = 82,6% (228/276); P = 0,34]. Ainda, a taxa de prenhez 30 dias após a IATF foi semelhante entre os grupos [Dispositivo P4 = 50,2% (141/281) vs. P4 Injetável = 51,4% (142/276); P = 0,75]. No Experimento 2, 617 novilhas de 2 fazendas do sudeste do MT, com ciclicidade desconhecida no D-24 foram submetidas ao mesmo delineamento do Experimento 1. Houve interação fazenda-tratamento (P = 0,04). Não houve diferença na presença de CL no D0 [Dispositivo P4 = 83,0% (258/311) e P4 Injetável = 75,8% (232/306); P = 0,10] e taxa de prenhez [Dispositivo P4 = 39,5% (123/311) e P4 Injetável = 33,0% (101/306); P = 0,48]. Dessa forma, conclui-se que o protocolo de IC utilizando Sincrogest® Injetável resulta em eficiência semelhante ao dispositivo vaginal de P4 de 4º uso, podendo ser uma estratégia a ser adotada nos programas reprodutivos de novilhas. Agradecimentos: Fazendas Sta Vera, Alegria, Filipina e Brasil.

**Palavras-chave:** Indução de ciclicidade; novilha; progesterona injetável

SBTE 037 IATF, TETF e IA

Número de submissão 1592

**Inseminação artificial intrauterina transcervical com cio induzido em cadela (relato de caso)**

Elenara Botelho Araújo; Haroldo Francisco Lobato Ribeiro; Sebastião Tavares Rolim Filho; Anelise Sarges Ramos UFRA, Belém, PA, Brasil.

O presente estudo teve como objetivos realizar a indução do cio por meio de administração de hormônio exógeno análogo ao GnRH, determinar o momento ideal para Inseminação Artificial (IA), e utilizar a técnica de Inseminação Artificial Intrauterina (IAIU) transcervical videoassistida na espécie canina. O experimento foi realizado na residência de convívio dos animais e no laboratório do Setor de Reprodução Animal da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA). Foram utilizadas cinco cadelas (A, B, C, D e E) e um macho com fertilidade conhecida, para congelamento do sêmen. No dia zero (D0) foi administrado 1,0 mL IM de Sincroforte® (Ourofino, São Paulo, Brasil) para indução do cio em todas as cadelas, que, de acordo com a citologia vaginal, encontravam-se em anestro. Foram realizados exames de citologia vaginal a cada cinco dias para acompanhar as alterações no ciclo estral e determinar o momento ideal para IA. Uma nova administração hormonal foi feita apenas nas cadelas B, C, D e E no D15, com a mesma dosagem da anterior e com a finalidade de realizar uma comparação em relação à quantidade de hormônio recebido por cadela. A cadela A foi excluída das administrações hormonais, mas continuou sendo monitorada por meio das citologias vaginais. No D30, foi administrado o hormônio nas dosagens de 1,0 mL na cadela B, 1,25 mL na cadela C, 1,5 mL na cadela D e 2,0 mL na cadela E. A citologia vaginal no D55 demonstrou alterações típicas de proestro na cadela A, com 40% de células superficiais queratinizadas, descarga

sanguinolenta e tumefação vulvar, e no D60 passou a apresentar características ideais para a IA, com 100% de taxa de cornificação celular e aceite da aproximação, sem monta, pelo macho. A IA foi realizada com auxílio do aparelho Vetcam Castle®, onde foi inserida uma bainha de Transferência de Embriões (TE) 21" (Walmur®) para que o sêmen, descongelado, fosse depositado de forma intracervical profunda (no corpo do útero) na cadela. Para isto, foi utilizada uma seringa contendo 1,0 mL de sêmen e mais 2,0 mL de ar, a qual foi acoplada à bainha de TE. Após a IA, a cadela foi mantida com os membros pélvicos erguidos por 10 minutos. Uma segunda IA foi feita após 24 horas com a mesma técnica. Foi realizada uma análise descritiva de porcentagem dos resultados. Dos cinco protocolos para indução de cio utilizados, apenas um (20%) foi eficaz. Foi realizado no D79 o exame ultrassonográfico, que constatou prenhez, através de uma vesícula gestacional medindo 1,3 x 0,9 cm (longitudinal x transversal), localizada no corno uterino esquerdo, sugerindo período gestacional em torno de 15 dias. Portanto, o uso de apenas uma administração da Sincroforte® (Ourofino, São Paulo, Brasil) na fase de anestro foi satisfatório para indução de cio, a citologia vaginal mostrou-se um método eficaz para a determinação do momento ideal para IA e a técnica de IAIU transcervical videoassistida demonstrou eficácia, resultando em prenhez.

**Palavras-chave:** Cadelas; cio induzido; inseminação artificial

SBTE 038 IATF, TETF e IA

Número de submissão 1594

### **IATF aumenta a eficiência reprodutiva em sistemas intensivos de produção de leite a pasto**

Maicon Lorena Gaissler Pinto<sup>1</sup>; Lucas Ramos<sup>2</sup>; Fabricio D. Mozzaquatro<sup>3</sup>

*1.EPAGRI, Lages, SC, Brasil; 2.UDESC, Lages, SC, Brasil; 3.UNIPAMPA, Uruguaiana, RS, Brasil.*

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência reprodutiva de vacas leiteiras mantidas em sistema de alimentação a pasto, suplementadas com silagem de milho e ração concentrada com 16% de PB, submetidas a três programas reprodutivos distintos. O experimento ocorreu em três pequenas propriedades rurais, duas com rebanho Jersey e produção média diária de 21 litros e a outra de animais mestiços das raças holandesa e simental e produção média de 28 litros. As três já utilizavam detecção de cio e IA regularmente, realizada duas vezes ao dia, quando os animais eram trazidos para a ordenha e alimentação concentrada. Vacas multíparas foram selecionadas pelo histórico reprodutivo e submetidas a exame ginecológico completo entre 30-40 dias pós-parto. Todas as fêmeas consideradas saudáveis foram alocadas aleatoriamente em um dos três tratamentos: Controle – As vacas (n=58) foram inseminadas artificialmente 12 horas depois do início do primeiro cio natural ocorrido após 50 dias em lactação. No tratamento PGF, cada vaca (n=43) com 50-60 dias pós-parto recebeu uma dose IM de 0,5mg de d-cloprostenol sem avaliação de presença de CL e foi inseminada 12 horas após a detecção do cio. Vacas que não entraram em cio, receberam uma segunda dose de 0,5mg de d-cloprostenol entre 11 a 14 dias mais tarde. No tratamento IATF, as vacas (n=47) foram inseminadas em tempo fixo. O protocolo foi iniciado entre 50-60 dias pós-parto com implante intravaginal com 1g de progesterona e aplicação IM de 2,0mg de benzoato de estradiol (BE; D0). No D8, o implante foi retirado e administrou-se 0,5mg de d-cloprostenol e 1mg de cipionato de estradiol (IM). A IATF foi realizada 48 horas após a retirada do implante. O diagnóstico de gestação ocorreu aos 30 dias após IA com auxílio de ultrassom. As vacas vazias voltaram ao manejo convencional da propriedade e as IA até os 150 DEL foram anotadas e posteriormente examinadas por US. As variáveis dias em lactação para a primeira IA (DEL/IA) e o intervalo parto-concepção (IPC) foram examinadas pela análise de variância seguida do teste de Tukey. Análise de deviance foi aplicada às taxas de concepção a primeira inseminação (TC); e prenhez aos 150 dias em lactação. Foi considerado um nível de significância de 5% em todos os testes estatísticos empregados. Os efeitos de propriedade, ordem de parto, condição ovariana, escore de condição corporal, raça e produção leiteira não mostraram interação significativa com os tratamentos do experimento. Como esperado observou-se redução no DEL/IA para os tratamentos IATF (65,49±0,64 dias)<sup>b</sup> e PGF (68,07±1,76 dias)<sup>b</sup>, em relação ao controle (77,59±3,01 dias)<sup>a</sup>. A taxa de concepção foi maior no IATF (78,72±6,03%)<sup>a</sup> em relação ao PGF (53,49±7,70%)<sup>b</sup> e controle (51,72±6,62%)<sup>b</sup>. A taxa de prenhez aos 150 DEL foi superior com o emprego de IATF (90,01±4,38%)<sup>a</sup> quando comparada as dos grupos controle (70,59±6,44%)<sup>b</sup> e PGF (67,50±7,50%)<sup>b</sup>. O IPC dos animais gestantes até os 150 DEL do tratamento IATF foi reduzido (68,55±2,17 dias)<sup>a</sup> quando comparado aos animais dos grupos Controle (89,31±4,80 dias)<sup>b</sup>, e PGF (73,33±4,30 dias)<sup>b</sup>. Os resultados superiores obtidos na IATF possivelmente devem-se a um efeito positivo do protocolo hormonal aliado à alta taxa de serviço. Conclui-se que, nas condições experimentais observadas, a IATF melhorou a eficiência reprodutiva de rebanhos leiteiros explorados em regime intensivo a pasto.

**Palavras-chave:** Eficiência reprodutiva; intervalo parto-concepção; IATF

SBTE 039 IATF, TETF e IA

Número de submissão 1595

### **Ressincronização 22 dias após a primeira IATF em fêmeas bubalinas, criadas extensivamente em terras alagadas no estado do Amapá, Amazônia**

Wilton Figueiredo Lima; Gustavo Alighiere Lopes Silva; Haroldo Francisco Lobato Ribeiro; Sebastião Tavares Rolim Filho; Marina Bezerra Macêdo; Elaine Ferreira Mesquita; Anelise Sarges Ramos; Raphael Castro Conde; Victor da Costa Mileo

UFRA, Belém, PA, Brasil.

Objetivou-se avaliar a influência na taxa de prenhez em búfalas submetidas a IATF com protocolo D22 e uso de 2,0 mL IM de BE junto com o dispositivo intravaginal de P4 na resincronização. O estudo foi realizado em fazendas localizadas em área de várzea, na estação de vazante do rio Amazonas, no Estado do Amapá. Foram utilizadas 96 búfalas múltiparas, da raça Murrah, mantidas em pastagens nativa, sem suplementação mineral. O protocolo de IATF foi a introdução do dispositivo intravaginal de P4 de primeiro uso (Primer®, Tecnopec, São Paulo, Brasil) e 2,0 mg BE (Sincrodiol®, Ouro Fino, São Paulo, Brasil), no D0 (dia zero) a tarde. No D8 (dia oito) também a tarde, foi realizada a retirada do dispositivo, aplicação de 0,5 mg de PGF2α (Sincrocio®, Ouro Fino, São Paulo, Brasil) e 400 UI de eCG IM (Sincro eCG®, Ouro Fino, São Paulo, Brasil). No D9 (dia nove) a tarde, foi aplicado 1,0 mg de BE e realizadas duas inseminações, no D10 (a tarde) e D11 (pela manhã), com 58 e 70 horas respectivamente após a retirada do dispositivo de P4. No dia vinte dois, D22, após a primeira IATF, foi utilizado o dispositivo intravaginal de P4 (2º uso) e 2,0 mg BE IM. Oito dias após, no D30 foi realizado o diagnóstico de gestação por ultrassonografia. No D30, nas búfalas não gestantes foi aplicado 0,5 mg de PGF2α e 400 UI de eCG. No D32 a segunda IATF, 50 horas, após a retirada do P4. A análise estatística de variância (ANOVA) e o teste de Tukey foram utilizados, adotando-se o nível de significância de 5%. A taxa de prenhez da primeira IATF foi de 47,91% (46/96) resultado considerado satisfatório para o tipo de criação extensiva desta espécie na região. A dose 2,0mg de BE no D22, apesar de ser o dobro da recomendada, não interferiu na taxa de prenhez. Entretanto, o resultado da resincronização foi 12% (6/50) ( $P < 0,05$ ), que atribuímos ao fato da IATF ser realizada, somente uma vez, 50hs após a retirada da progesterona de segundo uso. Estudando a eficiência do protocolo D22 em vacas nelores submetidas a resincronização com 1,0 mg de BE, os autores obtiveram resultado de 53,0% de prenhez na primeira IATF e 38,9% na segunda (GUERREIRO, Anais do XXIX SBTE, 273, 2015). Assim sendo, no presente trabalho, a resincronização no D22 com 2,0 mg de BE, pode ser uma boa alternativa de manejo na IATF, em búfalas criadas de forma extensiva, em área de várzea.

**Palavras-chave:** Resincronização; IATF; búfalo

SBTE 040 IATF, TETF e IA

Número de submissão 1598

#### **Avaliação do efeito da administração de três diferentes preparações comerciais de eCG na taxa de prenhez à IATF de vacas da raça nelore**

Antonio Francisco Chaves Neto<sup>1</sup>; Bruno Junhiti Castro Watanabe<sup>2</sup>; Bruno Gonzalez De Freitas<sup>3</sup>; Roney Santos Ramos<sup>3</sup>; Marcus Luciano Guimarães Rezende<sup>3</sup>; Rodolfo Daniel Mingoti<sup>4</sup>; Michele Richeri Bastos<sup>3</sup>

1.Mamelle Serviços Agropecuários, Arapongas, PR, Brasil; 2.Fazenda Baguassu, Porto Murtinho, MS, Brasil; 3.Ourofino Saúde Animal, São Paulo, SP, Brasil; 4.FMVZ-USP, São Paulo, SP, Brasil.

O tratamento com gonadotrofina coriônica equina (eCG) pode estimular o desenvolvimento final do folículo e aumentar a taxa de prenhez à inseminação artificial em tempo fixo (IATF), principalmente em vacas de corte com baixa condição corporal e em anestro (Baruselli et al., Anim Reprod, v.9, p.139-152, 2012). Considerando a importância desse hormônio para o incremento da eficiência reprodutiva, o presente estudo teve como objetivo comparar o efeito da administração de 3 diferentes preparações comerciais de eCG na taxa de prenhez à IATF em vacas de corte. O estudo foi realizado em uma fazenda comercial localizada em Porto Murtinho-MS. Um total de 844 fêmeas da raça Nelore com ECC=2,97±0,01, taxa de presença de corpo lúteo no início do experimento (CLD0) = 29,1%, sendo 547 vacas múltiparas lactantes, 212 múltiparas não lactantes e 85 primíparas lactantes foi distribuído aleatoriamente em 3 grupos experimentais: Grupo SincroeCG [n = 277 (201 múltiparas lactantes, 58 múltiparas não lactantes e 18 primíparas lactantes); ECC = 2,97±0,01; CLD0 = 26,7%; 300UI de eCG da empresa Ourofino Saúde Animal], Grupo A [n = 247 (128 múltiparas lactantes, 96 múltiparas não lactantes e 23 primíparas lactantes); ECC = 2,97±0,01; CLD0 = 35,6%; 300 UI de preparação comercial da empresa A] e Grupo B [n = 320 (218 múltiparas lactantes, 58 múltiparas não lactantes e 44 primíparas lactantes); ECC = 2,98±0,01; CLD0 = 25,9%; 300 UI da preparação comercial de eCG da empresa B]. No início do experimento (D0), todas as fêmeas receberam 2,0 mg intramuscular (IM) de benzoato de estradiol (BE; Sincrodiol, Ourofino Saúde Animal) e um dispositivo intravaginal de liberação de progesterona (P4; Sincrogest, Ourofino Saúde Animal). Oito dias após (D8), os dispositivos foram removidos e foram administrados 1,0 mg IM de cipionato de estradiol (CE; SincroCP, Ourofino Saúde Animal), 0,530 mg IM de cloprostenol sódico (PGF; Sincrocio, Ourofino Saúde Animal) e 300UI de eCG IM (SincroeCG, Empresa A ou Empresa B). As vacas foram inseminadas em tempo fixo 48 horas após a retirada dos dispositivos. Exames ultrassonográficos transretais foram realizadas no D0 para verificar presença de CL nos ovários (todas as fêmeas com presença de CL no D0 receberam 0,530 mg de PGF, seguindo o manejo proposto por Chaves Neto et. al., Anim Reprod, v.12, n.3, p.669, 2015) e 30 dias após a IATF para diagnóstico de gestação. Para avaliar o efeito de ECC no D0 na taxa de prenhez, as fêmeas foram classificadas em ECC ≤ 2,75 ou ECC > 2,75. Os dados foram analisados pelo procedimento GLIMMIX do SAS® 9.3. Não houve interação tripla entre CLD0, ECC e Tratamento para a taxa de prenhez ( $P = 0,74$ ). Não houve interação entre CLD0\*ECC ( $P = 0,97$ ); CLD0\*Tratamento ( $P = 0,16$ ) e ECC\*Tratamento ( $P = 0,19$ ). Não houve diferença na taxa de prenhez de acordo com a eCG administrada [SincroeCG = 50,9% (141/277); Grupo A = 51,4% (127/247); Grupo B = 50,6% (162/320);  $P = 0,20$ ]. No entanto, foi verificado efeito na taxa de prenhez à IATF de acordo com CLD0 [sem CL no D0 = 48,1% (288/599) vs. com CL + PGF no D0 = 58,0% (142/245);  $P = 0,02$ ] e com o ECC no D0 [ $\leq 2,75 = 46,8\%$  (146/312) vs.  $> 2,75 = 53,4\%$  (284/532);  $P = 0,05$ ]. Dessa forma, podemos concluir, com base nos



resultados obtidos, que a taxa de prenhez de fêmeas Nelore à IATF foi semelhante entre o Sincro eCG e as demais preparações comerciais de eCG avaliadas.

Agradecimentos Equipe da fazenda Baguassu.

**Palavras-chave:** eCG; IATF; nelore

SBTE 041 IATF, TETF e IA

Número de submissão 1602

**Utilização de embriões produzidos *in vitro* com sêmen sexado – aplicação da técnica para produção de bezerros de corte superiores**

Alexandre de Oliveira Bezerra<sup>1</sup>; Walvonvitis Baes Rodrigues<sup>2</sup>; Juliana Correa Borges<sup>3</sup>; Luiz Orcirio Fialho de Oliveira<sup>3</sup>; Urbano Pinto Gomes de Abreu<sup>3</sup>; Natalia Albanese Anache<sup>1</sup>; Karine Casanova Da Silva<sup>1</sup>; Alessandra Corallo Nicacio<sup>4</sup>; Eriklis Nogueira<sup>3</sup>

1.Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil; 2.Bolsista DCR FUNDECT, Campo Grande, MS, Brasil; 3.EMBRAPA CPAP, Corumbá, MS, Brasil; 4.EMBRAPA CNPGC, Campo Grande, MS, Brasil.

Dada à relevância das raças zebuínas e a crescente utilização da produção *in vitro* (PIV) de embriões no Brasil, avaliou-se a taxa de prenhez de receptoras Nelore inovuladas com embriões PIV fresco ou vitrificados, obtidos de ovócitos de doadoras Nelore provenientes de abatedouro (ABATE, n= 66 embriões) ou OPU *in vivo* (VIVO, n= 299 embriões). Para FIV foi utilizado sêmen sexado para macho previamente testados de dois touros Angus (B. taurus), em 3 rotinas de PIV. Após 7 dias de cultivo *in vitro* (CIV), apenas os embriões em estágio de mórula ou blastocisto considerados grau I foram transferidos a fresco (FRESCO, n= 286) ou após vitrificação/desvitrificação (VITRIFICADO, n= 79). As receptoras (vacas multíparas Nelore) foram sincronizadas em dia aleatório do ciclo estral (D0) com a colocação de dispositivo intravaginal de progesterona (Cronipress® Mono Dose M-24, Biogénesis Bagó, Paraná, Brasil) e administração de 2 mg de Benzoato de Estradiol (BE) (Estrogin®, Biofarm, São Paulo, Brasil). No dia 8 (D8) foi retirado o dispositivo de P4 concomitante com aplicação de 1,125 µg de d-cloprostenol (Prolise, Tecnopec, São Paulo, Brasil), 1 mg de benzoato de estradiol (Estrogin®, Biofarm, São Paulo, Brasil) e 300 UI de eCG (Folligon® 5000UI, Intervet, São Paulo, Brasil). O D10 foi considerado o dia do cio e no D17 as receptoras que possuíam corpo lúteo maior que 20 mm de diâmetro foram inovuladas. O diagnóstico de gestação foi realizado 60 dias após inovulação e os dados foram analisados pelo PROC GLIMMIX do SAS (P<0,05). As taxas de clivagem foram de 63,96 % ± 35,52 e 39,18% ± 12,17 para os grupos VIVO e ABATE respectivamente e foram diferentes (P= 0,0209), e as taxas de blastocisto foram de 30,49% ± 32,34 e 14,73% ± 11,09 para os grupos VIVO e ABATE respectivamente e não foram diferentes, apresentando apenas tendência (P= 0,0892). A baixa taxa de clivagem e blastocisto dos ovários de abatedouro pode ter sido resultado do intervalo de cerca de 6 horas entre a coleta do ovário, transporte e aspiração no laboratório, reduzindo a qualidade do oócito (Satrapa et al., 2011). Não houve diferença na taxa de prenhez (P=0,72) para os embriões FRESCO (34,27% ± 47,5) ou VITRIFICADO (30,38% ± 46,2), assim como para a origem dos ovócitos (VIVO = 35,12% ± 47,8; ABATE = 25,76% ± 44,0; P=0,17). Conclui-se, que a estratégia de utilização de sêmen sexado associado à vitrificação é viável para reduzir custos e otimizar a tecnologia de PIV, melhorando sua aplicação em larga escala, independente da origem dos ovócitos.

**Palavras-chave:** Embrião sexado; vitrificação; TETF

SBTE 042 IATF, TETF e IA

Número de submissão 1603

**Taxa de prenhez à IATF de vacas nelore (*Bos indicus*) submetidas ao protocolo de 3 ou 4 manejos com CIDR® ou Sincrogest® novos e reutilizados**

Rodolfo Daniel Mingoti<sup>1</sup>; Bruno Gonzalez de Freitas<sup>2</sup>; Roney Santos Ramos<sup>2</sup>; Michele Richeri Bastos<sup>2</sup>; Alessandra Ambrósio Teixeira<sup>1</sup>; Marcus Luciano Guimarães Rezende<sup>2</sup>; Marcio Wasilewski de Castro<sup>3</sup>; Anderson Faquim<sup>3</sup>; Manoel Francisco Sá Filho<sup>1</sup>; Pietro Sampaio Baruselli<sup>1</sup>

1.Departamento de Reprodução Animal, VRA-FMVZ-USP, São Paulo, SP, Brasil; 2.Ourofino Saúde Animal, Cravinhos, SP, Brasil; 3.Aliança Assessoria Pecuária, Campo Grande, MS, Brasil.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a taxa de prenhez em vacas lactantes da raça Nelore (*Bos indicus*) utilizando diferentes dispositivos intravaginais de progesterona (P4) novos, utilizados pela segunda ou terceira vez (CIDR®; 1,9g de P4 ou Sincrogest®; 1,0g de P4) em 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 1941 vacas Neloeres, provenientes de uma fazenda localizada no município de Aquidauana/MS, foi homogeneamente distribuído no início do protocolo de IATF de acordo com ECC (Novo= 3,0±0,42; 2º Uso=2,6±0,36; 3º Uso 2,7±0,39) e dias pós-parto (Novo= 43,5±9; 2º Uso=44,5±6; 3º Uso 44,3±6 dias). Os animais receberam no Dia 0 do protocolo tratamento com 2,0 mg de BE (Sincrodiol®, Ourofino, Brasil) e inserção do dispositivo intravaginal de P4 (Sincrogest® ou CIDR®). Para evitar efeito do número de manejos na taxa de prenhez à IATF, neste momento as fêmeas foram separadas conforme o grupo experimental (3 vs 4 manejos). No grupo que recebeu o protocolo de 3 manejos, no dia 8 foi efetuada a retirada dos dispositivos de P4 (CIDR® ou Sincrogest®), associado aos tratamentos com 0,530 mg de cloprostenol sódico (Sincrocio®, Ourofino, Brasil), 300UI de gonadotrofina coriônica equina

(eCG; Novormon®, Zoetis, Brasil) e 1,0 mg de cipionato de estradiol (CE; ECP®, Zoetis, Brasil). A IATF foi realizada 48 h após a remoção do dispositivo de P4. No grupo que recebeu o protocolo de 4 manejos, no dia 7 foi administrado 0,530 mg de cloprostenol sódico. No dia 9, realizou-se a retirada dos dispositivos de P4 (CIDR® ou Sincrogest®), associado aos tratamentos com 300UI de eCG e 1,0 mg CE. A IATF foi realizada no Dia 11 (48 horas após a retirada do dispositivo de P4). Após a IATF os grupos de 3 e 4 manejos foram novamente reagrupados até o momento do diagnóstico de gestação por ultrassonografia (Mindray, DP2200vet, Brasil) 30 dias após IATF. Os dados foram analisados utilizando o procedimento GLIMMIX do SAS. Não houve interação tripla entre dispositivo de P4, usos do dispositivo e número de manejos sobre a taxa de prenhez ( $P=0.28$ ). Não houve interação dupla entre dispositivo de P4 e número de manejos sobre a taxa de prenhez [Sincrogest®\*3Manejos = 52.5% (249/474); CIDR®\*3Manejos = 54.1% (269/497); Sincrogest®\*4Manejos = 54.3% (265/488); CIDR®\*4Manejos = 53.5% (258/482);  $P=0.41$ ]. Ainda, não foram observadas diferenças na taxa de prenhez entre os grupos que receberam diferentes números de manejos [3 manejos = 53.4% (518/971); 4 manejos = 53.9% (523/970);  $P=0.71$ ], bem como, diferentes dispositivos de P4 [Sincrogest® = 53.4% (514/962) vs CIDR® = 53.8% (527/979);  $P=0.97$ ]. Desta forma, é possível obter semelhantes taxas de prenhez à IATF em vacas zebuínas lactantes sincronizadas com protocolos de 3 ou 4 manejos. Além disso, semelhantes taxas de prenhez à IATF foram verificadas em vacas tratadas com Sincrogest® ou CIDR® novos e reutilizados.

Agradecimentos: Aliança Assessoria Pecuária, Fazenda Santa Cristina e Ourofino Saúde Animal

**Palavras-chave:** Dispositivo liberação de progesterona; reutilização dispositivo de progesterona; 8 dias vs 9 dias

SBTE 043 IATF, TETF e IA

Número de submissão 1608

**Validação de testes de bioatividade *in vivo* em ratas e novilhas de diferentes preparações comerciais de eCG**

Michele Richeri Bastos<sup>1</sup>; Ana Claudia Carreira<sup>2</sup>; Marcus Luciano Guimarães Rezende<sup>1</sup>; Roney Santos Ramos<sup>1</sup>; Bruno Gonzalez de Freitas<sup>1</sup>; Rodolfo Daniel Mingoti<sup>3</sup>; Mari Cleide Sogayar<sup>2</sup>; Pietro Sampaio Baruselli<sup>3</sup>

1.Ourofino Saúde Animal, Cravinhos, SP, Brasil; 2.NUCEL - FM - USP, São Paulo, SP, Brasil; 3.FMVZ/USP, São Paulo, SP, Brasil.

Objetivou-se relacionar os resultados obtidos no teste de bioatividade de diferentes preparações comerciais de gonadotrofina coriônica equina (eCG) em ratas pré-púberes (Experimento 1) com o teste de bioatividade das mesmas preparações em fêmeas bovinas (Experimento 2). No experimento 1, cinco partidas da preparação comercial contendo eCG (SincroeCG® - Ourofino Saúde Animal; partidas S1, S2, S3, S4 e S5) e uma partida do produto eCG A (Empresa A; partida A1) foram testadas em ratas de acordo com o método Cole e Erway (1954), baseado no ganho de peso ovariano. Solução salina foi utilizada para o controle negativo (CN) e o padrão internacional (S75516 – National Institute for Biological Standards) como controle positivo (CP). Quarenta ratas da linhagem Sprague-Dawley (5 ratas por grupo) receberam 10 UI subcutâneo de eCG (D0) e, 3 dias após a aplicação (D3), foram eutanasiadas e seus ovários foram dissecados e pesados. No experimento 2, as mesmas partidas, S1 e A1, foram testadas em novilhas da raça Nelore com ECC=2,9±0,07, seguindo o seguinte delineamento: D0 = aplicação de 2mg de benzoato de estradiol (BE; Sincrodiol, Ourofino) e inserção de um dispositivo intravaginal contendo progesterona (P4; Sincrogest®, Ourofino). Cinco dias após (D5), as fêmeas foram homogeneamente distribuídas, de acordo com a população folicular e o ECC no D0, em três grupos experimentais (Controle = aplicação de 5mL de solução salina; S1 = aplicação de 1.000UI de SincroeCG®, partida S1; A1 = aplicação de 1.000UI de eCG da empresa A, partida A1). No oitavo dia do protocolo (D8), o dispositivo foi removido e foram administrados 0,530 mg de Cloprostenol sódico (Sincrocio, Ourofino) e 1,0mg de cipionato de estradiol (SincroCP; Ourofino). Análises ultrassonográficas foram realizadas no D0 (contagem de população folicular), no D8 (contagem de folículos grandes -  $\geq 8,0\text{mm}$ ) e no D16 para contagem de corpos lúteos (CL). Os resultados foram analisados pelo procedimento GLIMMIX do SAS® 9.3. Em ratas, foi observada diferença ( $P<0,001$ ) entre o peso dos ovários do CN (CN=33,3g±1,1) em relação aos grupos tratados com eCG (S1=71,2g±7,1; S2=78,0g±8,3; S3=94,6g±9,3; S4=139,2g±7,9; S5=100,4g±11,8; A1=66,6g±7,5; CP=84,4g±6,6), entretanto não houve diferença ( $P>0,05$ ) entre a eCG das diferentes empresas fabricantes. Em novilhas, a quantidade de folículos grandes no D8 e de CL no D16 foram maiores no grupo S1 (20,4±3,5 e 18,2±4,0) em comparação ao grupo Controle (0,7 ±0,2 e 0,5 ±0,2), ficando o grupo A1 intermediário entre o grupo S1 e o grupo CN (11,1 ±3,2 e 8,2 ±2,3;  $P<0,0001$  e  $P<0,0001$ , respectivamente). Conclui-se que ambas as metodologias são eficientes para validar a bioatividade de preparações comerciais de eCG. Ainda, o delineamento proposto no Experimento 2 pode ser utilizado como alternativa para o controle de qualidade de bioatividade de preparações comerciais de eCG na espécie bovina.

**Palavras-chave:** eCG; bioatividade; superestimulação

SBTE 044 IATF, TETF e IA

Número de submissão 1610

**G GnRH pode aumentar o controle da ovulação em ovelhas sincronizadas com um tratamento curto a base de progesterona**

Jesús Manuel Dorado; José Francisco Cox; Fernando R Saravia

*Universidad de Córdoba, Estrangeiro, Espanha.*

Este estudo objetivou acessar a fase final da dinâmica folicular e a performance reprodutiva de ovelhas sincronizadas e tratadas com GnRH para controlar a ovulação em comparação com o tratamento convencional baseado em eCG. As ovelhas, BCS 3,0 (escala de 1 a 5), alimentadas para satisfazer seus requerimentos foram tratadas com um dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR G®, Pfizer, Chile) por 6 dias e uma injeção de cloprostenol (0,125 mg, im, Ciclase®, Syntex, Chile) no momento da retirada do dispositivo. Em um primeiro experimento, 59 ovelhas sincronizadas foram alocadas aleatoriamente em um grupo eCG (400 UI im (Novormon®, Syntex), administrado no momento da remoção do CIDR, n=20), um grupo eCG+GnRH (o mesmo descrito acima mais 4,2 mg/ewe de acetato de buserelina (Conceptal®, Intervet, Chile) 36 h após remoção do CIDR, n=19 e um grupo GnRH que recebeu apenas GnRH como descrito acima (n=20). Para avaliar o efeito do GnRH sobre o controle da ovulação comparado ao grupo controle eCG, folículos  $\geq 4$  mm em diâmetro foram mensurados por ultrassonografia transretal (sonda de 10 MHz, Honda 2100 Vet) 36 h após CIDR, na ovulação e no CL de 10 dias e registrados em tabelas individuais enquanto o momento da ovulação foi detectado por meio de escaner de ovário a cada 8 h desde 48 h após CIDR (tempo médio entre a última vez que um folículo foi observado e seu desaparecimento); o intervalo para a ovulação foi considerado como o período entre a remoção de CIDR e a ovulação. Em um segundo experimento, 136 ovelhas sincronizadas foram submetidas a monta natural e utilizadas para avaliação do potencial de fertilidade do GnRH plus eCG comparado a ovelhas tratadas apenas eCG após a remoção do CIDR, em termos de taxa de prenhez, taxa de fertilidade e prolificidade. Testes ANOVA e Kruskal-Wallis foram utilizados no Exp. 1 e o teste Chi-quadrado no Exp.2 (STATISTICA 10.1; StatSoft Inc, Tulsa, OK, USA). No Experimento 1, os resultados mostraram que o GnRH reduziu o intervalo até a ovulação e ovulações em grupo comparado com ovelhas tratadas com eCG ( $55,8 \pm 0,78$  vs.  $67,7 \pm 1,72$  h respectivamente,  $P<0,001$ ). Também reduziu o número de folículos ovulatórios comparado às ovelhas tratadas com eCG ( $1,2 \pm 0,16$  vs.  $1,9 \pm 0,15$  respectivamente,  $P=0,008$ ) e não apresentou efeito na taxa de ovulação, ou sobre outras características foliculares e o diâmetro do CL ( $P>0,10$ ). A adição de eCG às ovelhas tratadas com GnRH aumentou a taxa de ovulação (100% vs. 80,0% para GnRH+eCG vs. GnRH,  $P=0,04$ ), e aumentou o número de folículos ovulatórios em relação aos vistos em ovelhas tratadas com eCG ( $1,8 \pm 0,18$  vs.  $1,9 \pm 0,15$ ,  $P=0,53$ ), reduziu o intervalo até a ovulação ( $P=0,007$ ) e a dispersão das ovulações ( $P<0,001$ ), e não apresentou efeito sobre os diâmetros do folículo e do corpo lúteo ( $P>0,10$ ). No Experimento 2, os resultados mostraram que o GnRH aumentou a prolificidade comparado as ovelhas tratadas com eCG (178,3% vs. 134,2%,  $P<0,001$ ) sem afetar as taxas de prenhez e fertilidade ( $P>0,10$ ). Os resultados sugerem que o GnRH administrado 36 h após um tratamento curto com progesterona aumenta o controle do intervalo até a ovulação e a prolificidade de ovelhas sincronizadas.

**Palavras-chave:** Ovulation; synchronization; ewe

SBTE 045 IATF, TETF e IA

Número de submissão 1615

#### **Efeito do escore de condição corporal nas taxas de prenhez de fêmeas de corte no RS**

Mariani Farias Fiorenza<sup>1</sup>; Thainá Minela<sup>2</sup>; Mariê Wolski Cabral<sup>2</sup>; Janislene Mach Trentin<sup>1</sup>; Ricardo Olimpio Schenatto<sup>1</sup>; Laurence Boligon de Araujo<sup>2</sup>; Julia Brum Spreckelsen Casarin<sup>2</sup>; Ana Paula Martini<sup>2</sup>; Gilson Antonio Pessoa<sup>1</sup>; Mara Iolanda Batistella Rubin<sup>2</sup>

*1.UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil; 2.UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.*

Os avanços alcançados em biotecnologias, assim como a maior compreensão da dinâmica estral bovina tornaram possível o desenvolvimento de protocolos que permitem a manipulação do ciclo estral (Lamb e Mercadante, Vet Clin Food Anim 32:1-13, 2016). Este estudo buscou avaliar as principais influências do escore de condição corporal (ECC) nas taxas de ciclicidade e de prenhez de fêmeas de corte submetidas à protocolo de IATF no período de 2012 a 2015. As fêmeas bovinas (7113), pertencentes a 12 propriedades do RS, foram classificadas quanto ECC ( $<2,5$ ;  $2,5-3,5$ ;  $>3,5$ ) e quanto à categoria animal (núlparas, primíparas e multíparas). No início do protocolo de IATF (D0), os animais passaram por avaliação ultrassonográfica para verificar a ciclicidade (presença ou não de corpo lúteo) e aplicação de 2,0 mg de benzoato de estradiol IM (Gonadiol®, Zoetis ou RIC-BE®, Agener União, Brasil) e inserção de um dispositivo intravaginal contendo progesterona (P4, Primer 1g, Agener União ou DIB 1g, Zoetis; Brasil). No D9 o dispositivo de P4 foi removido e administrou-se 0,5 mg de D-cloprostenol IM (Prolise, Agener União, Brasil) ou 12,5 mg de dinoprost trometamina IM (Lutalyse, Zoetis, Brasil), além de 1 mg de cipionato de estradiol IM (ECP, Zoetis, Brasil). A inseminação artificial (IA) foi realizada 48h após a retirada do dispositivo de P4. O diagnóstico de gestação foi realizado através de ultrassonografia 30 dias após a IA. As análises estatísticas foram feitas utilizando PROC GLIMMIX do programa SAS 9.3. O ECC médio foi de  $2,82 \pm 0,05$ , a taxa de ciclicidade no início do protocolo foi de 44,4%, e a prenhez por IA (P/IA) foi de 51,5%. A porcentagem de vacas cíclicas foi superior nas com ECC  $>3,5$  (85,8%) em comparação com os demais grupos ( $<2,5=16,5\%$ ;  $2,5-3,5=60,9\%$ ;  $P<0,0001$ ). A P/IA foi superior em fêmeas com ECC superior a 2,5 ( $<2,5=36,9\%$ ;  $2,5-3,5=61,7\%$ ;  $>3,5=63,3\%$ ) ( $P<0,0001$ ). Comparando as categorias animais, a proporção de vacas cíclicas foi superior para fêmeas multíparas (91,3%) que núlparas (89,6%), ou primíparas (81%) ( $P<0,0001$ ) quando o escore foi  $>3,5$ . Quando o

ECC se situou entre 2.5-3.5, a ciclicidade para nulíparas foi maior (67%) que primíparas (55.7%) ou múltíparas (64.3%) ( $P<0.0001$ ). A ciclicidade de fêmeas com ECC<2.5 não diferiu entre as categorias (nulíparas=17%; primíparas=14%; múltíparas=30,5%). A P/IA foi menor nas fêmeas com ECC <2.5 (nulíparas=51.7%; primíparas=31,2%; múltíparas=41,1%;  $P=0.0004$ ) comparado às fêmeas com ECC de 2.5-3.5 (nulíparas=56.7%; primíparas=59.7%; múltíparas=65.4%; ( $P=0,002$ ). E, por fim, as fêmeas com ECC maior que 3.5 obtiveram P/IA similar entre as categorias (nulíparas=56.2%; primíparas=62.2%; múltíparas=68.5%), porém superior que os demais grupos de ECC. Deste modo, conclui-se que há relação positiva entre o escore de condição corporal, a proporção de vacas cíclicas e a P/IA.

**Palavras-chave:** IATF; *Bos taurus taurus*; ciclicidade

SBTE 046 IATF, TETF e IA

Número de submissão 1616

**Efeito da administração de PGF2 $\alpha$  no início do protocolo de IATF e do dispositivo intravaginal de progesterona (Fertilcare 600<sup>®</sup>) em novilhas da raça nelore (*Bos indicus*)**

Alessandra Ambrósio Teixeira<sup>1</sup>; Lais Mendes Vieira<sup>1</sup>; Rodolfo Daniel Mingoti<sup>1</sup>; Romulo Germano Rezende<sup>1</sup>; Jessica Cristina Lemos Motta<sup>1</sup>; Renato Wihby Giroto<sup>2</sup>; Pietro Sampaio Baruselli<sup>1</sup>

1.Departamento de Reprodução Animal, VRA-FMVZ-USP, São Paulo, SP, Brasil; 2.RG Genética, Água Boa, MT, Brasil.

Os objetivos do presente estudo foram avaliar o efeito da administração de PGF2 $\alpha$  no início do protocolo de IATF, e do dispositivo intravaginal de progesterona (Fertilcare 600<sup>®</sup>) em comparação ao implante auricular de Norgestomet (CRESTAR<sup>®</sup>) sobre a taxa de concepção de novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*). Foram utilizadas 415 novilhas Nelore cíclicas com escore de condição corporal de 3,0 $\pm$ 0,3 (escala de 1 a 5) distribuídas homogeneamente em três grupos experimentais: G-CRESTAR (n=146); G-P4 (n=133) e G-P4-PGFD0 (n=136). As fêmeas do G-CRESTAR receberam no D0 um implante auricular de Norgestomet (Crestar<sup>®</sup>, MSD) e 2,0mg de benzoato de estradiol (BE; Gonadiol<sup>®</sup>, MSD). No D8 o implante foi removido e administrou-se 0,265mg de PGF2 $\alpha$  (Ciosin<sup>®</sup>, MSD), 300 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG; Folligon<sup>®</sup>, MSD) e 1,0mg de cipionato de estradiol (CE; ECP<sup>®</sup>, Zoetis). As novilhas do G-P4 e G-P4-PGFD0 foram submetidas ao protocolo de IATF com dispositivo intravaginal contendo 0,6g de P4 (Fertilcare 600<sup>®</sup>, Vallée S.A.) e 2,0mg de BE (Gonadiol<sup>®</sup>, MSD) no dia 0. Ainda, as fêmeas do G-P4-PGFD0 receberam nesse momento 0,265mg de PGF2 $\alpha$  (Ciosin<sup>®</sup>, MSD). No D8, todos os grupos receberam o mesmo tratamento [0,265mg de PGF2 $\alpha$  (Ciosin<sup>®</sup>, MSD), 300 UI de eCG (Folligon<sup>®</sup>, MSD) e 1,0mg de CE (ECP<sup>®</sup>, Zoetis), juntamente com a remoção do dispositivo intravaginal de P4. Todos os grupos foram inseminados 48 horas após o a retirada do dispositivo com uma única partida de sêmen do mesmo touro. O diagnóstico de gestação foi realizado por ultrassonografia 50 dias após a IATF. Os dados foram analisados com o Proc GLIMMIX 9.3 do SAS. Não houve diferença entre os grupos na taxa de concepção [G-CRESTAR = 48.0% (70/146); G-P4 = 45.1% (60/133); G-P4-PGFD0 = 50.0% (68/136);  $P = 0,72$ ]. Portanto, a administração de PGF2 $\alpha$  no início do protocolo de IATF não teve efeito sobre a taxa de concepção. Além disso, a fertilidade foi similar em novilhas Nelore recebendo os diferentes dispositivos.

**Palavras-chave:** PGF2 $\alpha$ ; *Bos indicus*

SBTE 047 IATF, TETF e IA

Número de submissão 1619

**Taxa de prenhez de vacas nelore sincronizadas com dispositivos de progesterona ou implantes de progestágeno novos ou usados por oito ou nove dias**

João Paulo Barbuio<sup>1</sup>; Renato Wihby Giroto<sup>2</sup>; Márcio de Oliveira Marques<sup>3</sup>; Luciano Penteadó<sup>4</sup>; Romulo Germano Rezende<sup>5</sup>; Rodolfo Daniel Mingoti<sup>5</sup>; Lais Mendes Vieira<sup>5</sup>; Marcos Henrique Alcantara Colli<sup>5</sup>; Pietro Sampaio Baruselli<sup>5</sup>

1.MSD, Saúde Animal, São Paulo, SP, Brasil; 2.RG Genética Avançada, Água Boa, MT, Brasil; 3.Geraembryo Assessoria e Consultoria Pecuária, Cornélio Procópio, PR, Brasil; 4.Firmasa, Londrina, PR, Brasil; 5.Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a taxa de prenhez de vacas Nelore lactantes (*Bos indicus*) utilizando dispositivo intravaginal de progesterona (FertilCare<sup>®</sup>) ou implante auricular contendo progestágeno (Crestar<sup>®</sup>) novos ou previamente usados por 8 dias em protocolos de IATF com 8 ou 9 dias de permanência do dispositivo. Foram realizados 3 experimentos, utilizando um total de 824 vacas múltíparas lactantes com 30 a 45 dias pós-parto e com escore de condição corporal médio de 2,9 $\pm$ 0,2. Em todos os experimentos, no Dia -1 e Dia 0 do protocolo, os animais receberam 2,0 mg de BE i.m. (FertilCare Sincronização<sup>®</sup>, Vallée, Brasil) associado ao dispositivo de progesterona ou implante contendo progestágeno de acordo com: Experimento 1, 313 vacas lactantes receberam um dispositivo de progesterona novo (FertilCare 1200<sup>®</sup>, Vallée, Brasil); Experimento 2, 297 vacas lactantes que receberam um implante auricular novo contendo progestágeno (Crestar<sup>®</sup>, MSD Saúde Animal, Brasil); Experimento 3, 214 vacas receberam um implante auricular contendo progestágeno (Crestar<sup>®</sup>, MSD Saúde Animal, Brasil) usado previamente por 8 dias. Em cada experimento os animais foram divididos em 2 grupos de acordo com a permanência do dispositivo de progesterona (P4) ou do implante contendo progestágeno (Pr): Exp1\*P4-8D e Exp1\*P4-9D; Exp2\*PrNovo-8D e Exp2\*PrNovo-9D; e Exp3\*PrUsado-8D e Exp3\*PrUsado-9D. No D8 foi realizado a retirada dos dispositivos/implantes, associado aos tratamentos de 0,530 mg de PGF i.m. (Ciosin<sup>®</sup>, MSD Saúde Animal,

Brasil), 1,0 mg de CE i.m. (E.C.P<sup>®</sup>, Zoetis, Brasil) e 300 UI de eCG i.m. (Folligon<sup>®</sup>, MSD, Saúde Animal, Brasil). A IATF foi realizada 48 horas após a remoção dos dispositivos (D10) em todos os experimentos. O diagnóstico de gestação foi realizado por ultrassonografia (Mindray, DP2200vet, Brasil) 30 dias após IATF. Os dados foram analisados pelo PROC GLIMMIX do SAS (SAS<sup>®</sup> 9.3 Institute Inc., Cary, NC, USA, 2003). No experimento 1, não foi observada diferença do tempo de permanência do dispositivo intravaginal de P4 na taxa de prenhez [Exp1\*P4-8D = 56% (87/156) vs. Exp1\*P4-9D = 56% (88/157); P = 0,96]. No experimento 2, o tempo de permanência do implante de progestágeno Novo não influenciou a taxa de prenhez [Exp2\*PrNovo8D = 60% (87/146) e Exp2\*PrNovo9D = 63% (95/151); P = 0,59]. No experimento 3, não foi verificada diferença do tempo de permanência do implante de progestágeno Usado na taxa de prenhez [Exp3\*PrUsado8D = 47% (50/107) e Exp3\*PrUsado9D = 43% (46/107); P>0,05]. Os dados desses experimentos são indicativos de que semelhantes taxas de prenhez à IATF são verificadas em vacas Nelore sincronizadas por 8 ou 9 dias com dispositivos/implantes contendo progesterona ou progestágenos.

Agradecimentos: RG Genética Avançada, Geraembryo, Firmasa e MSD Saúde Animal

**Palavras-chave:** IATF; progesterona/progestágeno; vacas de corte

SBTE 048 IATF, TETF e IA

Número de submissão 1621

**Gonodotrofina coriônica equina (eCG) na IATF em bovinos de corte: estudo retrospectivo**

Janislene Mach Trentin<sup>1</sup>; Ricardo Olimpio Schenatto<sup>1</sup>; Laurence Boligon De Araujo<sup>2</sup>; Mariani Farias Fiorenza<sup>1</sup>; Aline Policarpo Baioco<sup>2</sup>; Trajano Gomes Jacques<sup>2</sup>; Julia Brum Spreckelsen Casarin<sup>2</sup>; Ana Paula Martini<sup>2</sup>; Gilson Antonio Pessoa<sup>1</sup>; Mara Iolanda Batistella Rubin<sup>2</sup>

1.UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil; 2.UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

Diferentes doses de eCG (0, 300UI e 400UI) administradas em vacas de corte lactantes foram avaliadas sobre a prenhez por inseminação artificial (P/IA) e ocorrência de estro. Os dados obtidos de 5590 IATFs em 2788 fêmeas multíparas e 2802 fêmeas primíparas provém do período 2012 a 2015 de 3 fazendas do RS. O protocolo consistiu na aplicação de 2,0mg de benzoato de estradiol (Gonadiol<sup>®</sup>, Zoetis ou RIC-BE<sup>®</sup>, Agener União, Brasil) via IM e um dispositivo intravaginal de progesterona (P4; Primer 1g, Agener União ou DIB 1g, Zoetis; Brasil) no primeiro dia do protocolo (D0). Após 9d (D9), o dispositivo de P4 foi removido aplicando-se 0,5mg de D-cloprostenol via IM (Prolise, Agener União, Brasil) ou 12,5mg de dinoprost trometamina (Lutalyse, Zoetis, Brasil) e 1mg de cipionato de estradiol (ECP, Zoetis, Brasil) IM. As fêmeas de cada lote/fazenda foram classificadas por escore de condição corporal (ECC, 1=magra a 5=obesa) no D0 e distribuídas em grupos: controle (sem eCG, n=2239), 300UI (n=1689) e 400UI (n=1662). A IA foi realizada 48h após a retirada da P4 em todas as fêmeas. A base da cauda de 5084 vacas [n=1913(controle), n=1584(300UI) e n=1587(400UI)] foi pintada com tinta de bastão marcador (Raidl-Maxi, Dettingen/Erms, Alemanha) para identificar a ocorrência de estro. Fêmeas sem tinta no momento da IATF foram consideradas em estro. O diagnóstico de gestação foi efetuado por ultrassonografia 30d após IA e o ECC foi registrado. Para análise estatística utilizou-se PROC GLIMMIX do SAS<sup>®</sup> 9.3. Observou-se equidade estatística entre fontes de estrógeno, P4 ou agente luteolítico. A ocorrência de cio no controle, 300UI e 400UI foi 48,8% (933/1913), 73,8% (1169/1584) e 76,4% (1212/1587) (P < 0.0001). A maior P/IA (P<0.0001) detectou-se nas vacas que exibiram cio até o momento da IA (64,2%, 2129/3314) confrontada com as que não exibiram cio (51,3%, 601/1170). As primíparas apresentaram menor P/IA (41,8%, 1175/2802; P=0.003) comparadas às multíparas (53,9%, 1505/2788). Nas primíparas observou-se menor P/IA no controle (35%, 614/1756) e com 300UI (46,4% 228/491), comparado as fêmeas tratadas com 400UI (60,0%, 333/555) (P < 0.0001). Nas multíparas a P/IA foi inferior (P < 0.0001) no controle (43,7%, 211/483) confrontado a 300UI (53,5%, 641/1198) e 400UI (58,9%, 653/1107) que foram similares. A P/IA de todas fêmeas foi inferior no controle (P < 0,0001) (36,8%, 825/2239) comparado a 300UI (51,4%, 869/1689) ou 400UI (59,3%, 986/1662). A prenhez para ECC<2,5 foi inferior no controle (P=0,0001) (28,2%, 223/790) comparado a 300UI (36,5%, 287/786) ou 400UI (45,0%, 359/797). Já as vacas com ECC 2,5-3,5 também tiveram menor P/IA (P=0,0002) no controle (42,9%, 426/993), confrontadas a 300UI (54,5%, 404/741) e 400UI (63,5%, 475/748). No ECC>3,75, a P/IA foi similar entre o controle (67,7%, 308/456), 300UI (69,7%, 119/162) e 400UI (67,5%, 79/117). Atribui-se ao eCG o aumento da expressão de estro e taxa de P/IA em vacas taurinas lactantes. Já a dose de 300 ou 400UI foi similar nas vacas com ECC 2,5-3,5.

**Palavras-chave:** Bovino; inseminação artificial em tempo fixo; reprodução

SBTE 049 IATF, TETF e IA

Número de submissão 1626

**Pré-sincronização com folículo persistente em protocolos de sincronização da ovulação a base de GnRH e PGF em vacas de leite em lactação**

Luiz Augusto Capellari Leite da Silva; Ingris Yohana Hernández Martínez; Luiz Manoel Souza Simões; Miguel Pizzolante Bottino; Gabriela Santos; Thomaz Teixeira De Almeida; Ana Paula Castro; José Nélío de Sousa Sales

Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a pré-sincronização utilizando dispositivo de progesterona para indução de folículo dominante persistente em protocolos de IATF que utilizam GnRH e prostaglandina como base em vacas leiteiras em lactação. No experimento, 344 vacas Girolanda em lactação com  $2,7 \pm 0,1$  partos,  $57,3 \pm 0,8$  dias pós-parto variando de 30 a 96 dias, e escore de condição corporal  $\geq 2$  (escala de 1 a 5) foram distribuídas aleatoriamente em um de dois grupos. No grupo Double-Ov (n=178), as vacas foram submetidas à administração de 100mg de GnRH i.m. (Cystorelin®, Merial, Brasil) no D-17, 500µg de Cloprostenol i.m. (Sincrocio®, Ouro Fino, Brasil) 7 dias depois (D-10) e 100mg de GnRH i.m. 3 dias mais tarde (D-7) seguido pelo protocolo Ovsynch (GnRH no D0, PGF no D7, GnRH no D9) 7 dias depois (D0). No Grupo P4-Ov (n=171), as vacas receberam no D-10 um dispositivo intravaginal de progesterona novo (Sincrogest®, Ouro Fino, Brasil). Dez dias depois (D0) iniciou-se o protocolo Ovsynch, sendo a retirada do dispositivo de progesterona feita no D7. Todas as vacas do experimento foram inseminadas 16 horas após a segunda dose de GnRH do protocolo Ovsynch. Em um subgrupo de animais (n=56) foram realizadas avaliações ultrassonográficas nos dias 0 e 10 para avaliar o diâmetro folicular e nos dias 7 e 24 para avaliar a taxa de ovulação. Além disso, em todos os animais do estudo foram realizados exames ultrassonográficos aos 30 e 60 dias após a inseminação artificial (IA) para composição da taxa de prenhez e da perda embrionária. A análise estatística foi realizada utilizando o procedimento GLIMMIX do SAS. No estudo, não houve ( $P>0,05$ ) efeito de escore de condição corporal, dias pós-parto ou ordem de lactação para as variáveis de fertilidade. Além disso, não foram observadas diferenças entre os grupos para as variáveis taxa de pré-sincronização [presença de folículo com mais de 12mm no D0; (Double-Ov 89,3% (25/28) e P4-Ov 85,7% (24/28;  $P=0,69$ )], presença de CL no D0 [Double-Ov 53,5% (15/28) e P4-Ov 32,1% (9/28;  $P=0,11$ )], diâmetro folicular no 1º GnRH [Double-Ov  $16,0 \pm 0,97$ mm e P4-Ov  $18,4 \pm 1,26$ mm ( $P=0,28$ )], taxa de ovulação ao 1º GnRH [Double-Ov 82,1% (23/28) e P4-Ov 78,5% (22/28;  $P=0,32$ )], diâmetro folicular no 2º GnRH [Double-Ov  $15,7 \pm 0,92$ mm e P4-Ov  $17,9 \pm 0,67$ mm ( $P=0,06$ )], taxa de ovulação no 2º GnRH [Double-Ov 92,8% (26/28) e P4-Ov 96,4% (27/28;  $P=0,56$ )] e diâmetro do CL no D24 [Double-Ov  $25,6 \pm 1,69$ mm e P4-Ov  $28,8 \pm 1,37$ mm ( $P=0,13$ )]. Não houve diferença entre os grupos na taxa de prenhez aos 30 [Double-Ov 39,3% (70/178) e P4-Ov 41,6% (69/166) ( $P=0,67$ )] e 60 dias de gestação [Double-Ov 35,9% (64/178) e P4-Ov 39,8% (66/166) ( $P=0,47$ )] e perda gestacional entre 30 e 60 dias de gestação [Double-Ov 8,6% (6/70) e P4-Ov 4,4% (3/69) ( $P=0,32$ )]. Dessa forma, concluiu-se que a pré-sincronização com dispositivo de progesterona apresenta eficiência semelhante ao protocolo Double Ovsynch na sincronização da ovulação e na fertilidade de vacas de leite em lactação.

**Palavras-chave:** Pré-sincronização; progesterona; ovsynch

SBTE 050 IATF, TETF e IA

Número de submissão 1630

**Dinâmica folicular de novilhas nelore submetidas a ressincronização da ovulação com acetato de lecirrelina**

Thales Ricardo Rigo Barreiros<sup>1</sup>; Carla Rossi Laurini<sup>1</sup>; Felipe Pereira Vianna<sup>2</sup>; Luiz Aguinaldo Ricetto Pegorari Júnior<sup>1</sup>; José Carlos Arevalo Junior<sup>1</sup>; Myrian Megumy Tsunokawa Hidalgo<sup>1</sup>; Henrique Goulart Ribeiro de Mendonça<sup>3</sup>; Wanessa Blaschi<sup>1</sup>

1. Universidade Estadual do Norte do Paraná, Bandeirantes, PR, Brasil; 2. Agener União, São Paulo, SP, Brasil; 3. In Vitro Brasil, Mogi Mirim, SP, Brasil.

O objetivo do presente trabalho foi analisar a dinâmica folicular de novilhas tratadas com acetato de lecirrelina para ressincronização da ovulação. Foram utilizadas 40 novilhas da raça Nelore, cíclicas, com ECC entre 3 e 4 (escala de 1 a 5) de 22 a 24 meses de idade e 240 a 260 kg de peso vivo. As novilhas foram previamente tratadas com dispositivo intravaginal contendo 1g de progesterona (Primer®, Tecnopec, Brasil) e 2mg de benzoato de estradiol (BE); (Ric-BE®, Tecnopec, Brasil) por via intramuscular (IM); (D-10). Oito dias depois (D-2), os animais receberam 500 µg cloprostenol sódico (Estron®, Tecnopec, Brasil), 10 mg de FSHp (Folltropin®, Bioniche, Canadá) e 1mg BE, por via IM. Dez dias depois (D0), 85% (34/40) das novilhas apresentaram corpo lúteo (CL) após exame de ultrassonografia transretal dos ovários (Myndray, 7,5 Mhz, China). Os animais foram divididos em dois grupos experimentais: grupo GnRH (G-GnRH, n=17) e grupo controle (G-C, n=17), que respectivamente receberam ou não uma aplicação IM de 25µg de acetato de lecirrelina (Gestran Plus, ARSA, Argentina). Todos os animais foram submetidos à ultrassonografia transretal seriada a cada 12 horas, nos próximos três dias para avaliação da emergência da onda folicular. Quatorze dias depois (D14) todos os animais receberam 25µg, IM, de acetato de lecirrelina e foram submetidos a ultrassonografia transretal seriada a cada 24 horas até a ocorrência de ovulação. Todos os animais foram examinados novamente, sete dias mais tarde (D21), para verificar a presença e as dimensões do CL. Os dados foram analisados pelo teste t-Student ( $p<0,05$ ). Não houve diferença ( $p=0,93$ ) no diâmetro do folículo dominante no D0 (G-GnRH:  $9,2 \pm 1,2$  vs. G-C:  $9,0 \pm 1,3$  mm). O período para emergência da onda folicular após a primeira aplicação do acetato de lecirrelina foi menor ( $p=0,04$ ) no G-GnRH em relação ao G-C ( $1,9 \pm 1,4$  vs.  $1,5 \pm 0,4$  dias). A taxa de ovulação e aproveitamento foi semelhante ( $p=0,72$ ) entre os grupos (G-C: 58,8% 10/17; G-GnRH: 70,5%, 12/17). O tamanho do CL foi semelhante ( $p=0,14$ ) entre os grupos (G-GnRH:  $16,9 \pm 4,4$  vs. G-C:  $14,4 \pm 2,8$  mm). Em conclusão, os resultados apresentam aspectos promissores na ressincronização para TETF com duas aplicações de acetato de lecirrelina.

**Palavras-chave:** GnRH; ovulação; embrião

SBTE 051 IATF, TETF e IA

Número de Submissão 1634

**Eficiência da ressincronização da ovulação com uma ou duas aplicações de acetato de lecirelina em vacas nelore submetidas à TETF**

Wanessa Blaschi<sup>1</sup>; Carla Rossi Laurini<sup>1</sup>; Luiz Aguinaldo Ricetto Pegorari Júnior<sup>1</sup>; José Carlos Arevalo Junior<sup>1</sup>; Felipe Pereira Vianna<sup>2</sup>; Anna Raquel Grimas Almeida<sup>1</sup>; Luiz Fernando Garro Monteiro<sup>3</sup>; Douglas Gaitkoski<sup>3</sup>; Thales Ricardo Rigo Barreiros<sup>1</sup>

1.Universidade Estadual do Norte do Paraná, Campus Bandeirantes, Bandeirantes, PR, Brasil, 2.Agener União, São Paulo, SP, Brasil, 3.In Vitro Brasil, Mogi Mirim, SP, Brasil.

O objetivo do presente trabalho foi comparar a eficiência da ressincronização da ovulação com uma ou duas aplicações de acetato de lecirelina. Foram utilizadas 208 vacas da raça Nelore, com 45 a 60 dias pós-parto, com ECC entre 2,75 e 3,25 (escala de 1 a 5). As vacas foram tratadas com dispositivo intravaginal contendo 1,9g de progesterona (CIDR®, Zoetis, Brasil) e 2mg de benzoato de estradiol (Gonadiol®, Zoetis, Brasil) por via intramuscular (IM); (D-18). Nove dias depois, os animais receberam 12,5mg dinaprost (Lutalyse®, Zoetis, Brasil), 300 UI eCG (Novormon®, Zoetis, Brasil) e 1mg cipionato de estradiol (E.C.P®, Zoetis, Brasil); (D-9), por via IM. A TETF foi realizada nas vacas com CL, 18 dias após o início da sincronização com embriões produzidos in vitro (D0). Simultaneamente a TETF, as vacas foram divididas em dois grupos experimentais: grupo GnRH (G-GnRH, n=108) e grupo controle (G-C, n=100), que respectivamente receberam ou não uma aplicação IM de 25µg de acetato de lecirrelina (Gestran Plus, ARSA, Argentina). Quatorze dias depois (D14), todas as vacas foram submetidas a exame de ultrassonografia transretal dos ovários (Myndray, 7,5 Mhz, China) para mensuração do maior folículo e receberam 25µg, IM, de acetato de lecirrelina para ressincronização da ovulação. Sete dias depois (D21), foi realizado o diagnóstico de gestação e as vacas não gestantes e com CL foram submetidas a nova TETF. O diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias depois (D51). Os dados foram analisados pelo teste do Qui-Quadrado e teste t-Student (p<0,05). A taxa de sincronização no D0 foi semelhante (p=0,72) entre os grupos [G-GnRH: 79,6% (86/108); G-C: 84% (84/100)]. As taxas de concepção (D21) no G-GnRH e G-C foram 57% (49/86) e 52,3% (44/84); (p=0,95), respectivamente. A taxa de prenhez (D21) também foi semelhante entre os grupos [G-GnRH: 45,3% (49/108); G-C: 44,0% (44/100); (p=0,38)]. Houve diferença (p<0,01) no diâmetro do folículo dominante no D14 (G-GnRH: 12,3±1,8 vs. G-C: 10,5±1,6 mm). A taxa de ressincronização no D21 foi semelhante (p=0,62) entre os grupos [(G-GnRH: 67,7 (40/59) vs. G-C: 76,7%; (43/56)]. As taxas de concepção (D51) no G-GnRH e G-C foram 42,5% (17/40) e 34,8% (15/43); (p=0,97), respectivamente. A taxa de prenhez (D51) também foi semelhante entre os grupos [G-GnRH: 28,8% (17/59) vs. G-C: 26,7%; (15/56); (p=0,93)]. As taxas de prenhez acumuladas nos grupos foram G-GnRH: 61,1% (66/108) e G-C: 59% (59/100); (p=0,86). Em conclusão, a associação da sincronização com P4 e acetato de uso lecirelina 14 dias após primeira TETF permitiu duas transferências de embrião em 21 dias de estação de monta. A taxa de ressincronização não aumentou com o uso de duas aplicações de acetato de lecirelina. Nós consideramos os resultados promissores, pois houve tamanho do folículo na ressincronização.

**Palavras-chave:** embrião; GnRH; ovulação

SBTE 052 IATF, TETF e IA

Número de Submissão 1636

**Taxa de parição em suínos após duas inseminações intra ou pós cervical com diferentes intervalos**

Andrea Francisca Araujo; Lucas Daichoum Pais de Oliveira; Vitor Lemes Silva; Jeferson Corrêa Ribeiro; Andréia Santos Cezário; Wallacy Barbacena Rosa dos Santos; Eliandra Maria Bianchini Oliveira; Aline Sousa Camargos

IF Goiano, Campus Morrinhos, Morrinhos, GO, Brasil.

Este estudo objetivou comparar o efeito da inseminação artificial (IA) intra e pós-cervical na eficiência reprodutiva de suínos, avaliando-se a taxa de parição. Para a coleta do sêmen, três cachacos foram utilizados alternadamente e o ejaculado avaliado no laboratório de sêmen. Para a inseminação foram utilizados ejaculados apenas refrigerados com aparência normal e motilidade maior que 70%. As doses homospermicas apresentavam concentração de 3 bilhões de espermatozoides e volume (80 mL) padronizado e receberam a adição do mesmo diluente industrializado (MRA longa conservação, Consuitem, Paulínia, Brasil). A detecção do estro nas fêmeas foi realizada pela presença do cachaço duas vezes ao dia. A inseminação das fêmeas foi realizada em dois dias: intracervical (convencional) e pós-cervical. Animais com duas a cinco partições foram distribuídos aleatoriamente em três grupos de tratamento, de acordo com o tipo e o intervalo entre IAs: IC (n = 122) - IA intracervical 12 e 24 horas após detecção do estro; PC12 (n = 121) - IA pós-cervical após 12 e 24 horas após detecção de estro; e PC24 (n = 121) - IA pós-cervical 12 e 36 horas após detecção do estro. Gestações foram confirmadas pelo não retorno ao estro e por parição ao final da gestação. Para análise estatística os dados foram submetidos ao ANOVA, considerando a taxa de parição, número de partições, macho, interação entre taxa de parição x número de partos x macho. Médias de cada grupo foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis (SAS, 2008) com um nível de significância de 5%. Não houve efeito do número de partições e do macho utilizado. As taxas de parição observadas neste estudo foram: IC 89,95%, PC12 97,40% e PC24 95,60%. Os três grupos diferiram significativamente (p<0,05), sendo que a AI convencional (IC) apresentou a taxa de parição mais baixa e a IA PC12 a taxa mais alta. Ambos os protocolos de IA pós-cervical deste estudo foram superiores à IA intracervical. A eficiência da inseminação pós-cervical consiste na redução

da perda do esperma por refluxo ou fagocitose, devido ao caminho mais curto percorrido pela célula espermática à tuba uterina e devido à transposição mecânica da cérvix, a maior barreira mecânica para o trânsito dos espermatozoides. Em relação aos intervalos entre inseminações, observou-se que um intervalo de 24h foi muito longo, provavelmente comprometendo a disponibilidade de espermatozoides viáveis na tuba uterina para fertilização. Apesar dos resultados deste estudo, alguns autores afirmam que comparando-se os dados reprodutivos das IAs intra- e pós-cervicais alguns aspectos não são significativamente diferentes, indicando que a IA pós-cervical pode não ter efeito no potencial de fertilidade da fêmea. Pode haver fatores como a escolha da matriz, a viabilidade espermática e o ambiente podem afetar a inseminação artificial intracervical em fêmeas. Em relação à técnica, a IA pós-cervical apresentou maiores taxas de parição em relação à intracervical. Em relação ao intervalo entre inseminações, duas IAs com intervalo de 12 h foi considerado o melhor protocolo, com maior taxa de parição.

**Palavras-chave:** Inseminação artificial, porcas, gestação

SBTE 053 IATF, TETF e IA

Número de Submissão 1637

**Taxa de prenhez à IATF de novilhas cruzadas (*Bos taurus* x *Bos indicus*) submetidas ao protocolo de 3 ou 4 manejos**

Marcos Henrique Alcantara Colli<sup>1</sup>; Rafael Pardini Abreu Carvalhaes<sup>2</sup>; Rodolfo Daniel Mingoti<sup>1</sup>; Lais Mendes Vieira<sup>1</sup>; Romulo Germano Rezende<sup>1</sup>; Marcelo Henrique Santos<sup>2</sup>; José Nélío de Sousa Sales<sup>3</sup>; Pietro Sampaio Baruselli<sup>1</sup>

1.Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil; 2.RPZ Assessoria, Sinop, MT, Brasil; 3.Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a taxa de prenhez em novilhas cruzadas (Nelore x Aberdeen Angus) utilizando protocolos de sincronização da ovulação com três (Dia 0, Dia 8 e Dia 10) ou quatro (Dia -1, Dia 6, Dia 8 e Dia 10) manejos. Um total de 367 nulíparas com idade entre 14 e 16 meses, provenientes de uma fazenda localizada no município de Nova Mutum/MT, foram homogeneamente distribuídas de acordo com escore de condição corporal (Grupo 3 manejos =  $3,75 \pm 0,37$ ; Grupo 4 manejos =  $3,83 \pm 0,40$ ) e pela presença de corpo lúteo no início do protocolo (Ciclicidade; Grupo 3 manejos = 40,6% (78/192); Grupo 4 manejos = 44% (77/175). No grupo 3 manejos, no início do protocolo de IATF (Dia 0), os animais receberam 2,0 mg de BE i.m. (Gonadiol<sup>®</sup>, Zoetis, Brasil) associado ao tratamento com 12,5 mg de PGF2 $\alpha$  i.m. (Lutalyse<sup>®</sup>, Zoetis, Brasil) e a inserção de um dispositivo intravaginal de P4 usado previamente por 16 dias (CIDR<sup>®</sup>, Zoetis, Brasil). No Dia 8 foi efetuada a retirada dos dispositivos de P4 associado ao tratamento de 12,5 mg de PGF2 $\alpha$  i.m., 1,0 mg de CE i.m. (E.C.P<sup>®</sup>, Zoetis, Brasil) e 300 UI de eCG i.m. No grupo de 4 manejos no Dia -1 os animais receberam 2,0 mg de BE i.m. e inserção de um dispositivo intravaginal de P4 previamente utilizado por 16 dias (CIDR<sup>®</sup>, Zoetis, Brasil). No Dia 6, as novilhas receberam 12,5 mg de PGF2 $\alpha$  i.m. (Lutalyse<sup>®</sup>, Zoetis, Brasil). No Dia 8 os animais receberam 1,0 mg de CE i.m. (E.C.P<sup>®</sup>, Zoetis, Brasil) associado ao tratamento com 300 UI de eCG i.m. (Novormon<sup>®</sup>, Zoetis, Brasil) e o dispositivo de P4 foi removido. Em ambos os grupos a IATF foi realizada 48 h após a remoção do dispositivo de P4 (Dia 10) pelo mesmo inseminador utilizando um único touro e uma única partida de sêmen. O diagnóstico de gestação foi realizado por ultrassonografia 30 dias após a IATF (Mindray, DP2200vet, Brasil). Os dados foram analisados pelo PROC GLIMMIX do SAS (SAS<sup>®</sup> 9.3 Institute Inc., Cary, NC, USA, 2003). Não houve interação entre número de manejos e ciclicidade sobre a taxa de prenhez [protocolo de 3 manejos\*ComCL=56,4% (44/78) vs. 4manejos\*ComCL=61,0% (47/77); protocolo de 3 manejos\*SemCL=57,9% (66/114) vs. 4manejos\*SemCL=54,1% (53/98); P=0,45]. Não foi observada diferença do número de manejos sobre a taxa de prenhez [protocolo de 3 Manejos = 57,3% (110/192) vs. 4 Manejos = 57,1% (100/175); P=0,93]. Não foi observada diferença da ciclicidade sobre a taxa de prenhez [Com CL=58,7% (91/155) e Sem CL=56,1% (119/212); P=0,63]. Desta forma, é possível obter semelhantes taxas de prenhez em novilhas cruzadas (Nelore x Aberdeen Angus) submetidas a protocolos de IATF independentemente do número de manejos empregados [(3 manejos com PGF no D0 e D8) ou (4 manejos com PGF no D6)] de acordo com a permanência do dispositivo de P4 por oito ou nove dias, respectivamente.

Agradecimentos: RPZ Assessoria, Mafra Agropecuária S/A e Zoetis.

**Palavras-chave:** Novilhas de corte; corpo lúteo; IATF

SBTE 054 IATF, TETF e IA

Número de Submissão 1638

**Taxa de parição em suínos appis 1, 2 ou 3 inseminações**

Lucas Daichoum Pais de Oliveira; Andrea Francisca Araujo; Vitor Lemes Silva; Jeferson Corrêa Ribeiro; Andréia Santos Cezário; Wallacy Barbacena Rosa dos Santos; Eliandra Maria Bianchini Oliveira; Aline Sousa Camargos

IF Goiano Campus Morrinhos, Morrinhos, GO, Brasil.

Algumas fazendas brasileiras têm opiniões controversas sobre o protocolo mais apropriado para inseminação artificial (IA) intracervical em suínos. Cada região adota um protocolo diferente. A maioria dos fazendeiros utiliza o protocolo de 2 IAs com intervalo de 12 h. Entretanto, algumas fazendas utilizam apenas uma IA e outras três com o mesmo intervalo. Este experimento objetivou comparar os efeitos de uma, duas ou três IAs sobre a eficiência reprodutiva de suínos avaliando-se a taxa de parição e o número de leitões por leitegada. Este experimento foi conduzido na fazenda comercial Gameleira,



localizada em Lagoa Dourada - MG, mesoregião Campo das Vertentes durante o ano de 2014. A cidade apresenta a latitude S 20°54'52" e longitude W 44°04'42" e está situada em uma região montanhosa (70%) com clima tropical, caracterizado por verões quentes e úmidos e temperatura média anual de 19,3°C. In Neste experimento, 340 em idade reprodutiva, apresentando estros regulares e sem histórico de doenças foram selecionadas. Para a coleta de sêmen foram utilizados três machos alternadamente e o ejaculado foi avaliado em laboratório. Para a IA foram utilizados sêmens refrigerados, de aparência normal e motilidade melhor que 70%. As doses tiveram sua concentração espermática padronizada para 3 bilhões de espermatozoides por dose e o mesmo diluente industrial (MRA long conservation, Consuítex, Paulínia, Brasil) foi adicionado. As fêmeas em estro foram identificadas utilizando-se um macho duas vezes ao dia. As porcas foram distribuídas aleatoriamente em três grupos, de acordo com o número de IAs: C1 (n=120) – IA 12 h após detecção de estro; C2 (n=110) – IA 12 e 24 h após detecção de estro; e C3 (n=110) – IA 12, 24 e 36 h após detecção de estro. As prenhez foram confirmadas pelo não retorno ao estro e pelo parto ao final da gestação. Os partos foram monitorados. Para análise estatística a taxa de parição e número médio de leitões por leitegada em cada grupo foi submetido ao teste Kruskal-Wallis (SAS, 2008) com nível de significância de 5%. As taxas de parição observadas neste estudo foram: C1 80,00%, C2 88,89% e C3 90,91%. C1 diferiu significativamente ( $p < 0,05$ ) de C2 e C3, apresentando taxa de prenhez mais baixa. Este estudo mostra que repetições de IA com intervalos de 12-h oferece mais disponibilidade de espermatozoides viáveis na tuba uterina para fertilização. O número de inseminações não influenciou o número de leitões por leitegada (C1 11,20, C2 13,04 e C3 13,11,  $p > 0,05$ ). Em conclusão, aumentando-se o número de IAs para duas ou três dentro do intervalo de 12 h melhora a taxa de parição.

**Palavras-chave:** Artificial insemination; pig; parturition

SBTE 055 IATF, TETF e IA

Número de Submissão 1641

#### **Indução da ciclicidade em novilhas *Bos taurus* com acetato de melengestrol (MGA)**

Ana Paula Martini<sup>1</sup>; Carlos Eduardo Porciuncula Leonardi<sup>2</sup>; Laurence Boligon de Araujo<sup>1</sup>; Nayrema Maciel<sup>1</sup>; Taison Souza Balestrin<sup>1</sup>; Simone Callai Muller<sup>1</sup>; Izaias Claro junior<sup>3</sup>; Mara Iolanda Batistella Rubin<sup>1</sup>; Gilson Antonio Pessoa<sup>1</sup>

1.Laboratório de Embriologia Animal (Embryolab), DCGA, CCR, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil; 2.University of Saskatchewan, Saskatchewan, Canadá; 3.Zoetis Brasil, Campinas, SP, Brasil.

Neste estudo foi avaliado o efeito da pré-sincronização do estro com progesterona intravaginal (CIDR®, Zoetis, Brasil) ou acetato de melengestrol oral (MGA®Premix, Zoetis) sobre a indução da ciclicidade e reação vaginal em novilhas *Bos taurus*. Novilhas pré-púberes (n=245), Red e Aberdeen Angus, com 18 meses de idade e escore de condição corporal de  $2,74 \pm 0,04$  (1 a 5) foram distribuídas aleatoriamente em três grupos de pré-sincronização: MGA (n=84), uCIDR (n=83) e CONTROLE (n=78). Cada novilha do grupo MGA recebeu diariamente 2500 mg de MGA concomitante com sal mineral por 12 dias (D-26 ao D-14). No D-24, um CIDR (usado previamente por 8 dias) foi inserido nas fêmeas do grupo uCIDR, que permaneceu por 12 dias (D-24 ao D-12). No D-12, 0,6 mg de cipionato de estradiol (ECP®, Zoetis) foi aplicado via IM nos grupos MGA e uCIDR. As novilhas CONTROLE não receberam progesterona durante a pré-sincronização. No dia 0 (D0), as novilhas tiveram o útero e ovários avaliados com ultrassom quanto à ciclicidade, ou seja, presença de corpo lúteo. Após a avaliação ultrassonográfica, todas novilhas receberam protocolo de sincronização do estro com a administração de 2 mg de benzoato de estradiol IM (Gonadiol®, Zoetis) e introdução de um CIDR (usado previamente por 8 dias). No D7 foi administrado 12,5 mg de Dinoprost trometamina IM (Lutalyse®, Zoetis). A retirada do CIDR foi conduzida no D9, quando as novilhas receberam 0,6 mg de ECP e 200UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG, Novormon®, Zoetis). A IATF foi realizada no D11 (48h pós remoção do CIDR) e o diagnóstico de gestação no D41 (30 dias pós IA). Os dados foram analisados pelo Proc Means, Proc Freq e Proc GLIMMIX do programa estatístico SAS 9.3. A taxa de ciclicidade após a pré-sincronização foi superior nos grupos MGA (79,7%; 67/84) e uCIDR (74,7%; 62/83) que o CONTROLE (7,7%; 6/78) ( $P < 0,0001$ ). A taxa de demonstração de estro na pré-sincronização foi superior para o grupo MGA (89,2%; 75/84) em relação aos grupos uCIDR (78,3%; 65/83) e CONTROLE (3,8%; 3/78) ( $P < 0,0001$ ). Após a sincronização (D9), o número de novilhas em estro foi maior no grupo MGA (91,6%; 77/84) em comparação aos grupos uCIDR (74,7%; 62/83) e CONTROLE (57,7%; 45/78) ( $P = 0,0007$ ). Ao final da sincronização do estro (D9), o grupo uCIDR (16,9%; 14/83) apresentou maior número de novilhas acometidas por vaginite em comparação aos demais grupos (MGA=4,76%; 4/84 e CONTROLE=5,1%; 4/78) ( $P = 0,003$ ). A taxa de prenhez/IA foi superior nas novilhas tratadas com MGA (69,04%; 58/84;  $P = 0,002$ ), quando comparado ao uCIDR (50,6%; 42/83) e CONTROLE (34,6%; 27/78). Também, a taxa de prenhez ao final da estação reprodutiva foi superior nas novilhas MGA (81%; 68/84) em comparação às novilhas uCIDR (67,5%; 56/83) e CONTROLE (55,0%; 43/78) ( $P < 0,0001$ ). O tratamento com MGA na pré-sincronização propiciou maior ciclicidade e maior taxa de prenhez à IATF e ao final da estação reprodutiva em novilhas. Adicionalmente, o tratamento com MGA resultou em menores taxas de reação vaginal nas novilhas comparado ao emprego do CIDR usado na indução da ciclicidade.

Agradecimento: Fazenda Tapera-Uruguaiana/RS, Zoetis, Capes.

**Palavras-chave:** Bovino; IATF; prenhez

SBTE 056 IATF, TETF e IA  
Número de Submissão 1644

**Avaliação morfofuncional do corpo lúteo e utilização da ultrassonografia Doppler como ferramenta para predição de gestação 20 dias pós IATF em vacas mestiças**

Alexandra Soares Rodrigues<sup>1</sup>; Mariana Alves de Andrade Silva<sup>2</sup>; Tiago Oliveira Brandão<sup>2</sup>; Elisiane Sateles Santos<sup>2</sup>; Luiz Di Paolo Maggitti Junior<sup>2</sup>; Eliardo Rodrigues Flores<sup>2</sup>; João Batista Ribeiro da Silva<sup>2</sup>; Rodrigo Freitas Bittencourt<sup>2</sup>; Marcos Chalhoub<sup>2</sup>; Antonio de Lisboa Ribeiro Filho<sup>2</sup>

1.UFOB, Barra, BA, Brasil; 2.UFBA, Salvador, BA, Brasil.

Objetivou-se comparar características morfofuncionais do corpo lúteo (CL) entre vacas gestantes e não gestantes e empregar a ultrassonografia (US) doppler como indicador precoce de gestação em fêmeas leiteiras 20 dias após IATF. Para tanto, 50 vacas mestiças Holandês-Gir foram submetidas a protocolo de sincronização que iniciou em um dia aleatório denominado dia zero (D0) por inserção de dispositivo intravaginal com 1,0g de progesterona (P4) (Sincrogest®, Ouro-Fino, São Paulo, Brasil) e aplicação de 2,0mg de benzoato de estradiol (im) (Sincrodiol®, Ouro-Fino, São Paulo, Brasil). No D7, receberam 12,5mg de dinoprost trometamina (im) (Lutalyse®, Zoetis, São Paulo, Brasil). No D9, foi realizada remoção dos dispositivos, aplicação de 300UI de eCG (im.) (Novormon®, Zooetis, São Paulo, Brasil) e 0,6mg de cipionato de estradiol (im) (ECP®, Pfizer, São Paulo, Brasil). No D11 realizou-se a IATF utilizando sêmen criopreservado de único touro Girolando. Os parâmetros luteais foram mensurados 20 dias após IATF (Mindray Z5), para obtenção de imagens do diâmetro (DCL) e da área do CL (ACL) empregou-se o US modo B; enquanto para determinar a área de vascularização (VCL) e percentual da área de vascularização no CL (%VCL) utilizou-se o US Doppler modo power-flow. As imagens foram classificadas com base na quantidade de pixels coloridos e na sua distribuição no CL, sendo categorizados em dois grupos: Animais com menos de 20% de %VCL foram classificados como diagnóstico preditivo negativo (DPN), e animais com mais que 30% foram classificados como diagnóstico preditivo positivo (DPP). Para avaliar a funcionalidade do CL, foram coletadas amostras de sangue por venopunção coccígea sendo determinada a concentração plasmática de P4 por meio de quimioluminescência utilizando o imunoensaio Access immunoassay systems Progesterone, sensibilidade de 0,1ng/mL. O diagnóstico de gestação (DG) definitivo foi realizado por US transretal 35 dias após as IATFs, sendo classificados como gestantes os animais em que houve visibilização do embrião com presença de batimentos cardíacos. Para comparar as diferenças entre os parâmetros de gestantes e não gestantes utilizou-se o teste t de Student, com P<0,05. Foi estabelecido o grau de concordância entre o diagnóstico preditivo e definitivo por meio da especificidade, sensibilidade e acurácia. As médias de DCL e ACL não diferiram entre o grupo gestante e não gestante. No que se refere à VCL, %VCL e P4, os animais gestantes apresentaram em média, respectivamente, 1,12±0,34cm<sup>2</sup>, 36,14±9,01% e 11,04±4,32ng/mL, significativamente superior aos animais não gestantes os quais apresentaram em média VCL de 0,57±0,36cm<sup>2</sup>, %VCL de 19,63±10,53% e P4 de 5,19±5,70ng/mL. O DG definitivo demonstrou que 88,8% dos animais não gestantes foram detectados no diagnóstico preditivo, demonstrando sensibilidade de 91,3% e acurácia de 90%. Conclui-se que a US doppler do CL aos 20 dias pós IATF é um método confiável para realizar DG precoce em vacas mestiças.

**Palavras-chave:** Bovinos; diagnóstico de gestação; IATF

SBTE 057 IATF, TETF e IA  
Número de Submissão 1645

**Avaliação da influência do escore de condição corporal (eCC) sobre a ciclicidade e a taxa de prenhes de vacas nelore submetidas ao programa de inseminação artificial em tempo fixo (IATF)**

Rafael Rodrigues Corrêa<sup>1</sup>; Gabriel Artur Marciano do Nascimento<sup>1</sup>; Marcos Paulo Garcia<sup>2</sup>

1.Ourofino, Cravinhos, SP, Brasil; 2.Autônomo, Patos, MG, Brasil.

O desempenho reprodutivo de fêmeas bovinas está relacionado ao estado nutricional, principalmente quando nos referimos a ciclicidade de vacas e o período gestacional. Portanto, a insuficiente ingestão de alimentos através de uma dieta mal formulada ou a escassez comum na época da seca é uma causa comum de infertilidade e alta taxa de anestro especialmente nos rebanhos submetidos ao manejo extensivo. O objetivo do estudo foi avaliar a influência do escore de condição corporal (ECC) sobre a ciclicidade e a taxa de prenhes de vacas Nelore submetidas à protocolo de IATF. Foram utilizadas 260 vacas multíparas da raça Nelore, mantidas em pastagens de Brachiária decumbens com acesso ad libitum a água e sal mineral. O protocolo de IATF utilizado consistiu na inserção de um dispositivo intravaginal contendo 1 g de progesterona (Sincrogest®, Ourofino Saúde Animal, Cravinhos-Brasil) e administração intramuscular de 2 mg de benzoato de estradiol (Sincrodiol®, Ourofino Saúde Animal, Cravinhos-Brasil) no D0, com retirada do dispositivo de progesterona, administração intramuscular de 0,5 mg de cloprostenol sódico (Sincrocio®, Ourofino Saúde Animal, Cravinhos-Brasil), 300 UI de eCG (Sincro eCG®, Ourofino Saúde Animal, Cravinhos-Brasil) e 1 mg de cipionato de estradiol (SincroCP, Ourofino Saúde Animal, Cravinhos-Brasil) no D8 com IATF no D10. Para avaliação da ciclicidade, os animais foram submetidos a exame ultrassonográfico no dia de início do protocolo de IATF. Nesse mesmo dia foi realizada a avaliação do ECC na escala de 1 a 5. Para o diagnóstico de gestação e avaliação da taxa de prenhes, foi realizado um novo exame ultrassonográfico 30 dias após a data da inseminação dos animais. A relação entre ECC e ciclicidade e ECC e taxa de prenhes foi analisada utilizando o teste qui-quadrado. Não foi observada diferença (p>0,05) entre ECC e taxa de prenhes dos animais aos 30 dias, entretanto observou-se diferença (p<0,05) entre ECC e ciclicidade, 71,43% dos animais com

ECC=2 estavam em anestro, 38,24% dos animais com ECC=3 tinham CL, e 89,58% dos animais classificados com ECC=4, apresentaram CL (ciclicidade). Os resultados obtidos demonstram que o estado nutricional, avaliado através do ECC, pode afetar o desempenho reprodutivo de vacas Nelore, diminuindo o número de animais que iniciam os programas reprodutivos ciclando.

**Palavras-chave:** Ciclicidade; bovinos; IATF

SBTE 058 IATF, TETF e IA

Número de Submissão 1646

**Efeito de diferentes fontes e concentrações de progesterona na taxa de prenhez de vacas holandesas submetidas à IATF**

Lais mendes Vieira<sup>1</sup>; Rodolfo Daniel Mingoti<sup>1</sup>; Alessandra Ambrósio Teixeira<sup>1</sup>; Romulo Germano Rezende<sup>1</sup>; Jessica Cristina Lemos Motta<sup>1</sup>; Marcos Henrique Alcantara Colli<sup>1</sup>; Luiz Gustavo Martignoni Bragança<sup>2</sup>; Regis José de Carvalho<sup>3</sup>; Pietro Sampaio Baruselli<sup>1</sup>

1.Departamento de Reprodução Animal, VRA-FMVZ, USP, São Paulo, SP, Brasil; 2.Neogen Reprodução Assistida, Ribeirão Preto, SP, Brasil; 3.Veterinário autônomo, Carmo do Rio Claro, MG, Brasil.

Com o intuito de avaliar o efeito de diferentes fontes e concentrações de progesterona (P4) na taxa de prenhez de vacas Holandesas (*Bos taurus*) em lactação foi conduzido um estudo com 354 animais. As vacas foram homogeneamente alocadas, de acordo com escore de condição corporal ( $2,99 \pm 0,03$ ), dias em lactação ( $153 \pm 6,01$  dias), número de lactações ( $2,2 \pm 0,04$ ) e produção ( $32,2 \pm 0,57$  kg/leite/dia), em um de três grupos experimentais: G1) dispositivo intravaginal contendo 1,2 g de P4 (Fertilcare 1200®, Vallée S.A.); G2) dispositivo intravaginal contendo 1,2 g de P4 utilizado previamente por 8 dias (Fertilcare 1200®, Vallée S.A.); G3) dispositivo intravaginal contendo 0,6 g de P4 (Fertilcare 600®, Vallée S.A.). No D0, as vacas receberam um dispositivo intravaginal de P4 e 2,0 mg de benzoato de estradiol (Gonadiol®, MSD). No D8, foi administrado 500 µg de cloprostenol sódico (Ciosin®, MSD), 400 UI de eCG (Folligon®, MSD) e 1,0 mg de cipionato de estradiol (ECP®, Zoetis), juntamente com a remoção do dispositivo de P4. A IATF foi realizada no D10, 48 horas após a remoção da fonte de P4. O diagnóstico de gestação foi realizado por ultrassonografia 30 e 60 dias após a inseminação. Os dados foram analisados pelo procedimento PROC GLIMMIX do SAS® (SAS 9.3 Institute Inc., Cary, NC, USA, 2003). Não houve diferença entre os grupos experimentais na taxa de concepção aos 30 dias [G1 = 27,1% (33/122); G2 = 22,8% (26/114); G3 = 28,8% (34/118); P = 0,50]. Ainda, não foi observado diferença na taxa de prenhez aos 60 dias [G1 = 21,3% (26/122); G2 = 17,5% (20/114); G3 = 25,4% (30/118); P = 0,30]. Portanto, os resultados mostram que as diferentes fontes e concentrações de P4 utilizadas no presente estudo não tiveram efeito na taxa de concepção à IATF em vacas Holandesas.

**Palavras-chave:** Progesterona; vacas holandesas; reutilização

SBTE 059 IATF, TETF e IA

Número de Submissão 1652

**ECG em vacas nelore: diferentes preparações comerciais e mesmas taxas de prenhez**

Lussandro Comarella Lechinoski; Augusto Rodrigues Felisbino Neto; Leonardo Cappellessio; Bruno Gonzalez de Freitas; Roney Santos Ramos; Marcus Luciano Guimarães Rezende; Danilo Lemos Furtado; Cristiano Passarin; Bruna Martins Guerreiro; Michele Richeri Bastos

Ourofino Saúde Animal, Cravinhos, SP, Brasil.

O tratamento com gonadotrofina coriônica equina (eCG) pode estimular o desenvolvimento final do folículo e aumentar a taxa de prenhez à inseminação artificial em tempo fixo (IATF), principalmente em vacas com baixa condição corporal e em anestro (Baruselli et al., Anim Reprod, v.9, p.139-152, 2012). Considerando a importância desse hormônio para o incremento da eficiência reprodutiva, o presente estudo teve como objetivo comparar o efeito da administração de 2 diferentes preparações comerciais de eCG na taxa de prenhez à IATF em vacas de corte. O experimento foi conduzido em duas fazendas comerciais localizadas nos estados do PA e MT. Um total de 635 vacas da raça Nelore com ECC =  $2,76 \pm 0,01$  receberam 2 mg IM de benzoato de estradiol (Sincrodiol, Ourofino Saúde Animal) e um dispositivo intravaginal de liberação de progesterona (Sincrogest®, Ourofino Saúde Animal) no início do estudo (D0). Oito dias após (D8), os dispositivos foram removidos e foram administrados 1,0 mg IM de cipionato de estradiol (SincroCP, Ourofino Saúde Animal), 0,530 mg IM de cloprostenol sódico (Sincrocio, Ourofino Saúde Animal) e as fêmeas foram aleatoriamente distribuídas em 2 grupos experimentais: grupo SincroeCG [administração IM de 300 UI de gonadotrofina coriônica equina (SincroeCG, Ourofino Saúde Animal)] e grupo Empresa A [administração IM de 300 UI de eCG da empresa A (Novormon, Zoetis)]. As vacas foram inseminadas em tempo fixo 48 horas após a retirada dos dispositivos. Exames ultrassonográficos transretais foram realizadas 30 dias após IATF para diagnóstico de gestação. Os resultados foram analisados pelo procedimento GLIMMIX do SAS® 9.3. Não houve interação ECC\*tratamento (P = 0,43). As taxas de prenhez após a IATF foram semelhantes entre os grupos [SincroeCG = 46,3% (148/320) vs. Empresa A = 46,2% (145/315); P = 0,84]. Dessa forma, podemos concluir, com base nos resultados obtidos, que a taxa de prenhez de fêmeas Nelore à IATF foi semelhante entre os grupos SincroeCG e Empresa A.

Agradecimentos: Luiz Otávio Carneiro Gondin

**Palavras-chave:** ECG; *Bos indicus*; IATF

SBTE 060 IATF, TETF e IA

Número de Submissão 1653

**Dinâmica folicular de novilhas girolando sincronizadas com diferentes dispositivos intravaginais de P4 (0,558g ou 1,9g) mantidos por 8 ou 9 dias**

Luciana Ribeiro Peixoto; Barbara Virgínia Rodrigues Rizoto de Mattos; Tatiane Silva Maia; Lorena Martins Araújo; Jairo de Melo Júnior; Deize de Cássia Antonino; Mayara Mafra Soares; Mayara Oliveira; Alex de Matos Teixeira; Gustavo Guerino Macedo

UFU, Uberlândia, MG, Brasil.

O objetivo deste estudo foi analisar a dinâmica folicular de novilhas em protocolos de sincronização de ovulação utilizando dispositivos intravaginais com diferentes concentrações de P4 e diferentes períodos de manutenção. Novilhas Girolando cíclicas (n = 48) foram distribuídas aleatoriamente em um dos quatro grupos (fatorial 2 x 2): Fertilcare8 (n = 12), Fertilcare9 (n = 12), CIDR8 (n = 12) e CIDR9 (n = 12). Os grupos Fertilcare8 e CIDR8 receberam um dispositivo intravaginal de P4 [Fertilcare® (0.558g) e um CIDR (1,9 g) de segundo uso, respectivamente] e 2mg de benzoato de estradiol (BE) i.m. (Gonadiol®; Zoetis, São Paulo, Brasil), no D0 do protocolo de IATF. No D8, o dispositivo foi removido e administrado i.m. 1mg de cipionato de estradiol (CE) (ECP®; Zoetis, São Paulo, Brasil) e 0,5 mg de cloprostenol sódico (Ciosin®, São Paulo, Brasil). Grupos Fertilcare9 e CIDR9 receberam um dispositivo intravaginal de P4 [Fertilcare® (0.558g) e CIDR (1,9 g) de segundo uso, respectivamente] e 2mg de benzoato de estradiol (BE) i.m. (Gonadiol®, Zoetis, São Paulo, Brasil) no D0. No D7, foram aplicados 0,5 mg de cloprostenol sódico (Ciosin®, São Paulo, Brasil) e no D9, o dispositivo foi removido e foi administrado 1 mg de cipionato de estradiol (CE) de i.m. (ECP®, Zoetis, São Paulo, Brasil). Os animais de todos os tratamentos foram inseminados 48 horas após a retirada dos dispositivos. As avaliações dos ovários por ultrassonografia foram realizadas no tempo 0 (considerando-se o momento da remoção do dispositivo), 24, 48, 60, 72, 84 e 96 h. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o proc GLIMMIX do SAS e os dados são apresentados por média ± SE. Significância é considerada quando  $p < 0,05$ . Houve semelhança entre os tratamentos (três manejos vs quatro manejos) quando observado o maior folículo dominante ( $13,82 \pm 0,51$  mm vs  $14,25 \pm 0,49$  mm;  $p > 0,05$ ), o diâmetro do folículo ovulatório ( $12,58 \pm 0,66$  mm vs  $13,21 \pm 0,49$  mm;  $p > 0,05$ ), a porcentagem de ovulação por protocolo ( $77,27\%$  vs  $95,40\%$ ;  $p > 0,05$ ), o momento da ovulação após a remoção do dispositivo ( $74,82 \pm 4,05$  horas vs  $80 \pm 2,66$  horas;  $p > 0,05$ ), o tamanho do folículo no momento da retirada do dispositivo de progesterona ( $9,56 \pm 0,86$  mm vs  $10,79 \pm 0,52$  mm;  $p > 0,05$ ), o tamanho do folículo na inseminação artificial ( $11,02 \pm 0,69$  mm vs  $13,38 \pm 0,62$  mm;  $p > 0,05$ ) e a taxa de crescimento diária de cada folículo dominante ( $0,95 \pm 0,28$  mm / dia vs  $1,29 \pm 0,14$  mm / dia;  $p > 0,05$ ). Assim, conclui-se que não houve diferença estatística entre os protocolos de 3 manejos ou o protocolo de 4 manejos quando foi utilizado o dispositivo de progesterona CIDR® de segundo uso e mesmo quando foi utilizado o dispositivo de progesterona de dose única Fertilcare® sendo então os dois protocolos eficientes para a sincronização de ovulação de novilhas.

**Palavras-chave:** Folículo; progesterona; bovino

SBTE 061 IATF, TETF e IA

Número de formatação 1655

**Taxa prenhez à IATF de vacas nelore (*Bos indicus*) submetidas aos protocolos de 3 ou 4 manejos com administração de PGF em diferentes momentos**

Rafael Pardini Abreu Carvalhaes<sup>1</sup>; Marcos Henrique Alcantara Colli<sup>2</sup>; Thomaz Teixeira de Almeida<sup>3</sup>; Rodolfo Daniel Mingoti<sup>2</sup>; Lais Mendes Vieira<sup>2</sup>; Marcelo Henrique Santos<sup>1</sup>; José Nélcio de Sousa Sales<sup>3</sup>; Pietro Sampaio Baruselli<sup>2</sup>

1.RPZ Assessoria, Sinop, MT, Brasil; 2.Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil; 3.Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a taxa de prenhez de vacas Nelore lactantes utilizando protocolos para IATF com exposição à P4 por 8 ou 9 dias com 3 ou 4 manejos. Foram utilizadas 611 vacas em dois experimentos. Em cada experimento os animais foram divididos em dois grupos de acordo com ECC ( $2,86 \pm 0,28$ ), dias pós-parto (40 a 50 dias) e presença de CL detectados por ultrassonografia (US; Mindray®, DP-2200) no D0. No experimento 1, as vacas do grupo 8D-PGF-D8 receberam protocolo de 3 manejos, com 8 dias de P4 (CIDR®, Zoetis) e com PGF im (Lutalyse®, Zoetis) no D8. No grupo 8D-PGF-D0eD8 os animais foram submetidos ao protocolo de 8 dias de P4 (CIDR®, Zoetis) com PGF no D0 e D8. No experimento 2, as vacas do grupo 9D-PGF-D7 receberam protocolo de 4 manejos com 9 dias de P4 (CIDR®, Zoetis) com aplicação de PGF no D7. No grupo 9D-PGF-D0eD9 as vacas foram tratadas com protocolo de 3 manejos com 9 dias de P4 (CIDR®, Zoetis) e aplicação de PGF no D0 e D9. Nos dois experimentos, no D0 os animais receberam 2,0 mg de BE im (Gonadiol®, Zoetis) associado à inserção de um dispositivo intravaginal de P4 (CIDR®, Zoetis). No D8 (8D-PGF-D8 e 8D-PGF-D0eD8) e no D9 (9D-PGF-D7 e 9D-PGF-D0eD9) retirou-se o dispositivo de P4 e foram realizados os tratamentos com 1,0 mg de CE i.m. (E.C.P®, Zoetis) e 300 UI de eCG im (Novormon®, Zoetis). A IATF foi realizada 48 horas após a retirada do dispositivo em todos os grupos. O diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias após a IATF por US. Os

dados foram analisados pelo PROC GLIMMIX do SAS®. No experimento 1, não houve interação ( $P=0,53$ ) entre protocolo e presença de CL no D0 na taxa de prenhez. A presença de CL no D0 não diferiu entre os grupos [8D-PGF-D8=30% (47/159) e 8D-PGF-D0eD8=30% (49/163);  $P=0,83$ ]. As vacas com presença de CL apresentaram semelhante taxa de prenhez que as vacas sem de CL no D0 do protocolo [ComCL= 59% (57/96); sem CL 60% (136/226);  $P=0,70$ ]. Ainda, não foram observadas diferenças na taxa de prenhez entre os grupos [8D-PGF-D8=57% (91/159) vs. 8D-PGF-D0eD8=63% (102/163);  $P=0,53$ ]. No experimento 2, não houve interação ( $P=0,94$ ) entre protocolo e presença de CL no D0 na taxa de prenhez. A presença de CL no D0 foi semelhante entre os grupos [9D-PGF-D7=28% (40/142) e 9D-PGF-D0eD9=30% (44/147);  $P=0,41$ ]. As vacas com CL apresentaram semelhante taxa de prenhez que as vacas sem de CL no D0 do protocolo [ComCL= 64% (54/84); sem CL 60% (122/205);  $P=0,96$ ]. Não se observou diferença na taxa de prenhez entre os tratamentos [9D-PGF-D7=65% (92/142) vs. 9D-PGF-D0eD9=57% (84/147);  $P=0,18$ ]. Conclui-se que o tratamento com PGF no D0 não aumentou a taxa de prenhez nos protocolos de 3 manejos com 8 dias de permanência do dispositivo de P4, independente da presença de CL no D0 (Exp 1). Ainda, o protocolo de 4 manejos com PGF no dia 7 apresentou a mesma taxa de prenhez que protocolos de 3 manejos com PGF no D0 e D9 em protocolos com 9 dias de permanência do dispositivo de P4.

Agradecimentos: Mafra Agropecuária S/A e Zoetis.

**Palavras-chave:** Vacas lactantes; corpo lúteo; IATF

SBTE 062 IATF, TETF e IA.

Número de Submissão 1658

**Progesterona circulante, dinâmica folicular e fertilidade em vacas holandesas durante a reutilização de dispositivos intravaginais de progesterona em protocolo de IATF**

Leonardo de França e Melo<sup>1</sup>; Anibal Ballarotti Nascimento<sup>2</sup>; Jessica Nora Drum<sup>1</sup>; Camila Spies<sup>1</sup>; Pedro Leopoldo Jerônimo Monteiro jr<sup>1</sup>; Alexandre Barbieri Prata<sup>1</sup>; Milo Charles Wiltbank<sup>3</sup>; Roberto Sartori<sup>1</sup>

1.ESALQ/USP, Piracicaba, SP, Brasil; 2.ABS Global, Madison, Estados Unidos; 3.University of Wisconsin, Madison, Estados Unidos.

A autoclavagem, previamente à reutilização de dispositivos com 1,9g de progesterona (P4), eleva a P4 circulante e deve proporcionar melhor ambiente endócrino para desenvolvimento folicular e oocitário durante protocolo de IATF. Objetivou-se comparar P4 circulante, dinâmica folicular e fertilidade durante reutilização de dispositivos de P4 por 8d, previamente autoclavados ou desinfetados em vacas holandesas lactantes submetidas a um protocolo de IATF à base de estradiol/P4, combinado com GnRH no início do protocolo. Foram utilizadas 349 vacas, primíparas ( $n=123$ ) e multíparas ( $n=226$ ), em duas fazendas, apresentando no d-10 (Média±DP) 163,9±141,9 dias em lactação; 35,7±11,3kg de leite e escore corporal 2,9±0,5. Em delineamento inteiramente casualizado, as vacas foram aleatorizadas em dois tratamentos. No d-10, receberam dispositivo de P4 (CIDR; Zoetis) usado autoclavado (Aut;  $n=177$ ) ou desinfetado (Des;  $n=172$ ), 2mg de benzoato de estradiol (Gonadiol; MSD) e 100µg de GnRH (Fertagyl; MSD). No d-3 e -2 foram administrados 25mg de PGF (Lutalyse; Zoetis) e no d-2, após a retirada dos dispositivos, as vacas receberam 1mg de cipionato de estradiol (ECP; Zoetis) e foram inseminadas no d0. Na Fazenda A, 115 vacas receberam Estroject (IVP Brasil) no d-2 para detecção de estro e 143 vacas foram avaliadas por ultrassom entre os d-10 e 5 para identificação das estruturas ovarianas, além de colheitas sanguíneas nos d-10, -3 e -2 para verificar as concentrações de P4 por radioimunoensaio. O diagnóstico de gestação ocorreu aos 32 e 60d pós IA. Variáveis contínuas foram analisadas pelo Proc-Mixed e as binomiais pelo Glimmix do SAS 9.4 ( $P<0,10$ ). Não houve efeito de tratamento na P4 no d-10 e -3, sendo mais elevada no grupo Des no d-2. Vacas que ovularam no d-10 tinham P4 circulante (ng/mL) mais baixa no d-10 (2,0 vs. 3,1), que foi mais alta no d-3 (4,0 vs. 2,4), associada à maior proporção de vacas com CL (100 vs. 40%). Além disso, uma maior proporção de vacas que ovularam no d-10 teve a emergência de uma nova onda folicular sincronizada (97,9 vs. 63,2%), além de antecipar a emergência da onda (1,9 vs. 2,6d), resultando em menor incidência de ovulação de folículo persistente no d0 (0,0 vs. 35,7%). Mais vacas sem CL no d-10 apresentaram estro no d0 em relação às vacas com CL no d-10. Não houve efeito de tratamento, da presença de CL no d-10, ou de ovulação no d-10 na fertilidade (prenhez por IA). A fazenda A teve maior P/IA do que a B aos 32d (40,8 vs. 27,8%) e aos 60d (35,8 vs. 24,3%), independente de tratamento. Concluiu-se que o uso de dispositivos com distintas propriedades de liberação de P4 durante protocolo de IATF não influenciou dinâmica folicular, taxa de sincronização ou P/IA. Entretanto, presença de CL ao início do protocolo ou ovulação aos tratamentos no d-10 influenciaram variáveis reprodutivas, tais como momento e sincronização da emergência de onda folicular, proporção de vacas em estro ao final do protocolo e tamanho do folículo ovulatório.

Agradecimentos: FAPESP, CAPES, Fazendas Santo Antônio e São Jorge.

**Palavras-chave:** Hormônio; sincronização; implante

SBTE 063 IATF, TETF e IA

Número de submissão 1659

**Impacto do cipionato de estradiol antes da iatf e da suplementação com progesterona no diestro inicial sobre as respostas ovarianas e taxa de prenhez de vacas de corte**

Thiago Martins<sup>1</sup>; Guilherme Pugliesi<sup>1</sup>; João Paulo Talamoni<sup>2</sup>; Jose Ricardo Garla Maio<sup>3</sup>; Guilherme Paula Nogueira <sup>4</sup>; Mario Binelli<sup>1</sup>

1.FMVZ - USP, São Paulo, SP, Brasil; 2.UNICASTELO, Descalvado, SP, Brasil; 3.Ourofino, Ribeirão Preto, SP, Brasil; 4.FMVA-UNESP, Aracatuba, SP, Brasil.

Em bovinos, a suplementação com P4 (P4-Supl) durante o diestro inicial estimula o desenvolvimento do concepto e a proporção de vacas prenhas após a IA (P/IA). Apesar dos efeitos positivos, uma proporção de vacas P4-Supl apresenta redução da vida luteal (luteólise precoce). Portanto, hipotetizou-se que a suplementação com estradiol (E2) durante o proestro diminui a incidência de luteólise precoce e aumenta a resposta fértil (P/AI) após a P4-Supl. Vacas Nelore lactantes multíparas (M; n=643) e primíparas (P; n=193) foram sincronizadas utilizando no D-10, implante intravaginal de P4 (1,0 g; Sincrogest) e 2 mg de benzoato de estradiol (Sincrodiol). No D-2, os implantes de P4 foram removidos e 0,53 mg de PGF (Sincrocio) + 300 IU de eCG (SincroeCG) + ESTROTECT foram utilizados. No D0 as vacas foram inseminadas (IATF) e 10 mg de análogo de GnRH (Sincroforte) foi administrado. A expressão de estro foi avaliada pelo uso do ESTROTECT. As vacas receberam 0 ou 1,0 mg de cipionato de estradiol (CP; Sincrocip) no D-2 e 0 ou 150 mg de P4 de longa ação (Sincrogest) no D4. O diâmetro do maior folículo na IATF (FO-TAI) e a área do CL foram mensurados nos dias 0 e 4 por ultrassonografia. No D15, a regressão do CL foi determinada por Color Doppler (n=195) e pela concentração sérica de P4 por RIA. Considerou-se luteólise, animais com CL <2,0 cm<sup>2</sup> e fluxo sanguíneo ≤ 25% da área total do CL ou P4<1.0 ng/mL. Os dados foram analisados por SAS v.9.3 utilizando o PROC MIXED, GLIMMIX e o teste Qui-Quadrado (luteólise). O tratamento com CP aumentou (P<0.001) a proporção de vacas em estro [M: 53,4% (171/320) vs. 16,1% (52/323) e P: 31,3% (31/99) vs. 3,2% (3/94)] e a P/AI [M: 51,6% (165/320) vs. 35,0% (113/323) e P: 40,4% (40/99) vs. 24,5% (23/94)]. O tratamento com CP não afetou o FO-TAI em M (CP: 12,19 vs. Sem-CP: 12,23 mm; EPM: 0,10) e P (CP: 11,14 vs. Sem-CP: 11,25 mm; EPM: 0,16) e nem a proporção de vacas com CL no D4 em M [CP: 87,2% (279/320) vs. Sem-CP: 84,3% (274/323)] e P [CP: 85,7% (42/49) vs. Sem-CP: 82,2% (37/45)]. No D4, o tratamento com CP aumentou a área do CL para M (1,26 vs. 1,16 cm<sup>2</sup>, EPM: 0,02; P<0.01), porém, esse aumento não foi significativo para P (CP: 1,07 vs. Sem-CP: 0,95 cm<sup>2</sup>, EPM: 0,04; P=0.13). No D15, a P4-Supl aumentou a proporção de vacas detectadas em luteólise, porém, o tratamento com CP diminuiu essa proporção [CP: 6,4b% (3/47), CP+P4-Supl: 8,3b% (4/48), Sem-CP: 8,0b% (4/50) e Sem-CP+P4-Supl: 26,0a% (13/50); P<0.05]. Esse efeito foi confirmado pela proporção de vacas com P4<1.0 ng/mL [CP: 2,1b% (1/47), CP+P4-Supl: 4,17b% (2/48), Sem-CP: 8,0a,b,Y% (4/50) e Sem-CP+P4-Supl:20,0a,X% (10/50); a,b P<0.05 e X,Y P≤0.10]. No D15, a concentração de P4 dos animais que não apresentaram luteólise foi maior no grupo CP do que no grupo Sem-CP (CP: 6,14a, CP+P4-Supl: 5,84a,b,X, Sem-CP: 4,95b,Y e Sem-CP+P4-Supl: 5,84a,b,X ng/mL; SEM:0,20; a,b P<0.05 e X,Y P≤0.10). Em conclusão, o tratamento com E2 exógeno durante o proestro aumenta a fertilidade independente da suplementação com P4 e diminui a incidência de luteólise precoce nas vacas suplementadas com P4 durante o diestro inicial.

**Palavras-chave:** Proestro; progesterona; luteólise

SBTE 064 IATF, TETF e IA

Número de Submissão 1660

#### **Efeito da administração de progesterona após a IATF no desenvolvimento do concepto e na taxa de prenhez em búfalas lactantes**

Diego Cavalcante de Souza<sup>1</sup>; Nelcio Antonio Tonizza de Carvalho<sup>2</sup>; Julia Gleyci Soares<sup>1</sup>; Lais Mendes Vieira<sup>1</sup>; Angela Maria Gonella-Díaz<sup>2</sup>; Antenor Pereira Bonfim Neto<sup>1</sup>; Ed Hoffmann Madureira<sup>1</sup>; Paula de Carvalho Papa<sup>1</sup>; Mario Binelli<sup>1</sup>; Pietro Sampaio Baruselli<sup>1</sup>

1.Departamento de Reprodução Animal, VRA-FMVZ-USP, São Paulo, SP, Brasil; 2.Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Registro-polo Regional do D.S.A. do vale do Ribeira/apta, registro, SP, Brasil.

Objetivamos com o presente estudo aumentar o comprimento do concepto e a taxa de prenhez de búfalas lactantes por meio da administração de P4 3 ou 6 dias após a IATF. Para tanto, foram conduzidos três experimentos. No exp.1, foi aferido o padrão de liberação de P4 em 8 búfalas ovariectomizadas (delineamento crossover) que receberam 300 ou 600 mg (grupo P300 ou P600, respectivamente) de P4 injetável (P4i; Sincrogest Injetável®, Ourofino Agronegócio, Brasil). Foram realizadas colheitas de sangue para dosagens de P4 às -24, 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 e 240 h da administração da P4i. No exp.2, 24 búfalas foram submetidas ao protocolo Ovsynch (D0, GnRH; D7, PGF2α; D9, GnRH; D10, IATF) e avaliadas por ultrassonografia (Mindray DP2200Vet, China) no D13, quando as fêmeas com presença de CL foram distribuídas em 3 grupos: Controle (C; n=8); P4D13 (n=8; 300 mg de P4i no D13); P4D16 (n=8; 300 mg de P4i no D16). No D26, as búfalas foram abatidas, os genitais removidos e foram aferidos o diâmetro (DCLa) e o peso (PCL) do CL e a presença (PC) e o comprimento dos conceptos (CC). Lâminas coradas do tecido luteal e endometrial foram avaliadas por microscopia ótica para determinação do % de células luteínicas pequenas e grandes (SLC e LLC) e o número (GEn), área (AGEn) e perímetro (PGen) das glândulas endometriais. No exp.3, 337 búfalas foram submetidas ao protocolo Ovsynch e, assim como no exp.2, as fêmeas com presença de CL foram distribuídas em 3 grupos (C, n=89; P4D13, n=92; P4D16, n=93). Foi avaliada a funcionalidade (vascularizações central – VC; e periférica – VP; Score de 0 a 4) e o diâmetro do CL (DCL) nos D17, D21 e D25, por meio de ultrassonografia em modo color Doppler (Mindray M5Vet; China). Além disso, foram avaliadas as taxas de prenhez aos 30 (DG30) e 60 (DG60) dias após a IATF e as perdas gestacionais (PG;

Mindray DP2200Vet). Os dados foram analisados utilizando o procedimento GLIMMIX do SAS®. As concentrações de P4 foram maiores no P600 em relação ao P300 em todos os momentos após a administração da P4i (Ptrat<0,01, Ptempo=0,04, Ptrat\*tempo=0,18). As concentrações do P300 se mantiveram acima de 1ng/mL por aproximadamente 3 dias, o que foi utilizado como critério para a dose utilizada nos exp.2 e 3. Não houve diferenças entre os grupos para as variáveis avaliadas no exp.2: DCLa, PCL, PC, CC, SLC, LLC, GEn, AGEn e PGen (P>0,05). No exp.3, houve interação tratamento\*tempo para as variáveis VC, VP e DCL (P<0,07). Verificou-se redução da VC, VP e do DCL no P4D13 em relação aos grupos C e P4D16 conforme os momentos de avaliação. Não houve diferença entre os grupos C, P4D13 e P4D16 para o DG30 (56,8 vs. 46,4 vs. 61,2 %; P=0,13) e para a PG (0,0 vs. 10,3 vs. 5,8 %; P=0,73). No entanto, houve reduzida taxa de prenhez no DG60 para o P4D13 em comparação aos C e P4D16 (41,7 vs. 56,8 vs. 57,7 %; P=0,07). Conclui-se que o tratamento com 300mg de P4i nos D13 ou D16 do protocolo Ovsynch não aumentou o comprimento do conceito e a taxa de prenhez de búfalas lactantes submetidas à IATF. Além disso, o tratamento com P4i três dias após a IATF reduziu a vascularização central e periférica do CL, o diâmetro do CL e a taxa de prenhez.

**Palavras-chave:** P4; CL; perda gestacional

SBTE 065 IATF, TETF e IA

Número de Submissão 1661

**Fertilidade de vacas holandesas (*Bos taurus*) repetidoras de serviço submetidas ao tratamento hormonal para indução de lactação – estudo retrospectivo**

Regis José de Carvalho<sup>1</sup>; Rodolfo Daniel Mingoti<sup>2</sup>; Bernardo Marcozzi Bayeux<sup>2</sup>; Romulo Germano Rezende<sup>2</sup>; Jessica Cristina Lemos Motta<sup>2</sup>; Henrique César Pereira Júnior<sup>3</sup>; Leonardo Krauss Santana Pereira<sup>3</sup>; Pietro Sampaio Baruselli<sup>2</sup>

1.Médico Veterinário Autônomo, Carmo do Rio Claro, MG, Brasil; 2.Departamento de Reprodução Animal, VRA-FMVZ-USP, São Paulo, SP, Brasil; 3.Fazenda Reunidas, Carmo do Rio Claro, MA, Brasil.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a fertilidade de vacas Holandesas (*Bos taurus*) repetidoras de serviço (RS) que permaneceram vazias ao final da lactação e foram tratadas com protocolo hormonal de indução de lactação. Para tanto, foram analisados dados retrospectivos de produção e reprodução de 50 vacas Holandesas com lactações concluídas. Foram analisados dados de vacas que iniciaram uma lactação fisiológica após um parto (Grupo LF; N = 50, Paridade = 2,0 ± 0,1 lactações), permaneceram não gestantes ao final desta lactação e tiveram uma nova lactação induzida por protocolo hormonal (Grupo IL; N = 50; Paridade = 3,0 ± 0,1). Para indução da lactação, as vacas receberam tratamento com bSTr (Boostin®, MSD, Brasil, 500 mg) nos dias 1º, 8º, 15º e 21º do protocolo; 2 implantes auriculares de Norgestomet por 15 dias (do 1º ao 15º dia), 2 ml de valerato de estradiol i.m. no 1º, 3º, 5º, 7º, 9º, 11º e 13º dia (2ml a cada 2 dias - Fração líquida do Crestar®, MSD Animal Health). Nos 15º, 16º e 17º dia do protocolo foi administrado benzoato de estradiol i.m. (5 mg/dia Gonadiol®, MSD Animal Health), dexametasona i.m. (20 mg/dia, Azium®, MSD Animal Health) e metoclopramida i.m. (100 mg/dia; Plasil®). A partir do 21º dia (primeira ordenha) foi administrado bSTr a cada 14 dias durante toda a lactação. O período seco foi de 80,3 ± 7 dias (intervalo entre o final da lactação fisiológica e o início da lactação induzida). Foram analisados e comparados entre as duas lactações (LF e LI) o número de serviços por concepção, o número de IATF, taxa de prenhez; produção de leite (diária e total; kg); duração da lactação (dias) e pico de produção (kg). Os dados foram analisados utilizando o PROC GLIMMIX do SAS® (SAS 9.3 Institute Inc., Cary, NC, USA, 2003). Foi observado diferença entre as lactações no número de serviços por concepção (LF = 5,28 ± 0,4; IL = 3,3 ± 0,33; P = 0,04; taxa de prenhez durante a lactação (LF = 0%; IL = 41,5%; P<0,0001); duração da lactação (LF = 389 ± 14; IL = 269 ± 13 dias; P<0,0001) e produção de leite durante a lactação (LF = 8484 ± 338; IL = 5778 ± 392 kg; P<0,0001). Não foram observadas diferenças entre as variáveis produção de leite por dia (LF = 22,2 ± 0,68; IL = 20,9 ± 0,72 kg/dia; P = 0,21) e pico de produção (LF = 35,1 ± 1,2; IL = 32,5 ± 1,3 kg; P = 0,13). Portanto, o protocolo de indução de lactação pode ser utilizado como estratégia para incrementar a fertilidade de vacas Holandesas (*Bos taurus*) repetidoras de serviço, assim como, incrementar a produção de leite e minimizar perdas econômicas referentes a falhas reprodutivas.

Agradecimentos: Fazendas Reunidas Antônio Carlos Pereira e Filhos

**Palavras-chave:** Taxa de prenhez; repetidoras de serviço; indução de lactação

SBTE 066 IATF, TETF e IA

Número de Submissão 1662

**Aumento da taxa de concepção com o uso de progesterona injetável de longa ação 4 dias após a IATF em vacas multíparas e primíparas nelore paridas**

Marcelo Seixas Cova<sup>1</sup>; Lussandro Comarella Lechinoski<sup>2</sup>; Wagner Saraiva Ruiz Romero<sup>3</sup>; Bruno Gonzalez de Freitas<sup>2</sup>; Roney Santos Ramos<sup>2</sup>; Bruno Arruda Antunes<sup>2</sup>; Marcus Luciano Guimarães Rezende<sup>2</sup>; Rodolfo Daniel Mingoti<sup>4</sup>; Michele Richeri Bastos<sup>2</sup>

1.J.P. Assessoria Rural, Rolim de Moura, RO, Brasil; 2.Ourofino Saúde Animal, Cravinhos, SP, Brasil; 3.Médico-Veterinário, Fazenda Santa Rosa, Xinguara, PA, Brasil; 4.FMVZ/USP, São Paulo, SP, BRASIL.

A administração de progesterona (P4) de longa ação 4 dias após a inseminação artificial em tempo fixo (IATF; protocolo P4-14) aumenta a fertilidade de vacas da raça Nelore lactantes em anestro (Pugliesi G. et al., Theriogenology, v.85, Issue

7, 2016). Entretanto, dados a respeito da utilização do protocolo P4-14 em fêmeas Nelore lactantes com ciclicidade desconhecida no início do protocolo de IATF ainda são escassos na literatura. O presente estudo teve como objetivo avaliar a eficiência do protocolo P4-14 em vacas da raça Nelore lactantes. No início do experimento (D0), um total de 422 vacas (326 múltiparas e 96 primíparas), com 30 a 60 dias pós-parto,  $ECC=2,27\pm0,04$  e oriundas de 2 fazendas comerciais localizadas nos estados de RO e PA, receberam um dispositivo intravaginal de P4 novo (Sincrogest®, Ourofino Saúde Animal) e uma injeção intramuscular (IM) de 2 mg de benzoato de estradiol (Sincrodiol, Ourofino Saúde Animal). Após 8 dias (D8), os dispositivos foram removidos e administrou-se 1 mg IM de cipionato de estradiol (SincroCP, Ourofino Saúde Animal), 0,530 mg IM de cloprostenol sódico (Sincrocio®, Ourofino Saúde Animal) e 300 UI IM de gonadotrofina coriônica equina (SincroeCG, Ourofino Saúde Animal). Todas as fêmeas foram inseminadas em tempo fixo 48 horas após a retirada dos dispositivos de liberação de progesterona (D10). No quarto dia após a IATF (D14) as vacas foram homogeneamente distribuídas, dentro de cada lote, de acordo com o ECC em 2 grupos experimentais: Controle [n = 230 (172 múltiparas e 58 primíparas);  $ECC = 2,27\pm0,05$ ], sem tratamento adicional; e P4-14 [n = 192 (154 múltiparas e 38 primíparas);  $ECC = 2,28 \pm 0,06$ ; administração IM de 150 mg de P4 injetável de longa ação (Sincrogest® injetável, Ourofino Saúde Animal)]. Avaliações ultrassonográficas transretais foram realizadas somente 30 dias após a IATF para diagnóstico de gestação. Os resultados foram analisados utilizando-se o procedimento GLIMMIX do SAS® 9.3. As variáveis explanatórias foram sequencialmente removidas do modelo estatístico seguindo critério de Wald se  $P > 0,20$ . Valores de  $P < 0,05$  foram considerados como significantes. Não houve interação ( $P = 0,34$ ) entre tratamento e fazenda e não foi observado efeito ( $P = 0,15$ ) de fazenda na taxa de concepção [Fazenda A = 49,1% (155/316) vs. Fazenda B = 57,5% (61/106)]. Observou-se efeito de tratamento na taxa de concepção com uma maior P/IA para o grupo P4-14 em relação ao grupo Controle [57,8% (111/192) vs. 45,6% (105/230);  $P = 0,01$ ]. Os resultados obtidos no presente trabalho de campo indicaram que a administração de P4 injetável de longa ação 4 dias após a IATF (protocolo P4-14) aumentou em 26,7% a taxa de prenhez de vacas da raça Nelore lactantes com pós-parto entre 30 e 60 dias e ciclicidade desconhecida no D0. Pugliesi et al. (Theriogenology, v.85, Issue 7, 2016) não encontraram tal aumento quando não consideraram a ciclicidade no D0, provavelmente devido ao maior ECC das vacas (média de 3,7), o que poderia indicar maior proporção de vacas cíclicas. Entretanto, ao avaliar fêmeas sem a presença de CL no D0, observaram aumento de 20% na taxa de concepção. Agradecimentos: Equipe fazendas Santa Rosa e Toca da Onça

**Palavras-chave:** Progesterona injetável; IATF; nelore

SBTE 067 IATF, TETF e IA

Número de Submissão 1664

**TETF: taxa de concepção e perda gestacional de acordo com categoria da receptora, estação do ano e estágio de desenvolvimento do embrião da raça girolando**

Melissa Lobato Defensor; Flávio Luiz Alves Marques; Mayara Oliveira; Ricarda Maria Santos

*Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil.*

Objetivou-se avaliar, no método transferência de embrião em tempo fixo (TETF), as diferenças das taxas de concepção e das perdas gestacionais entre animais de categorias distintas, entre as estações do ano e entre os estádios embrionários. O experimento foi realizado em uma fazenda produtora de leite, localizada na região de Uberlândia - MG, de dez/2014 a set/2015. Foram avaliados dados de 1.017 TETFs. As receptoras (composição racial variando de ½ holandês a ¾ holandês) foram divididas em três categorias, vacas em lactação (VL), n=618, vacas secas (VS), n=44, e novilhas (NOV), n=355. As estações do ano foram agrupadas em verão (verão e primavera) e inverno (inverno e outono). Os embriões, todos com qualidade morfológica grau 1, foram reunidos de acordo com seu estágio de desenvolvimento, em dois grupos. Grupo 1: blastocisto inicial e blastocisto e grupo 2: blastocisto expandido, blastocisto em eclosão e blastocisto eclodido. O protocolo de sincronização da ovulação das receptoras utilizado foi: D0: inserção do dispositivo intravaginal de progesterona e aplicação intramuscular de 2,0mg de benzoato de estradiol; D7: aplicação intramuscular de 0,526 mg de cloprostenol sódico; D9: aplicação intramuscular de 0,526 mg de cloprostenol sódico + 1 mg de cipionato de estradiol + retirada do dispositivo intravaginal; D18: transferência de embrião + aplicação intramuscular de 0,1 mg de gonadorelina. O diagnóstico de gestação foi feito com ultrassom 23 dias após a TETF. Os animais positivos no diagnóstico foram examinados novamente, com 60 dias de gestação, para confirmação da prenhez. Os animais que não estavam gestantes, na segunda avaliação, foram considerados como perdas gestacionais. Os dados foram analisados por regressão logística no programa MINITAB. Foi detectado efeito ( $P<0,05$ ) da categoria animal na taxa de concepção (46,2% NOV, 33,8% VL e 36,4% VS) e na perda de gestação (9,2% NOV; 20,8% VL e 20,0% VS). A estação do ano influenciou ( $P<0,05$ ) a taxa de concepção e tendeu ( $P=0,061$ ) a influenciar a perda de gestação. No verão (n=307), 33,2% dos animais emprenharam, enquanto que no inverno (n=710) a porcentagem foi de 40,4%. A taxa de perda foi de 10,9% no verão e 17,5% para o inverno. A categoria do embrião não afetou ( $P>0,10$ ) a taxa de concepção, porém afetou a perda de gestação ( $P<0,05$ ). Os embriões do grupo 1 (n=216) resultaram em 34,7% de concepção e do grupo 2 (n=801) em 39,2%. Na avaliação das taxas das perdas gestacionais o grupo 1 teve 24,3% e o grupo 2, 13,78%. Conclui-se que os três parâmetros avaliados influenciaram as taxas de concepção e/ou perda gestacional. Se usado de forma estratégica, o conhecimento sobre tais influências torna possível o aumento da taxa de concepção e a redução da taxa de perda gestacional sem aumentar os custos.

**Palavras-chave:** Transferência de embrião; prenhez; eficiência reprodutiva



SBTE 068 IATF, TETF e IA

Número de Submissão 1666

**Taxa de prenhez em vacas nelore sincronizadas com dispositivo Fertilcare 1200<sup>®</sup> novo ou usado submetidas à IATF 48 ou 54 horas após a remoção do dispositivo**

Mariana Pallú Viziack<sup>1</sup>; Renato Wihby Girotto<sup>2</sup>; Lais Mendes Vieira<sup>1</sup>; Marcos Henrique Alcantara Colli<sup>1</sup>; Rodolfo Daniel Mingoti<sup>1</sup>; Romulo Germano Rezende<sup>1</sup>; Manoel Francisco Sá Filho<sup>3</sup>; Pietro Sampaio Baruselli<sup>1</sup>

1.Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil; 2.RG genética avançada, Água Boa, MT, Brasil; 3.Altas genetics, Uberaba, MG, Brasil.

Objetivou-se avaliar a taxa de prenhez de vacas Nelore (*Bos indicus*), lactantes, submetidas ao protocolo de sincronização da ovulação utilizando dispositivo intravaginal de liberação de progesterona (P4; FertilCare<sup>®</sup>1200 com 1,2g de P4, Vallée, Brasil), novos ou previamente utilizados por oito dias, submetidas à IATF 48 ou 54 horas após a retirada do dispositivo. Para tanto, foram utilizadas 1.034 vacas Nelore distribuídas homogeneamente em quatro grupos experimentais: Grupo Novo-IATF 48 (Dispositivo FertilCare1200<sup>®</sup> novo com IATF 48 horas; n=258); Grupo Novo-IATF 54 (Dispositivo FertilCare1200<sup>®</sup> novo com IATF 54 horas; n=253); Grupo Usado-IATF 48 (Dispositivo FertilCare1200<sup>®</sup> previamente usado por 8 dias com IATF 48 horas; n=277) e Grupo Usado-IATF 54 (Dispositivo FertilCare1200<sup>®</sup> previamente usado por 8 dias com IATF 54 horas; n=256). Todos os grupos receberam no Dia 0, Fertilcare 1200<sup>®</sup>, associado ao tratamento com 2mg de benzoato de estradiol i.m. (FertilCare Sincronização<sup>®</sup>, Vallée, Brasil). No Dia 8 o dispositivo FertilCare1200<sup>®</sup> foi retirado, e 300 UI de eCG i.m. (Folligon<sup>®</sup>, MSD Saúde Animal, Brasil), 0,530 mg de Cloprostenol Sódico i.m. (Ciosin<sup>®</sup>, MSD Saúde Animal, Brasil) e 1 mg de Cipionato de Estradiol i.m. (E.C.P<sup>®</sup>, Zoetis Saúde Animal, Brasil) foram administrados. Todas as vacas foram submetidas à IATF 48 ou 54 horas após a retirada do dispositivo de P4 novo ou usado, de acordo com o grupo experimental. O diagnóstico de gestação foi realizado por ultrassonografia 30 dias após a IATF. Para vacas, tratadas com dispositivos novos, a taxa de prenhez foi semelhante quando a IATF foi realizada 48 ou 54 horas após a retirada do dispositivo [Novo-IATF 48a=44,6% (115/258) vs. Novo-IATF 54a=52,7% (128/243)]. Entretanto, para os dispositivos usados, a taxa de prenhez foi menor quando a IATF foi realizada 54 horas após a retirada do dispositivo [Usado-IATF 54b=39,1% (100/256) vs. Usado-IATF 48a=50,5% (140/277); P=0,004]. Conclui-se que para o dispositivo novo a IATF pode ser realizada 48 ou 54 horas após a retirada do dispositivo, entretanto, para o dispositivo usado a IATF deve ser realizada 48 horas da remoção do dispositivo.

Agradecimentos: RG Genética Avançada e MSD Saúde Animal.

**Palavras-chave:** Concentração de p4; vaca nelore; IATF

SBTE 069 IATF, TETF e IA

Número de Submissão 1667

**Impacto da dose de gonadotrofina coriônica equina (300 ou 400UI) e tempo de permanência do dispositivo de progesterona (8 ou 9 dias) no crescimento folicular em protocolos de IATF com vacas *Bos taurus* de corte**

Paula Finamor Velasquez<sup>1</sup>; Gilson Antonio Pessoa<sup>1</sup>; Isac Roman<sup>2</sup>; Izaías Claro Junior<sup>3</sup>; Cassio Aassal Brauner<sup>4</sup>; Fábio Gallas Leivas<sup>2</sup>; Daniela dos Santos Brum<sup>2</sup>; Marcio Nunes Correa<sup>4</sup>; Mara Iolanda Batistella Rubin<sup>1</sup>; Manoel Francisco Sá Filho<sup>5</sup>

1.Laboratório de Embriologia Animal (Embryolab), DCGA, CCR, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil; 2.Biotech, laboratório de biotecnologia da reprodução, UNIPAMPA Uruguaiana, RS, Brasil; 3.Zoetis Brasil, Campinas, SP, Brasil; 4.Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC), Pelotas, RS, Brasil; 5.Altas genetics, Uberaba, MG, Brasil.

Objetivou-se avaliar o efeito da dose (300 vs. 400 UI) de eCG (Novormon<sup>®</sup>, Zoetis), tempo de permanência do dispositivo intravaginal de progesterona (P4; 8d vs. 9d) e escore de condição corporal (ECC) no crescimento folicular e expressão de estro em vacas de corte. Neste estudo foram utilizadas 1.171 vacas taurinas (Hereford e Angus) ou cruzas (Braford e Brangus), multíparas e primíparas de corte lactantes, aos 45 ± 15d pós-parto e ECC médio de 2,8 ± 0,02 (Escala de 1 a 5; 1-magra a 5-obesa) provenientes de cinco fazendas de corte de três regiões distintas do Rio Grande do Sul. Ao início (D-1) do protocolo todas as vacas foram submetidas a exame ginecológico completo e os ovários avaliados por ultrassonografia (US) para determinar a ciclicidade. As fêmeas foram divididas em dois tratamentos: 9d (D-1, n=591) ou 8d (D0, n=580) de permanência da P4 (CIDR<sup>®</sup>, Zoetis) associado à 2mg de benzoato de estradiol (IM) (Gonadiol<sup>®</sup>, Zoetis). No dia 8, o CIDR foi removido e administrado 12,5 mg de dinoprost trometamina IM (Lutalyse<sup>®</sup>, Zoetis) e 1mg de cipionato de estradiol IM (E.C.P<sup>®</sup>, Zoetis). Neste momento, foram novamente distribuídas conforme o diâmetro folicular (DF) em dois tratamentos: 300 UI (n=605) ou 400 UI (n=566) de eCG. As fêmeas tiveram a base da cauda pintada com bastão marcador (Raidl-Maxi, Alemanha) na retirada da P4 como método de identificação do estro. Todas as fêmeas foram submetidas a IATF 48h após a remoção da P4 utilizando sêmen congelado de 24 touros. Duas doses de sêmen de cada partida foram avaliadas e somente partidas com motilidade progressiva mínima de 35% após descongelamento foram usadas. As fêmeas sem presença de tinta no momento da IATF foram consideradas em estro. Adicionalmente, 657 vacas [8d-300UI (n=162), 8d-400UI (n=159), 9d-300UI (n=174) e 9d-400UI (n=162)] tiveram o DF, no momento da retirada da P4 e na IA, mensurados. A US para avaliar ciclicidade (D-1) e DF foram realizadas com transdutor linear retal (5-10Mhz, Mindray

DP2200, Shenzhen, China). As fêmeas também foram categorizadas de acordo com o ECC em baixo [ $\leq 2,75$  (n=375)] ou alto [ $\geq 3,00$  (n=282)]. Os dados foram analisados pelo PROC GLIMMIX do SAS. A dose de eCG não influenciou na ocorrência de estro. As fêmeas com alto ECC tiveram maior ( $P < 0,0001$ ) expressão do estro (78,4%) do que as de baixo ECC (59,0%). O maior DF ( $P < 0,0001$ ) na retirada da P4 ( $9,9 \pm 0,2$  vs.  $9,2 \pm 0,1$  mm) e na IATF ( $12,6 \pm 0,2$  vs.  $11,8 \pm 0,2$  mm) foi no grupo 9d vs 8d, respectivamente. Não foi verificada diferença na taxa de crescimento folicular em relação ao tempo de permanência da P4. A dose de eCG não influenciou o DF na retirada, na IATF e a taxa de crescimento folicular. Não houve interação entre a classe de ECC e a duração do tratamento com P4 ( $P=0,2124$ ). Vacas com ECC  $\geq 3,00$  tiveram maior DF com 9d ( $10,54 \pm 0,3$  mm) comparado a 8d ( $9,33 \pm 0,3$  mm;  $P < 0,0001$ ), no entanto, em vacas com ECC  $\leq 2,75$  o DF foi semelhante na retirada da P4 quando permaneceu por 9d ( $9,12 \pm 0,3$  mm) ou 8d ( $8,59 \pm 0,3$  mm;  $P = 0,11$ ). O DF no momento da IA também foi maior no grupo ECC  $\geq 3,00$  foi de  $13,0 \pm 0,5$  mm enquanto o grupo ECC  $\leq 2,75$  foi  $11,3 \pm 0,5$  mm ( $P < 0,0001$ ). A taxa de crescimento folicular foi menor ( $P = 0,03$ ) nas vacas com ECC  $\leq 2,75$  ( $1,25 \pm 0,2$  mm/dia) comparadas às vacas com ECC  $\geq 3,00$  ( $1,5 \pm 0,2$  mm/dia). Conclui-se que a expressão de estro e o DF ao final do tratamento de sincronização da ovulação para IATF são afetados pelo ECC. Não houve diferença entre as doses de 300 ou 400 UI de eCG na expressão de estro e no crescimento folicular.

Agradecimentos: CAPES; Zoetis e Fazendas Nova Querência, Posto Branco, Geobel, Retiro, Nova Aurora e Santa Carmen  
**Palavras-chave:** Vacas de corte; IATF; diâmetro folicular

SBTE 070 IATF, TETF e IA

Número de Submissão 1670

**IATF de acordo com o diâmetro do folículo pré-ovulatório, em protocolo de quatro manejos**

Mariana Cesca Piva<sup>1</sup>; Marco Antonio Gomes de Freitas Santos<sup>1</sup>; Denner Alex Sander dos Santos<sup>1</sup>; Andrei Antonioni Fidelis<sup>1</sup>; Ivo Pivato<sup>2</sup>

1. *UPIS, Brasília, DF, Brasil*; 2. *UNB, Brasília, DF, Brasil*.

A inseminação artificial em tempo fixo (IATF) é uma ferramenta disponível para pecuária de corte que otimiza toda a cadeia produtiva. Os índices de gestação variam em decorrência de vários aspectos, sendo o tamanho do folículo pré-ovulatório um fator de grande importância. Natália Castro e colaboradores, em 2015, constataram um aumento significativo na taxa de prenhez de vacas nelore quando utilizaram protocolos de 3 manejos e dividiram os grupos a serem inseminados em 4 momentos distintos, de acordo com o diâmetro do folículo pré-ovulatório (FPO). O objetivo deste estudo foi avaliar a taxa de prenhez em programas de IATF em animais da raça Nelore, divididos em dois blocos, de acordo com o diâmetro do folículo, em protocolo de quatro manejos. Foram utilizadas 571 vacas, dentre as quais 375 vacas lactantes (escore de condição corporal médio: 2,52) e 196 novilhas (2,48), submetidas a um protocolo de IATF. No dia 0, todas as vacas receberam implante intra-vaginal de progesterona (1,9g) associado com 2 mg de benzoato de estradiol. No dia 7, foram administrados 500 µg de d-Cloprostenol. No dia 9 aplicou-se 1mg de cipionato de estradiol, 300 UI de ECG e foi retirado o implante de progesterona. Após 48 horas da remoção do implante, as vacas foram aleatoriamente separadas em dois grupos: grupo controle (n=270) e grupo com medição de folículo (n=301). Foi iniciada a avaliação ultrassonográfica do grupo com medição de folículo (8:00, dia 11), e, de acordo com o diâmetro do FPO, as vacas foram inseminadas em dois momentos distintos: FPO  $\geq 14$  mm, inseminadas às 8:00 (n=61) e FPO  $< 14$  mm (n=240) às 18:00. A inseminação do grupo controle ocorreu às 9:30 do mesmo dia. O diagnóstico de gestação foi realizado 36 dias após a IATF através de exame ultrassonográfico. As análises estatísticas foram feitas pelo programa Prophet 5.0. O diâmetro médio dos FPO e a taxa de gestação foram submetidos à análise de variância com o teste de Kruskal-Wallis. Ao comparar o grupo controle com o grupo com medição do folículo, em vacas, não houve variação significativa ( $p > 0,05$ ) na taxa de prenhez (controle=56,7% (97/171); com medição=56,8% (116/204)). Em novilhas, houve um comportamento estatisticamente similar, com taxa de prenhez de 32% (43/99) para o grupo com medição e 43,4% (31/97) para o controle. A utilização da análise do diâmetro de FPO, nas condições do presente experimento, não apresentou ganhos significativos nos resultados de taxa de gestação quando comparada à IATF tradicional.

**Palavras-chave:** Bovinos; biotecnologias; fertilidade

SBTE 071 IATF, TETF e IA

Número de Submissão 1671

**Exame ultrassonográfico e sorológico para o diagnóstico precoce da gestação em bovinos: resultados preliminares**

Cristiano Rodrigues Borges Guimarães<sup>1</sup>; Marcelo Ribeiro de Mendonça<sup>1</sup>; Carlos Antônio de Carvalho Fernandes<sup>1</sup>; José Antonio D. Garcia<sup>1</sup>; Ester Siqueira Caixeta<sup>1</sup>; Jairo Pereira Neves<sup>1</sup>; João Henrique Moreira Viana<sup>1</sup>; Miller Pereira Palhão<sup>2</sup>

1. *UNIFENAS, Alfenas, MG, Brasil*; 2. *EMBRAPA, Juiz de fora, MG, Brasil*.

O estudo foi planejado para correlacionar exames ultrassonográficos e sorológicos realizados para o diagnóstico precoce (20 a 30d) de gestação em receptoras de embrião bovino. Cento e vinte (n = 120) receptoras foram sincronizadas (estro = D0) e os embriões frescos produzido in vitro (Biotran IVPP Lab LTDA) transferidos em tempo fixo (TET, em torno D7). No Experimento 1 (n = 46), o diagnóstico de gestação foi realizado no D21, pela detecção do fluxo sanguíneo do CL com a ultrassonografia em Doppler colorido (Guimarães et al., Theriogenology 2015) e pela pesquisa sorológica das

Glicoproteínas Associadas a Gestação (PAGs, IDEXX Visual Pregnant teste, IDEXX Laboratories Inc.). Para o experimento 2 (n = 30), realizado no dia 25, a visualização do conteúdo do útero pela ultrassonografia e também a sorologia para PAGs foram usados para detectar a gestação. Por último, a sorologia para PAGs foi realizada no D30 do experimento 3. Em todos os experimentos, o diagnóstico ultrassonográfico da vesícula gestacional foi realizado no dia 30 (DG30) e, considerado o padrão "OURO". O procedimento PROC FREQ do SAS foi utilizado para testar o nível de concordância entre os métodos diagnósticos utilizados em cada experimento com o DG30. O método sorológico de diagnóstico aumentou consideravelmente (6,3 para 100%) sua sensibilidade (correta detecção de não gestantes) do D21 para o D25, sendo mantida elevada no D30 (100%). No entanto, sua especificidade (correta detecção de gestantes) se mostrou pequenas flutuações (86,7, 84,6 e 81,8%) nos diagnósticos do D21, 25 e 30, respectivamente. Estes dados demonstraram possível aumento das concentrações séricas de PAGs após dia 20. Os exames ultrassonográficos também alteraram sua sensibilidade (100 e 88,2%) e especificidade (53,3 e 92,3%), respectivamente, nos dias 21 e 25. A tecnologia Doppler demonstrou inclusive em outros estudos seu potencial para detectar animais não gestantes no D21, mas a especificidade do exame é altamente relacionada à taxa de prenhez do rebanho, e este índice foi baixo (34,8%, 16/46) no experimento 1. O conteúdo gestacional pôde ser visualizado na maioria das vezes no D25, no entanto, a sensibilidade de 88,2% deste exame nesta fase refletiu duas receptoras gestantes em que o conteúdo uterino não foi visualizado. Estes animais apresentaram sorologia positiva para PAGs. Situação oposta ocorreu no D30, onde o exame ultrassonográfico detectou a perda gestacional enquanto a sorologia para PAG se manteve positiva. A conclusão é de que o teste sorológico tem maior acurácia após o dia 21 (93,3 e 90,9%, D25 e D30, respectivamente) e o diagnóstico ultrassonográfico melhorar gradualmente sua acurácia a partir do D21 (69,6 e 90,0%, respectivamente, D21 e D25). Além disso, no D25, a combinação de ambos os métodos (PAGs e ultrassonografia) pode melhorar a precisão geral (96,7%) do diagnóstico. Os níveis séricos de PAGs após a perda gestacional podem reduzir a especificidade do teste sorológico.

Agradecimentos: Biotran, FAPEMIG e CNPq.

**Palavras-chave:** Doppler colorido; PAGs; receptoras de embrião

SBTE 072 IATF, TETF e IA

Número de Submissão 1672

#### **Comparação entre DIB monodose e CIDR na taxa de prenhez de novilhas nelore precoce submetidas à IATF**

Everton Rodolfo Carvalho<sup>1</sup>; Adnan Darin Pereira Rodrigues<sup>2</sup>; Izaias Claro Junior<sup>1</sup>; Jose Luiz Moraes Vasconcelos<sup>2</sup>

*1.ZOETIS, São paulo, SP, Brasil; 2.UNESP, Botucatu, SP, Brasil.*

Introduzir novilhas Nelore na monta aos 14 meses de idade tem se tornado uma estratégia para aumentar a produtividade nas fazendas de cria no Brasil. Alguns fatores como peso, genética, ciclicidade e o tipo de protocolo podem interferir nos resultados. O presente estudo teve como objetivo principal avaliar a taxa de prenhez em novilhas Nelore precoces submetidas à IATF, sincronizadas com diferentes dispositivos de progesterona (P4). O estudo foi realizado em 3 diferentes fazendas (A, B e C) no estado do Mato Grosso, totalizando 860 novilhas Nelore com idade média de  $15,1 \pm 2,1$  meses. Todos os animais foram previamente induzidos à ciclicidade com dispositivo de P4 e 12 dias depois IATF como descrito em Rodrigues et al., 2014. No D0 do protocolo as novilhas foram distribuídas aleatoriamente para receberem os seguintes tratamentos: 1) CIDR1: CIDR de 1º uso; 2) CIDR4: CIDR de 3º ou 4º uso; 3) DIB0,5N: DIB0,5 e 4) DIB0,5: DIB0,5 (Zoetis, SP, Brasil), mais 2,0 mg de Benzoato de Estradiol im (2,0 ml de Gonadiol®, Zoetis, SP, Brasil) no; no D7 administração de 12,5 mg de PGF2α im (2,5 mL de Lutalyse®, Zoetis, SP, Brasil); no D9 a retirada do dispositivo com aplicação de 0,5 mg de Cipionato de Estradiol im (0,3 mL de ECP®, Zoetis, SP, Brasil) e 1,0ml de Novormon (200UI de eCG, Novormon, Zoetis, Brasil) nos tratamentos CIDR1 e DIB0,5N; e IA no D11. Na fazenda A as novilhas foram tratadas na ressincronização (2ª IATF). Foi avaliada a ciclicidade em 472 novilhas 12 dias após a indução/início do protocolo de IATF, onde 54,0% tinham presença de CL na ultrassonografia. O diagnóstico de gestação foi confirmado 30 dias após a IATF. A Prenhez/IA (P/IA) foi determinada dividindo o número de vacas gestantes pelo número de vacas inseminadas. As variáveis aleatórias foram analisadas no PROC GLIMMIX do programa SAS. Interações com valor de  $P > 0,2$  foram removidas do modelo inicial. Não houve interações entre fazendas, lotes, touros ou inseminadores na taxa de prenhez. Não houve interação entre ciclicidade e os tratamentos na P/IA, novilhas com presença de CL tiveram prenhez semelhante às novilhas sem CL (39,2% 85/217; 35,7% 91/255, respectivamente). A P/IA nas novilhas dos tratamentos 1, 2 e 3 (36,4% 78/214; 39,0% 84/215 e 44,3% 61/208, respectivamente) foram semelhantes e maiores que no tratamento 4 (29,3% 61/208). Conclui-se que a P/IA de novilhas Nelore precoces sincronizadas com DIB0,5 ou CIDR são semelhantes, no entanto, com a utilização de um implante de P4 novo é necessário a adição de eCG ao protocolo.

**Palavras-chave:** CIDR; DIB0,5; IATF

SBTE 073 IATF, TETF e IA

Número de Submissão 1674

#### **Análise da percepção de fatores de risco para a saúde coletiva na utilização de hormônios em programas de reprodução assistida em bovinos**

Gisele Zoccal Mingoti<sup>1</sup>; Diego Lobon Jimenez Filho<sup>1</sup>; Antonio Ferraudo<sup>1</sup>; Beatriz Caetano da Silva Leão<sup>1</sup>; Nathália Alves de Souza Rocha-Frigoni<sup>1</sup>; Eriklis Nogueira<sup>2</sup>; Iveraldo Santos Dutra<sup>1</sup>

1.UNESP, Aracatuba, SP, Brasil; 2.EMBRAPA Pantanal, Corumbá, MS, Brasil.

Nos últimos anos houve um aumento pronunciado na aplicação de protocolos hormonais em programas de reprodução bovina assistida. Devido ao intenso uso de hormônios exógenos, é imprescindível que haja conhecimento técnico para a correta utilização destes, respeitando-se períodos de carência na carne e no leite, bem como cuidados na manipulação desses fármacos. O objetivo deste estudo foi avaliar o conhecimento e a percepção de risco dos criadores de bovinos e médicos veterinários na utilização de hormônios em programas de reprodução bovina assistida, bem como determinar os possíveis riscos ocupacionais. O método empregado no presente estudo foi de pesquisa participativa por meio de entrevistas pessoais para coleta de dados. Foram entrevistados 65 criadores e 40 médicos veterinários em 50 municípios brasileiros de 10 Estados (SC, PR, SP, MG, MS, MT, GO, RO, AC e RR). Para agrupamento e análise dos dados relacionados à percepção de risco e práticas reprodutivas foram considerados fatores socioeconômicos como: escolaridade, número de animais, biotécnicas reprodutivas utilizadas, tempo de utilização das biotécnicas e tempo na atividade. Como fatores de percepção de risco foram utilizadas as variáveis: assistência veterinária, conhecimento dos períodos de carência de pelo menos dois hormônios em uso na propriedade, treinamento sobre a manipulação dos hormônios, utilização de equipamentos de proteção individual (EPI) para manipulação dos hormônios e conhecimento do grupo de pessoas que não devem manipular os hormônios. A exploração das correspondências entre os fatores socioeconômicos e a percepção de risco foi realizada por meio da análise de correspondência múltipla e frequência, utilizando-se o software Statistica 7. A totalidade dos criadores entrevistados afirmou que as lojas não exigem receita veterinária para a venda dos hormônios. O período de carência é desconhecido por 69,2% dos criadores e por 65% dos médicos veterinários. O uso de EPI (em geral, apenas luvas) é adotado por 56,9% dos criadores e 92,5% dos médicos veterinários. O grupo de pessoas inaptas a manipular hormônios era conhecido por 21,5% dos criadores e 62,5% dos médicos veterinários. Houve associação positiva entre os criadores com "possui ensino superior" e "tempo na atividade menor que 5 anos" com a variável "conhece o grupo de pessoas que não devem manipular os hormônios" ( $P < 0,01$ ). Houve associação positiva entre médicos veterinários entre o fator socioeconômico "período de tempo na atividade (mais de 11 anos)" com a variável "conhece o período de carência" ( $P = 0,04$ ). Outras associações identificadas entre os fatores de risco foram "não conhece riscos para a saúde" com "não orienta seus auxiliares sobre os riscos ocupacionais" ( $P < 0,01$ ) e com "não orienta seus auxiliares sobre o uso de EPI" ( $P < 0,001$ ). Conclui-se que existe falta de informação entre criadores e médicos veterinários acerca do período de carência dos hormônios, sobre a importância do uso de EPI durante a manipulação dos fármacos e sobre o grupo de pessoas que não devem manipular hormônios, o que indica maior vulnerabilidade em questões de saúde do profissional.

Agradecimentos: CNPq

**Palavras-chave:** Hormônios; biotecnologia reprodutiva; risco ocupacional

SBTE 074 IATF, TETF e IA

Número de Submissão 1675

**Dose de gonadotrofina coriônica equina (300 ou 400UI) e tempo de permanência (8 ou 9 dias) do dispositivo de progesterona em protocolos de IATF com vacas *Bos taurus* de corte lactantes: impacto na ocorrência de estro e na taxa de prenhez**

Isac Roman<sup>1</sup>; Fábio Gallas Leivas<sup>1</sup>; Giovane Wolffenbüttel Carloto<sup>1</sup>; Gilson Antonio Pessoa<sup>2</sup>; Cassio Cassal Brauner<sup>3</sup>; Lucas Balinhas Farias<sup>3</sup>; Mara Iolanda Batistella Rubin<sup>2</sup>; Izaías Claro Junior<sup>4</sup>; Daniela dos Santos Brum<sup>1</sup>; Manoel Francisco Sá Filho<sup>5</sup>

1.Biotech, laboratório de biotecnologia da reprodução, UNIPAMPA, Uruguaiana, RS, Brasil; 2.Laboratório de Embriologia Animal (Embryolab), DCGA, CCR, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil; 3.Núcleo de pesquisa, ensino e extensão em pecuária (NUPEEC), Pelotas, RS, Brasil; 4.Zoetis Brasil, campinas, sp, brasil; 5.Altas Genetics do Brasil, Uberaba, MG, Brasil.

Avaliou-se o efeito de diferentes doses de gonadotrofina coriônica equina (300 ou 400UI de eCG) em protocolos de IATF com 8 ou 9 dias de permanência do dispositivo de progesterona (P4) sobre a taxa de ocorrência de estro e taxa de prenhez, em vacas de corte taurinas lactantes. Foram utilizadas 1171 vacas com escore de condição corporal de  $2,81 \pm 0,48$  (escala 1-5), oriundas de seis fazendas comerciais localizadas em três regiões distintas do estado do RS e mantidas à pasto. Ao início do protocolo as vacas foram divididas em dois tratamentos: 9d (D-1, n=591) ou 8d (D0, n=580) de permanência do dispositivo de progesterona (P4, CIDR®, Zoetis) associado à 2mg de benzoato de estradiol (IM; Gonadiol®, Zoetis). No dia 8, o CIDR foi removido e administrado 12,5 mg de dinoprosttrometamina IM (Lutalyse®, Zoetis) e 1mg de cipionato de estradiol IM (E.C.P.®, Zoetis). Neste momento, as vacas foram novamente distribuídas em dois tratamentos: 300 UI (n=605) ou 400 UI (n=566) de eCG (Novormon®, Zoetis), formando então 4 tratamentos D8300UI (n=303), D8400UI (n=277), D9300UI (n=302) e D9400UI (n=289). A 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, RaidexGmbH, Dettingen/Erms, Germany) no momento da retirada do dispositivo de P4, sendo as fêmeas que não apresentavam tinta no momento da IATF consideradas em cio. A análise estatística foi realizada pelo PROC GLIMMIX do SAS®. Houve interação entre a permanência do dispositivo e a dose de eCG ( $P = 0,06$ ). Quando a dose de eCG foi de 300 UI, as fêmeas tratadas por 8 dias (60,4%) tiveram menor

ocorrência de estro do que as fêmeas tratadas com 9 dias (70,86%). Fêmeas tratadas com 400 UI de eCG, independente da duração do tratamento com P4 tiveram taxas intermediárias (D8 = 66,8% e D9 = 68,9%). Em relação à taxa de prenhez, houve tendência de interação ( $P = 0,10$ ) entre a duração do tratamento de P4 e a dose de eCG [D8-300UI (40,3%), D8-400UI (45,9%), D9-300UI (45,0%) e D9-400UI (42,2%)]. Conclui-se que fêmeas tratadas com P4 durante 8 dias com dose de 300 UI de eCG reduz a taxa de ocorrência de estro e tende a reduzir a taxa de prenhez.

Agradecimentos: Zoetis, Estância Retiro, Estância Santa Carmen, Estância Nova Aurora, Fazenda Nova Querência, Agropecuária Posto Branco e Invernada Retiro.

**Palavras-chave:** ECG; IATF; *Bos taurus*

SBTE 075 IATF, TETF e IA

Número de Submissão 1677

**Dinâmica folicular de vacas nelore submetidas à ressincronização 14 dias após IATF utilizando P4 injetável para sincronização da onda folicular**

Romulo Germano Rezende<sup>1</sup>; Bruno Gonzalez de Freitas<sup>1</sup>; Rodolfo Daniel Mingoti<sup>1</sup>; Marcos Henrique Alcantara Colli<sup>1</sup>; Manoel Francisco Sá Filho<sup>2</sup>; João Batista Pereira Carvalho<sup>3</sup>; Jessica Cristina Lemos Motta<sup>1</sup>; Gustavo Guerino Macedo<sup>4</sup>; Lais Mendes Vieira<sup>1</sup>; Pietro Sampaio Baruselli<sup>1</sup>

1.Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil; 2.Alta Genetics, Uberaba, MG, Brasil; 3.Polo Regional Agencia Paulista dos Agronegocios, Pindamonhangaba, SP, Brasil; 4.Universidade Federal de Uberlandia, Uberlandia, MG, Brasil.

O tratamento com estrógeno no protocolo de ressincronização induziu a regressão prematura do CL e comprometeu a taxa de concepção quando administrado 13 dias após a IATF (Vieira et al., 2015 SBTE). O objetivo do presente estudo foi avaliar a dinâmica folicular de vacas Nelore submetidas a tratamento somente com progesterona no dia 14 após a IATF, para sincronização de uma nova onda de crescimento folicular a partir da regressão do folículo dominante LH dependente. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos experimentais: 1) Controle (n=11): sem tratamento hormonal; 2) Dispositivo P4 (n=10): apenas um dispositivo intravaginal contendo 1,0 g de P4 (DP4) (Cronipress Monodose<sup>®</sup>, Biogenes Bagó, Brasil); 3) P4-200 (n=11): DP4 associado a 200mg IM de progesterona injetável (Progestar<sup>®</sup>, Syntex - Argentina) e 4) P4-100 (n=9): DP4 associado a 100mg IM de P4 injetável (Afisterone<sup>®</sup>, Hertape-Calier, Brasil). Entre o D14 e D22, a cada 24 horas, os animais tiveram seus ovários escaneados por ultrassonografia (Mindray<sup>®</sup>, DP-2200Vet) e mapeados para determinar o momento da emergência da nova onda de crescimento folicular, os dados foram analisados utilizando PROC GLM e teste de BARTLEY do software SAS 9.3. Não foram observadas diferenças significativas ( $P=0,02$ ) entre os grupos Controle, DP4, P4-200 e P4-100 para: taxa de emergência da nova onda de crescimento folicular (82% vs 50% vs 73% vs 72%), dia de emergência da nova onda de crescimento folicular ( $16,8 \pm 0,54$  vs  $15,6 \pm 0,67$  vs  $16,8 \pm 0,52$  vs  $17,1 \pm 0,26$  dias;) e diâmetro do folículo dominante no dia da retirada do DP4 (8,7 vs 10,24 vs 10,6 vs 9,6 mm). O grupo P4-100 apresentou numericamente menor dispersão da emergência da nova onda de crescimento folicular. Esses resultados são indicativos de que é possível realizar a ressincronização 14 dias da IATF somente com progesterona em vacas Nelore. A adoção dessa metodologia de ressincronização pode reduzir o intervalo entre IATF e aumentar consideravelmente a taxa de serviço.

**Palavras-chave:** IATF; ressincronização; progesterona

SBTE 076 IATF, TETF e IA

Número de Submissão 1678

**Impacto da utilização de vacinas reprodutivas e da indução a ciclicidade na prenhez à IATF de novilhas de corte Bos taurus**

Hirya Fernandes Pinto<sup>1</sup>; Giovane Wolffenbüttel Carloto<sup>1</sup>; Cecília Isabel Inês Urquiza Falcão Machado<sup>1</sup>; Bibiana Noal Ribas<sup>1</sup>; Daniela dos Santos Brum<sup>1</sup>; Ana Paula Martini<sup>2</sup>; Gilson Antonio Pessoa<sup>2</sup>; Mara Iolanda Batistella Rubin<sup>2</sup>; Manoel Francisco Sá Filho<sup>3</sup>; Fábio Gallas Leivas<sup>1</sup>

1.Biotech, laboratório de Biotecnologia da Reprodução, UNIPAMPA, Uruguai, RS, Brasil; 2.Laboratório de Embriologia Animal (Embryolab), DCGA, CCR, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil; 3.Alta Genetics do Brasil, Uberaba, MG, Brasil.

Este estudo avaliou o efeito da indução da ciclicidade e de vacinas reprodutivas sob a taxa de prenhez e perdas gestacionais em novilhas taurinas de corte aos 30, 90 e 120 dias após IATF. Foram utilizadas 913 novilhas taurinas (20-26 meses) criadas a campo no estado do RS. Cinquenta dias antes da estação reprodutiva as novilhas foram avaliadas e classificadas como cíclicas (presença de CL; n=551) e acíclicas (sem presença de CL; NCL, n=361). As novilhas NCL foram divididas em 2 grupos: submetidas à protocolo de indução de ciclicidade (NCL/ P4, n=188) ou não (NCL/NP4, n=173). Cada grupo foi subdividido aleatoriamente onde as fêmeas foram, ou não, tratadas com vacinas reprodutivas (Vacinadas = Vac; n=460 e Não Vacinadas = NVac; n=452). O protocolo de indução da ciclicidade consistiu da inserção de um dispositivo intravaginal contendo 1g de P4 (Cronipress Mono Dose M24, Biogéneses Bagó, SP, BR) durante dez dias. Na retirada foi administrado 0,5mg/IM de CE (Croni-CIP, Biogéneses Bagó, SP, BR) e os grupos CL/Vac (n=280), NCL/P4/Vac (n=93) e NCL/NP4/Vac (n=84), receberam a 1ª dose das vacinas reprodutivas (Bioabortogen H e Bioleptogen, Biogéneses Bagó,

SP, BR). No D-10 iniciou-se o protocolo de IATF com a inserção de um dispositivo intravaginal contendo 1g de P4 (Cronipress Mono Dose M24, Biogéneses Bagó, SP, BR), aplicação de 2mg/IM de BE (Bioestrogen, Biogéneses Bagó, SP, BR) e 0,15mg/IM de D-cloprostenol (Croniben, Biogéneses Bagó, SP, BR), assim como a 2ª dose das vacinas reprodutivas. No D-2 o dispositivo foi removido e administrados 300UI/IM de eCG (Ecegon, Biogéneses Bagó, SP, BR), 0,5mg/IM de CE (Croni-CIP, Biogéneses Bagó, SP, BR) e 0,15mg/IM D-cloprostenol (Croniben, Biogéneses Bagó, SP, BR). A IATF foi realizada após 48h e a estação reprodutiva seguiu-se até completar 90 dias com monta natural ou resincronização. O diagnóstico de gestação foi realizado aos 30, 90 e 120 dias após a IATF. Os dados foram comparados entre os grupos por qui-quadrado ( $P < 0,05$ ). A taxa de prenhez em relação à indução de ciclicidade foi semelhante entre os grupos NCL/P4 (44,6%, 78,1% e 80,8%) e NCL/NP4 (38,1%, 75,7% e 79,1%), respectivamente aos 30, 90 e 120 dias. A taxa de prenhez de novilhas acíclicas, foi semelhante entre os grupos NCL/P4/Vac (43,0%, 77,4%, e 82,7%), NCL/P4/NVac (46,3%, 78,9% e 78,9%), NCL/NP4/Vac (42,5%, 78,1% e 78,1%) e NCL/NP4/NVac (33,7%, 73,2% e 80,2%). Apesar da taxa de prenhez em novilhas cíclicas e acíclicas vacinadas ter sido semelhante (Vac: 49,0%, 81,7% e 83,5%; vs NVac 47,3%, 80,7% e 81,8%), a perda gestacional entre 30 e 120 dias foi inferior no grupo que recebeu a vacina 8,4% (19/207) quando comparado ao que não recebeu vacina 15,42% (33/181). Portanto, a indução a ciclicidade em novilhas acíclicas, antes da estação reprodutiva, não influenciou a taxa de prenhez, porém o uso de vacinas reprodutivas antes do programa IATF, reduziu a perda gestacional dos 30 aos 120 dias. Agradecimentos: Biogéneses Bagó, São Paulo, Brasil.

**Palavras-chave:** Indução ciclicidade; vacinas reprodutivas; novilhas

SBTE 077 IATF, TETF e IA

Número de Submissão 1682

#### **Impacto do desempenho de touros nos programas de IATF**

Ricardo Olimpio Schenatto<sup>1</sup>; Janislene Mach Trentin<sup>1</sup>; Julia Brum Spreckelsen Casarin<sup>2</sup>; Mariani Farias Fiorenza<sup>1</sup>; Laurence Boligon de Araujo<sup>2</sup>; Taison Souza Balestrin<sup>2</sup>; Nayrema Maciel<sup>2</sup>; Ana Paula Martini<sup>2</sup>; Gilson Antonio Pessoa<sup>1</sup>; Mara Iolanda Batistella Rubin<sup>2</sup>

1. *Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil*; 2. *UFMS, Santa Maria, RS, Brasil*.

A inseminação artificial em tempo fixo (IATF) se tornou uma das principais biotecnologias reprodutivas de impacto econômico na produção de bovinos de corte, pois permite a utilização em massa de touros com características produtivas desejáveis. Dados de 5793 IATFs realizadas em fêmeas taurinas ou cruzas durante o período de 2012 a 2015 em 5 rebanhos na região central do Rio Grande do Sul foram utilizados neste estudo. O protocolo consistiu na aplicação de 2,0 mg de Benzoato de estradiol IM (Gonadiol®, Zoetis ou RIC-BE®, Agener União, Brasil) no primeiro dia do protocolo (D0) juntamente com um dispositivo intravaginal de P4 (Primer 1g, Agener União ou DIB 1g, Zoetis; Brasil). Após 9 dias (D9) o dispositivo de P4 foi removido e aplicado via IM 0,5mg de D-cloprostenol (Prolise, Agener União, Brasil) ou 12,5 mg de Dinoprost Trometamina (Lutalyse, Zoetis, Brasil) e 1 mg de cipionato de estradiol (ECP, Zoetis, Brasil) via IM. A inseminação foi realizada 48h após remoção da progesterona. As vacas foram submetidas a exame ultrassonográfico 30 dias após a IA. Os touros taurinos e cruzas (n=25) utilizados obedeceram o critério de distribuição uniforme entre os lotes de IATF. Somente foram incluídos na análise os touros com no mínimo 50 inseminações. A análise do desempenho dos touros na P/IA foi realizada por meio de modelo misto utilizando o procedimento PROC GLM do pacote estatístico SAS 9.3®, sendo considerados efeitos fixos: grupo racial (taurino ou cruzado), escore de condição corporal, dispositivo de progesterona (novo ou usado), inseminador, touro e ordem de parto (núlpara, primípara e múltípara). Como efeito aleatórios foram considerados fazenda, lote e ano. Não foi verificado efeito da raça do touro nas taxas de P/IA. A taxa média de P/IA foi de 52,7%, sendo que 52% (13/25) dos touros mantiveram-se acima e 48% (12/25) abaixo da taxa média de P/IA. O touro com menor desempenho obteve taxa de prenhez de 39,4% e o touro com maior taxa de prenhez foi 85,4%. Os touros (n=12) com baixo desempenho, a média foi de  $44,2 \pm 1,1\%$  de P/IA. Já os touros (n=13) acima da média tiveram desempenho de  $60,6 \pm 2,9\%$  de P/IA, sendo as médias significativamente diferentes ( $P < 0,0001$ ). A escolha de touros com selos de melhor desempenho em programas de IATF deve ser preconizada. Além disso, pesquisas devem ser realizadas para buscar testes laboratoriais que permitam identificar com precisão os touros que terão desempenho superior em programas de IATF.

**Palavras-chave:** Inseminação artificial; sêmen; prenhez

SBTE 078 IATF, TETF e IA

Número de Submissão 1684

#### **Uso de suplementação mineral injetável de glicerofosfato de sódio, fosfato monossódico e selenito de sódio durante o protocolo de sincronização da ovulação na concepção de fêmeas Nelore**

Gustavo Guerino Macedo<sup>1</sup>; Bruno Sivieri Lima<sup>2</sup>; Renato Wihby Giroto<sup>3</sup>; Luciana Ribeiro Peixoto<sup>1</sup>; José Luiz Baldassari Leite Neto<sup>3</sup>; Althuir Arthur Schneider<sup>3</sup>; Arthur Guerra Silva<sup>3</sup>; Giovani Pastre<sup>2</sup>; Luc Durel<sup>2</sup>; Tatiane Silva Maia<sup>1</sup>

1. *UFU, Uberlândia, MG, Brasil*; 2. *Virbac, Jurubatuba, SP, Brasil*; 3. *RG Genética, Água Boa, MT, Brasil*.

A deficiência de Fósforo constitui um dos mais sérios problemas da Nutrição de Ruminantes, pois os altos níveis de Ferro e Alumínio presentes nas pastagens brasileiras, aumentam a deficiência do referido elemento por formarem complexos insolúveis, impedindo a correta absorção deste mineral. A baixa oferta de Fósforo ao animal pode aumentar a incidência de ciclos irregulares, cistos foliculares e do grau de anestro, grande problema observado em fêmeas bovinas. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação mineral injetável de Glicerofosfato de sódio (1.40 g/10mL), Fosfato monossódico (2.01 g/10mL) e Selenito de sódio (0.024 g/10mL) (Fosfosal®, Virbac Saúde animal, Brasil) sobre o desempenho reprodutivo de fêmeas Nelore submetidas à IATF. O trabalho foi realizado em três fazendas comerciais de gado de corte no estado do Mato Grosso, Brasil. O grupo experimental consistiu em 809 fêmeas Nelore, incluindo 266 novilhas (idade média 24, ECC médio = 2,97), 253 vacas primíparas (ECC = 2,56) e 290 vacas multíparas (ECC = 3,16). Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos, controle (CON, n = 404) ou tratamento (FOS, n = 405). Todos os animais foram submetidos ao mesmo protocolo de sincronização da ovulação, sendo: Dia D0 - inserção de dispositivo intravaginal de P4 (DIB®, Zoetis, Brasil), injeção de 2,0 mg de benzoato de estradiol i.m. (Gonadiol®, Zoetis, Brasil) e; Dia D8 - remoção do dispositivo P4, injeção de 300 UI de eCG i.m. (Folligon®, MSD, no Brasil), 1,0 mg i.m. estradiol cipionato (ECP®, Zoetis, Brasil), 0,500 mg i.m. cloprostenol (Ciosin®, MSD, Brasil); D10 Day - IA. Os animais do grupo de FOS, receberam 10 mL Fosfosal® i.m. em D0 e D8. As taxas de concepção após a primeira inseminação artificial foram os principais critérios considerados no estudo. Os dados foram analisados utilizando proc GLIMMIX SAS e considerados significativos quando  $p < 0,05$ . Não houve interação do tratamento com touro, lote de paleta de sêmen e inseminador. Houve interação entre tratamento e categoria ( $p = 0,04983$ ). As fêmeas multíparas apresentaram maior concepção / IA (CON = 62% a; FOS = 62% a), seguido de novilhas (CON = 56% b; FOS = 61% a) e primíparas (CON = 47% b; FOS = 53% ab). A suplementação mineral injetável de novilhas e vacas primíparas no protocolo de sincronização, resulta em taxas de concepção numericamente superiores em animais tratados, com resultados 10% e 15% superiores para novilhas e primíparas, respectivamente. Em primíparas as taxas de concepção suplementados foi semelhante à observada em vacas adultas. A suplementação Injetável com Glicerofosfato de sódio, Fosfato monossódico e Selenito de sódio deve ser considerada nos programas de IATF em novilha e primíparas.

**Palavras-chave:** IATF; suplemento mineral; nutrição

SBTE 079 IATF, TETF e IA

Número de Submissão 1686

**Taxa de prenhez de vacas nelore submetidas à ressincronização com início 14 ou 22 dias após prévia IATF**

Luciano Penteado<sup>1</sup>; Romulo Germano Rezende<sup>2</sup>; Rodolfo Daniel Mingoti<sup>2</sup>; Marcos Henrique Alcantara Colli<sup>2</sup>; Manoel Francisco Sá Filho<sup>3</sup>; Felipe Barbosa Santos<sup>2</sup>; Jessica Cristina Lemos Motta<sup>2</sup>; Bernardo Marcozzi Bayeux<sup>2</sup>; Lais Mendes Vieira<sup>2</sup>; Pietro Sampaio Baruselli<sup>2</sup>

1.FIRMASA, Londrina, PR, Brasil, 2.Universidade DE São Paulo, São Paulo, SP, Brasil; 3.Altas Genetics, Uberaba, MG, Brasil.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a taxa de prenhez à ressincronização 14 dias comparada a ressincronização com 22 dias após a IATF. No presente trabalho (experimento 1), 244 vacas Nelore lactantes que receberam a primeira IATF (Dia 0) foram submetidas a dois programas de ressincronização: Grupo Ressinc-14 (ECC = 3,0; N=118) e Grupo Ressinc-22 (ECC = 3,0; N=126). No grupo Ressinc-14, no Dia 14 foi realizada a inserção do dispositivo intravaginal de progesterona (DP4), associado ao tratamento com 100 mg de P4 injetável (Afisterone, HertapeCalier). No dia 22 foi realizado o diagnóstico de gestação através da funcionalidade do CL por ultrassonografia modo Collor Doppler (Mindray M5Vet, DPS São Paulo). As vacas que possuíam CL com baixa ou ausência de vascularização ou CL foram considerados não gestantes, e então realizada a remoção do DP4, seguida de administração de 150 µg de D-cloprostenol (Veteglan Luteolítico, HertapeCalier), 1mg de CE (Cipionato HC, HertapeCalier) e 300UI de eCG. A IATF foi realizada 48 horas após a retirada do DP4 (Dia 24). As vacas consideradas gestantes pelo diagnóstico de gestação por Collor Doppler foram avaliadas 8 dias após para avaliar quantidade de falso positivos. No grupo Ressinc-22, no Dia 22 foi realizada a inserção do DP4, seguido de aplicação de 2mg de BE (Benzoato HC, HertapeCalier); no dia 30 o DP4 foi removido, e realizado DG por ultrassonografia em modo B (Myndray, M5 VET, China). Os animais com DG negativo foram tratados com 150 µg de D-cloprostenol (VeteglanLuteolítico, HertapeCalier), 1mg de CE IM (Cipionato HC, HertapeCalier) e 300UI de eCG i.m. (Folligon®, MSD Saúde Animal). A IATF foi realizada 48 horas após a retirada do DP4. Em outro grupo de animais foi realizada análise a campo da fertilidade de vacas ressincronizadas 14 dias após IATF prévia. 448 vacas Nelore e Cruzadas (1/2 Nelore vs A. Angus), lactantes, com ECC de médio de 3 (1-5) foram sincronizadas e inseminadas em tempo fixo (Dia 0). No Dia 14 as vacas receberam mesma metodologia utilizada no grupo Ressinc-14 e foram inseminadas em tempo fixo no Dia 24. As análises estatísticas do experimento foram realizadas utilizando o PROC GLIMIX do SAS 9.3. No experimento 1 não foram observadas diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) entre os grupos Ressinc-14 e Ressinc-22 respectivamente: taxa de concepção à primeira IATF (53 vs 48%), taxa de concepção à ressincronização (51 vs 56%) e taxa de prenhez acumulada em 24 (75% - 89/118) e 32 (77% - 97/126) dias de estação de monta. A porcentagem de falso positivos no diagnóstico com 22 dias foi de 4,55 %. Na análise de fertilidade, a taxa de concepção a primeira IATF, taxa de concepção à ressincronização e a taxa de prenhez acumulada foi de 49%, 51%, 75% respectivamente. Estes resultados

são indicativos de que é possível utilizar em larga escala e com eficiência programas de ressincronização com IATF a cada 24 dias em propriedades de corte.

Agradecimentos: HertapeCalier, Penacchi Agropastoril, Fazenda Empyreo, FIRMASA

**Palavras-chave:** Ressincronização precoce; taxa de prenhez; IATF

SBTE 080 IATF, TETF e IA

Número de Submissão 1687

**Escore de cio avaliado com bastões marcadores influencia as taxas de gestação de vacas nelore submetidas a protocolos de inseminação artificial em tempo fixo**

Karine Casanova da Silva<sup>1</sup>; Walvonvitis Baes Rodrigues<sup>2</sup>; Ailson Sebastiao da Silva<sup>3</sup>; Juliana Correa Borges<sup>2</sup>; Urbano Pinto Gomes de Abreu<sup>2</sup>; Dayanne Schiavi Nascimento Batista<sup>2</sup>; Natália Albanese Anache<sup>1</sup>; Alexandre de Oliveira Bezerra<sup>1</sup>; Jean do Prado Jara<sup>3</sup>; Erikliis Nogueira<sup>2</sup>

1.Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil; 2.Embrapa CPAP, Corumbá, MS, Brasil; 3. Gênesis Tecnologia e Reprodução Animal, Campo Grande, MS, Brasil.

É sabido que a inseminação de vacas que expressam cio em protocolos de IATF promove melhores taxas de prenhez (Borges et al. 2011). Assim, o objetivo foi testar alternativa à observação visual de cio, avaliando o efeito de expressão de cio com auxílio de bastões marcadores sobre as taxas de prenhez e diâmetro do folículo pré-ovulatório (FOL) em vacas de corte submetidas a protocolos de IATF com utilização de dois indutores de ovulação: Benzoato de estradiol (BE) e Cipionato de estradiol (ECP). 3830 vacas multíparas ou primíparas em pós-parto recente foram submetidas a protocolos de IATF e avaliadas quanto a expressão de cio no momento da IATF, em 4 propriedades no Planalto e Pantanal do MS. Os animais receberam 2 mg de BE (RIC-BE<sup>®</sup>, Agener União, Brasil) e um dispositivo intravaginal com 1 g de P4 (Primer<sup>®</sup>, Agener União, Brasil), em dia aleatório do ciclo estral (Dia 0). No Dia 8, os animais foram divididos em dois tratamentos: BE (n= 1624) retirada e aplicação dos medicamentos na tarde do D8-1mg de BE (RIC-BE<sup>®</sup>, Agener União, Brasil); e ECP (n=2206) retirada e aplicação dos medicamentos na manhã do D8- 1 mg de ECP- (ECP<sup>®</sup>, Zoetis, Brasil), e todos receberam ainda 150µg de d-cloprostenol (Prolise<sup>®</sup>, Arsa, Argentina) e 300 UI de ECG (Folligon<sup>®</sup> 5000UI, MSD, São Paulo, Brasil). No momento da retirada dos implantes, todas as vacas foram pintadas na região sacro-caudal com bastões marcadores (Raidl-Maxi; RAIDEX GmbH, Dettingen/Erms, Germany). No dia 10, 44 e 50 horas (para BE e ECP) após a retirada do implante, as vacas receberam sêmen de touros de fertilidade conhecida, distribuídos nos tratamentos, e um grupo de vacas (n=300) teve o diâmetro do FOL avaliado. A taxa de expressão de cio, avaliada no momento da IATF, foi classificada com escores de acordo com a remoção de tinta na cauda: 1- sem remoção de tinta= sem expressão de cio; 2- pouca remoção de tinta= baixa expressão de cio; 3- remoção total de tinta= alta expressão de cio. O diagnóstico de gestação foi realizado 35 dias após a IATF por ultrassonografia. Os dados foram analisados pelo PROC GLIMMIX do SAS (SAS/STAT<sup>®</sup> 9.2). Houve diferença de prenhez por IA de acordo com os escores de tinta (ESCT) (1 (n=995) = 40,0%; 2 (n=709)=49,7%; 3 (n=2126)= 60,9%; P<0,001), mas não houve diferença entre indutores de ovulação (BE= 53,8%; ECP= 53,1%; P=0,46), tampouco interação entre indutores e ESCT (P=0,41), porém houve diferença entre touros (P<0,001). Houve diferença no FOL (cm) de acordo com o ESCT (1=1,05b; 2= 1,13 b; 3=1,38 a; P<0,001), porém não houve diferença entre indutores (BE= 1,20 cm; ECP= 1,29 cm; P=0,33). Conclui-se que, a utilização de escores de avaliação de cio com bastões marcadores no momento da IATF, é uma estratégia simples, de baixo custo e útil para identificar vacas com maior expressão de cio e consequentemente, maior prenhez na IATF. Essa estratégia serve de base para novos estudos para elevação de prenhez de vacas com baixa expressão de cio em protocolos de IATF.

Agradecimentos: FUNDECT MS; EMBRAPA e Fazendas São Bento, Morrinho Alvorada e Panorama S/A

**Palavras-chave:** Diâmetro folicular; indutores; detecção de cio

SBTE 081 IATF, TETF e IA

Número de Submissão 1688

**Eficiência das técnicas de manejo reprodutivo pós-inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em vacas de corte paridas**

Walvonvitis Baes Rodrigues<sup>1</sup>; Jean do Prado Jara<sup>2</sup>; Juliana Correa Borges<sup>3</sup>; Luiz Orcirio Fialho de Oliveira<sup>3</sup>; Urbano Pinto Gomes de Abreu<sup>3</sup>; Dayanne Schiavi Nascimento Batista<sup>3</sup>; Natalia Albanese Anache<sup>4</sup>; Karine Casanova da Silva<sup>4</sup>; Alexandre de Oliveira Bezerra<sup>4</sup>; Erikliis Nogueira<sup>3</sup>

1.FUNDECT Embrapa CPAP, Campo Grande, MS, Brasil; 2.UNIDERP Anhanguera, Campo Grande, MS, Brasil; 3.Embrapa CPAP, Corumbá, MS, Brasil; 4.UFMS, Campo Grande, MS, Brasil.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência do manejo reprodutivo pós IATF em vacas paridas. Foram inseminadas em tempo fixo, 607 fêmeas nelore com 45 dias pós-parto, parição em novembro e, inseminadas com sêmen de 5 touros Angus em janeiro de 2015 em propriedade no planalto de MS. Os animais foram avaliados ginecologicamente em dia aleatório do ciclo estral (D0) e receberam dispositivo intravaginal de progesterona (Cronipress<sup>®</sup> Mono Dose M-24, Biogênesis Bagó, Paraná, Brasil) e administração de 2 mg de Benzoato de Estradiol (BE- Estrogen<sup>®</sup>, Biofarm, São Paulo, Brasil). No Dia 8, o implante foi retirado e receberam 1 mg de cipionato de estradiol- (ECP<sup>®</sup>, Zoetis, Brasil), 150µg de d-



cloprostenol (Prolise®, Arsa, Argentina) e 300 UI de eCG (Folligon® 5000UI, MSD, São Paulo,) e inseminados 48 hs após. Foram utilizados 4 tratamentos no pós IATF: T1- Controle (n=161) repasse com touros Nelore na proporção de 1/25 durante setenta e cinco dias; T2-OBSERVAÇÃO (n= 132) observação de cio no período de 15 a 25 dias pós inseminação, e IA seguindo o esquema proposto por Trimberger. T3- RESINC22 (n=157)- 22 dias pós IATF, aplicação de implante vaginal de P4 e 1 mg de Benzoato de Estradiol (BE) (Estrogin®, Biofarm, São Paulo, Brasil) em todas as matrizes do lote, oito dias após, retirada do implante vaginal, diagnóstico de gestação via ultrassonografia, e aplicação 150µg de d-cloprostenol (Prolise®, Arsa, Argentina), 300 UI de eCG (Folligon® 5000UI, MSD, São Paulo,) e 1 mg de cipionato de estradiol- (ECP®, Zoetis, Brasil) nas vazias, com inseminação 48 horas após; T4- RESINC30 (n=157)- Ressincronização após diagnóstico de gestação por ultrassonografia trinta dias após a IATF, onde nas vazias, aplicou-se o mesmo protocolo da 1ª IATF, nos lotes T2, T3 e T4 após as duas inseminações as vacas foram repassadas com touros Nelore na proporção de 1/25 até o fim da Estação de monta (EM) de 75 dias. O diagnóstico de gestação (DG) foi realizado 30 dias após as inseminações e ao final da Estação de Monta por ultrassonografia. Os dados foram analisados pelo PROC GLIMMIX do SAS (SAS/STAT® 9.2). A taxa de prenhez na primeira IATF não diferiu entre os grupos (54,6%, 53,0%, 59,2% e 51,6%, para T1, T2, T3 e T4, respectivamente; P= 0.66), assim como não observado efeito dos grupos na segunda IATF (T3=45,31%, T4= 46,05%, P=0,63) e nas taxas de prenhez ao final da estação de monta (86,33%, 86,36%, 78,98% e 81,52%, para T1, T2, T3 e T4, respectivamente; P= 0,43). No T2, apenas 25 vacas (18,9% do lote) foram observadas em cio e 20 (80%; 20/25) tornaram-se prenhes de segunda inseminação. A percentagem de perdas embrionárias ao final da estação reprodutiva não diferiu entre os grupos (4,54%, 1,47%, 5,37% e 7,40% para T1, T2, T3 e T4, respectivamente; P>0,05). Conclui-se que programas de ressincronização com 22 ou 30 dias oferecem maiores número de produtos oriundos de inseminação artificial. A taxa final de prenhez é semelhante aos quatro manejos, diferenciando somente a quantidade dos bezerros produzidos de Inseminação.

Agradecimento: Fundect-MS, EMBRAPA e Fazenda Alvorada

**Palavras-chave:** Ressincronização; observação de cio; cruzamentos

SBTE 082 IATF, TETF e IA

Número de Submissão 1689

### **Impacto da época do ano no perfil de LH e fertilidade em vacas de leite sincronizadas com diferentes tipos de análogos de GnRH (Gonadorelina vs. Buserelina)**

Alexandre Henryli Souza<sup>1</sup>; Ramon Armengol-Gelonch<sup>2</sup>; J M Mallo<sup>3</sup>; D Ponté<sup>3</sup>; Antonio Jimenez<sup>1</sup>; Alessio Valenza<sup>1</sup>

*1.Ceva Saúde Animal - R&D, Libourne, França; 2.Departamento de Ciència Animal, Escola Tècnica Superior D'enginyeria Agrària, Lleida, Espanha; 3.LleidaVet Veterinary Clinic, Lleida, Espanha.*

O objetivo deste estudo foi avaliar se a época do ano poderia alterar o perfil de LH após o tratamento com GnRH em vacas de leite recebendo dois tipos de análogos de GnRH. Também foi avaliado a proporção de animais prenhes por IA (P/IA) durante épocas do ano mais quentes ou frias, e se esses resultados poderiam ser influenciados pelo tipo de GnRH utilizados durante o protocolo de sincronização. As vacas utilizadas neste experimento estavam sob sistema de confinamento tipo free-stall em uma fazenda comercial localizada na região de Sudeste na Espanha, onde o índice THI se mantém acima de 70 durante os meses de verão. No Experimento 1, vacas lactantes com  $108.2 \pm 2.3$  DEL, produzindo  $41.5 \pm 0.3$  kg/dia foram aleatorizadas a receber: Ovarélin® i.m. (OVA; 2.0 mL, 100 mg de diacetato de tetrahidrato de gonadorelina; Ceva Animal Health, France) ou Receptal® i.m. (REC; 2.5 mL, 10 mcg de diacetato de buserelina; MSD, Germany) durante meses mais quentes (Julho a Agosto 2014; n = 32 vacas; OVA = 16 e REC = 16) ou mais frios (Setembro a Novembro 2014; n = 27 vacas; OVA = 14 e REC = 13). Vacas estavam no proestro ou diestro (D7 do ciclo estral) no momento do tratamento com GnRH. Ainda no Experimento 1, amostras de sangue foram coletadas na hora 0 (imediatamente antes do tratamento com GnRH), após 30 min, 1h, e em seguida a cada hora até 5h após o tratamento de GnRH. No Experimento 2, todas vacas foram sincronizadas com um protocolo modificado G-6-G e aleatorizadas a receber OVA (n = 350) ou REC (n = 335) durante o protocolo de sincronização. Os dados foram analisados pelo procedimento GLIMMIX do programa SAS (9.3). No Experimento 1, o pico de LH (ng/mL) não foi afetado pela época do ano (meses quentes =  $6.8 \pm 0.4$  vs frios =  $6.1 \pm 0.4$ ; P = 0.22) ou tipo de GnRH (OVA =  $6.2 \pm 0.4$  vs REC =  $6.7 \pm 0.4$ ; P = 0.37). Porém, a área da curva (AUC) de liberação de LH (ng/ml\*tempo) foi significativamente menor durante os meses quentes do ano (meses frios =  $20.3 \pm 1.2$  vs quentes =  $16.9 \pm 1.1$ ; P = 0.04), e não houve interações entre o tipo de GnRH e época do ano em relação ao pico de LH ou AUC. No Experimento 2, os resultados de P/IA foram obviamente afetados pela época do ano (meses frios = 44.4% vs quentes = 33.0%; P < 0.01); mas não houve efeito do tipo de GnRH na P/IA (OVA = 41.4% vs REC = 36.1%; P = 0.18). Além disso, não houve nenhum tipo de interação entre o tipo de GnRH e época do ano (P = 0.29). Estes resultados indicam o estresse térmico pode diminuir a liberação de LH representado pela menor AUC após o tratamento com GnRH, além de reduzir P/IA em vacas sincronizadas. Porém, estes resultados foram independentes do tipo de GnRH utilizado. Portanto, estratégias para diminuir o estresse térmico em vacas de leite podem melhorar a liberação de LH após o tratamento com GnRH durante protocolos de sincronização.

**Palavras-chave:** Estresse térmico; GnRH; vacas de leite

SBTE 083 IATF, TETF e IA  
Número de Submissão 1692

**Uso da ultrassonografia color-doppler para otimizar a seleção de receptoras com melhor receptividade para transferência de embriões produzidos in vitro**

Guilherme Pugliesi<sup>1</sup>; Júlio César Barbosa Silva<sup>2</sup>; Thiago Nishimura<sup>3</sup>; Diego Miyai<sup>3</sup>; Luciano A Silva<sup>3</sup>; Mario Binelli<sup>1</sup>

1.Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, Brasil; 2.Embryo Sys, Ourofino, MG, Brasil; 3.FZEA, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, Brasil.

O diagnóstico da função do corpo lúteo (CL) pela palpação transretal ou pela ultrassonografia em escala-de-cinza tem sido bastante usado para seleção de receptoras de para transferência de embriões (TE); entretanto, estas estratégias podem resultar em TE em um útero não-receptivo devido à presença de um CL pouco ou não-funcional. Nós objetivamos estudar retrospectivamente o impacto do tamanho e do fluxo sanguíneo luteal avaliados por ultrassonografia Color-Doppler no momento da TE sobre as taxas de gestação (P/TE). Para isso, receptoras de corte cruzadas (n=329) tiveram o ciclo estral sincronizado por um protocolo hormonal à base de progesterona/estradiol para TE em tempo fixo (TETF). No Dia-1, doadoras Nelore adultas foram submetidas à ovum pick-up e os oócitos viáveis foram fertilizados in vitro (FIV) no Dia 0 (dia esperado do cio das receptoras). Nos Dias 4 e 7, a área e a proporção de sinais coloridos de fluxo sanguíneo nas receptoras foram avaliados por um único avaliador experiente usando dois diferentes equipamentos de ultrassonografia (MyLab30 Vet Gold, Esaote, São Paulo, Brazil or M5 Mindray, São Paulo, Brazil), com uma configuração semelhante que permitiu detecção de fluxo sanguíneo  $\geq 5,4$  m/s. As vacas que não ovularam ou com CL não-funcional (<25% de fluxo sanguíneo) nos Dias 4 e 7, ou com qualquer outro problema reprodutivo foram descartadas (n=74). Das vacas não-selecionadas, 9,5% (7/74) não foram usadas pois o CL estava presente (média da área luteal nos Dias 4 e 7, respectivamente: 1,12 e 2,55 cm<sup>2</sup>), mas não estava funcional (<25% de fluxo sanguíneo). No Dia 7, as vacas com CL funcional receberam um embrião FIV fresco (n=222) ou desvitrificado (n=33), colocado no corno uterino ipsolateral ao CL. Os dados de 10 vacas não foram usados na análise pois não foram anotados ou havia a presença de dois CLs. Considerando apenas as avaliações do Dia 7, as receptoras foram retrospectivamente divididas em dois subgrupos de acordo com o tamanho do CL (Pequeno[<3cm<sup>2</sup>] ou Grande [ $\geq 3$ cm<sup>2</sup>]) e três subgrupos de acordo com o fluxo sanguíneo luteal (Baixo [ $\leq 40\%$ ], Médio [45 a 50%] ou Alto [ $\geq 55\%$ ]). A gestação foi detectada no Dia 42-45 por ultrassonografia transretal e a P/TE foi analisada pelo procedimento de regressão logística usando o Proc Glimmix do SAS, considerando os efeitos de escore de condição corporal, origem do embrião, categoria animal (parida ou solteira), tamanho do CL, fluxo sanguíneo luteal, e suas interações. O critério de Wald foi usado para remover os fatores com  $P > 0,2$ . Apesar de um aumento numérico da P/TE das vacas com CL Grande (55,7%, 108/194) comparado com as vacas de CL Pequeno (47,1%, 24/51), um efeito de tamanho de CL não foi detectado ( $P > 0,1$ ). Apenas um efeito ( $P = 0,1$ ) de categoria de fluxo sanguíneo de CL foi detectado. Isto refletiu um aumento progressivo na P/TE associado ao aumento da vascularização luteal (Baixa, 45,1%B, [37/82]; Média, 55,9% AB [57/102]; e Alta, 62,3% A [38/61];  $P < 0,05$ ). Em conclusão, a presença de um CL com alta vascularização ( $\geq 55\%$ ) no momento da TE aumenta a P/TE em receptoras de embriões Nelore produzidos por FIV. Assim, o uso da ultrassonografia Color-Doppler como um método não-invasivo e em tempo real para estimar a atividade luteal é uma estratégia inovadora e potencial para seleção de vacas com alta receptividade em programas de FIV/TETF.

Agradecimentos: RFA, Agropecuária (Bruno Furtado); FAPESP (2011/03226-4; 2015/10606-9).

**Palavras-chave:** Fluxo sanguíneo; gestação; corpo lúteo

SBTE 084 IATF, TETF e IA  
Número de Submissão 1694

**Efeito do cipionato de estradiol sobre o momento da ovulação, atividade luteal e a taxa de prenhez em programas de IATF em vacas de corte**

Diego Bosolasco<sup>1</sup>; Richard Núñez Olivera<sup>2</sup>; Federico Cuadro<sup>1</sup>; Ana Meikle<sup>2</sup>; Alejo Menchaca<sup>1</sup>

1.Fundacion Irauy, Montevideo, Uruguai; 2.Facultade de Veterinaria, Udelar, Montevideo, Uruguai.

O objetivo foi determinar o efeito de distintas doses de cipionato de estradiol sobre o momento da ovulação, concentração de progesterona (P4) e taxa de prenhez em tratamentos de IATF. Experimento 1 foi realizado em 45 vacas Hereford multíparas, com 60-70 dias pós-parto, condição corporal (CC)  $3,3 \pm 0,4$  (escala 1 a 8), em anestro. As vacas receberam um dispositivo intravaginal com P4 (DIB 0,5g de P4, Syntex, Argentina) durante 7 dias e 2 mg de benzoato de estradiol (Gonadiol, Syntex) im ao colocar o DIB. Na retirada do dispositivo uma dose de 500 µg de cloprostenol sódico (Ciclase DL, Syntex) e 400 UI de gonadotrofina coriônica equina (Novormon, Syntex) im. As fêmeas foram divididas em três grupos experimentais (n=15 por grupo) de acordo com a CC e distribuídas aleatoriamente, para receber 1,0 mg ou 0,5 mg de ECP (Cipiosyn, Syntex) ao retirar o DIB, ou não receber ECP. Os ovários foram monitorados mediante ultrassonografia (WED-9618V, Well.D, China) cada 12 h desde a retirada até ovulação y cada 24 após ovulação. Mostras sanguíneas diárias foram obtidas desde a retirada do DIB até o dia 14 pós-ovulação. Os bezerros foram submetidos ao desmame com tabuleta por 10 dias. Experimento 2 a taxa de prenhez foi determinada comparado apenas os dois grupos experimentais tratados com ECP descritos no Experimento 1. Um total de 4.156 vacas multíparas cruza Hereford e Angus, com  $\approx 60$ -90 dias pós-parto, 92,2% (3835/4156) em anestro foram alocadas em dois grupos para receber 1,0 mg (n=2044) ou 0,5 mg (n=2112) de ECP ao retirar o DIB. Ambos grupos receberam IATF as 46-50 h ou entre 52-56 h da retirada do DIB (IATF AM e PM,

respectivamente), balanceados com número igual de animais por hora de IATF, inseminador, touro e partida de sêmen. A análise estatística foi realizada por MLGM. No Experimento 1, a taxa de ovulação (ovuladas/tratadas) foi similar entre os grupos, houve tendência ( $P=0,06$ ) entre vacas que receberam (93,3%, 28/30) vs. não receberam ECP (73,3%, 11/15). O intervalo entre a retirada do DIB e a ovulação foi menor com 1,0 mg ( $58,7 \pm 2,7$  h) comparado à 0,5 mg ou ao não tratamento com ECP ( $66,7 \pm 2,5$  h e  $69,1 \pm 2,9$  h;  $P<0,05$ ), respectivamente. As vacas que receberam ECP e ovularam, (ECP 0,5 mg;  $n=15$  e ECP 1 mg;  $n=13$ ) tiveram maiores concentrações de P4 nas duas semanas seguintes a ovulação ( $6,3 \pm 0,2$  e  $6,5 \pm 0,2$  ng/mL), comparado as vacas que não receberam ECP e que ovularam ( $n=11$ ) ( $5,3 \pm 0,3$  ng/mL), com um efeito significativo nos dias 13 e 14 ( $P<0,05$ ). No Experimento 2, a taxa de prenhez foi menor nas vacas que receberam 1,0 mg comparada com 0,5 mg de ECP (50,4%, 1031/2044 vs. 60,4%, 1227/2112; respectivamente;  $P<0,01$ ). Houve interação entre a dose de ECP e o momento da IATF, com 1,0 mg a taxa de prenhez foi superior com IATF AM (54,0%, 564/1045) vs. PM (46,7%, 467/999) ( $P<0,01$ ). Entretanto, com 0,5 mg não houve diferenças em realizar IATF AM (61,1%, 645/1056) vs. PM (59,8%, 632/1056). Em conclusão, a administração de ECP favorece a taxa ovulatória vacas taurinas de corte em anestro. Usando desmame precoce, a administração de 0,5 mg no lugar de 1,0 mg de ECP permite maior taxa de prenhez e IATF durante todo o dia.

**Palavras-chave:** IATF; concentração de progesterona; taxa de prenhez

SBTE 085 IATF, TETF e IA

Número de Submissão 1695

**Impacto econômico da inseminação artificial associada à IATF em rebanho leiteiro acriano**

Bruno Pena Carvalho; Claudenor Pinho de Sá; Francisco Aloísio Cavalcante; José Marques Carneiro Junior; Marcio Muniz Albano Bayma

*Embrapa Acre, Rio Branco, AC, Brasil.*

A inseminação artificial (IA) foi utilizada recentemente com resultados satisfatórios em rebanhos leiteiros acrianos (Carvalho, Animal Reproduction, v.12, p.649, 2015). Porém, para que uma técnica seja adotada com efetividade, é necessário não apenas viabilidade técnica, mas também econômica. O objetivo deste estudo foi avaliar o impacto econômico da utilização da IA, associada à IATF, em propriedade leiteira no Acre, com rebanho de 83 vacas, localizada no município de Feijó. O impacto econômico da adoção da inseminação artificial associada à IATF foi estimado pelo método excedente econômico (Avilla et al., 2008). A metodologia compara os efeitos da adoção da tecnologia com as práticas e processos utilizados anteriormente à sua adoção. Os benefícios econômicos são calculados a partir dos ganhos gerados pela inovação tecnológica, descontados eventuais custos adicionais (Avila, et al., 2008). No estudo foi observado que a adoção da tecnologia gera um incremento de produtividade na produção de leite. Para o cálculo foram comparados 2 cenários do mesmo rebanho: 1) monta natural utilizando 1 touro durante 12 meses com as vacas em lactação e 2) uso de IA e IATF, durante 12 meses. Nos dois cenários foi calculado o intervalo entre partos (IEP), % de vacas em lactação (% VL) e taxa de prenhez (TP), mantendo-se os mesmos animais e condições de manejo e alimentação. Os resultados para IEP, TP e % VL no cenário 1 e 2 foram de 18,8 e 14,5 meses, 58 e 77% e 47 e 62%, respectivamente, mostrando uma melhora efetiva nos índices zootécnicos com o uso da IA e IATF. No cenário 1, o custo por prenhez foi de R\$ 14,30. Para chegar neste valor, foi utilizado o custo de compra do touro [R\$ 5.000,00, subtraído de R\$ 2.200,00; valor de venda para abate após os 5 anos de serviço; dividido pela vida útil produtiva (5 anos)]. A este valor foi acrescido o custo de manutenção do touro a pasto, com suplementação mineral e medicamentos. No cenário 2, o custo por prenhez foi de R\$ 96,02. Contribuiu para este valor o custo equivalente da depreciação do botijão – 10% (botijão comunitário compartilhado com 10 produtores); sêmen (R\$ 18,00 por dose); nitrogênio líquido (R\$ 25,00/mês); material para IA (R\$ 260,00/ano); hormônios para IATF (R\$ 20,00 por protocolo) e custos com técnico para realização da sincronização (R\$ 100,00/mês). A introdução da IA e IATF, significou um custo adicional de R\$ 4.339,27. Porém, com esta técnica, foi possível aumentar de 47 para 62 a porcentagem de vacas em lactação, obtendo-se 12 prenhez a mais, resultando na safra subsequente mais 12 vacas em lactação. Este número representa um acréscimo de 13.140 litros de leite no ano (12 lactações de 270 dias; 3 litros/vaca/dia) e, portanto um acréscimo de R\$ 13.140,00 na renda (preço do leite = R\$ 1,00). Além do valor referente à venda de leite, ao final da desmama, o produtor terá 12 bezerros a mais para a venda, totalizando R\$ 7.800,00, em valores locais. Assim, conclui-se que a técnica de IA, associada à IATF, gera impacto econômico positivo anual de R\$ 16.600,73 a partir do 2º ano, pois aumenta o número de vacas em lactação na próxima safra e, consequentemente, um rápido retorno financeiro frente ao investimento realizado. Adicionalmente, espera-se que os resultados obtidos no presente estudo possam auxiliar a tomada de decisão de produtores Acrianos para a adoção da IA e IATF e, com isso, permitir que mais produtores adotem estas tecnologias e melhorem geneticamente seus rebanhos.

**Palavras-chave:** Gado leiteiro; impacto econômico; acre

SBTE 086 IATF, TETF e IA

Número de Submissão 1698

**Aplicação de GnRh em vacas com baixa ou sem expressão de estro avaliadas com bastões marcadores aumenta a taxa de prenhez em vacas de corte submetidas a IATF**

Erikliis Nogueira<sup>1</sup>; Walvonvitis Baes Rodrigues<sup>1</sup>; Ailson Sebastiao da Silva<sup>2</sup>; Juliana Correa Borges<sup>1</sup>; Karine Casanova da Silva<sup>3</sup>; Natalia Albanese Anache<sup>3</sup>; Alexandre de Oliveira Bezerra<sup>3</sup>; Beatriz Caetano da Silva Leão<sup>4</sup>; Nathália Alves de Souza Rocha-Frigoni<sup>4</sup>; Gisele Zoccal Mingoti<sup>5</sup>

1. *Embrapa CPAP, Corumbá, MS, Brasil*; 2. *Genesis Tecnologia e Reprodução Animal, Campo Grande, MS, Brasil*; 3. *UFMS-Mestrado Civet, Campo Grande, MS, Brasil*; 4. *Centro Universitário Católico Salesiano, Aracatuba, SP, Brasil*; 5. *Laboratório de Fisiologia da Reprodução- FMVA Unesp, Aracatuba, SP, Brasil*.

O objetivo foi avaliar a estratégia de aplicação de GnRH, em vacas de corte com baixa ou pouca expressão de estro avaliadas através de Escore de tinta (ESCT) para aumento das taxas de prenhez de IATF. Foram utilizadas 1750 vacas multíparas e primíparas Nelore no Planalto (ECC (1-6): 3,67) e Pantanal do MS (ECC (1-6): 2,90) que apresentaram ESCT 1 e 2 no momento da IATF, e foram aleatoriamente distribuídas em dois tratamentos: Controle ou GnRH - aplicação de 100 µg de gonadorelina no momento da IATF (Fertagyl®, MSD, São Paulo, Brasil). Os animais foram avaliados ginecologicamente em dia aleatório do ciclo estral (D0) e receberam dispositivo intravaginal de P4 (Cronipress® Mono Dose M-24, Biogénesis Bagó, Paraná, Brasil) e administração de 2 mg de BE (Estrogin®, Biofarm, São Paulo, Brasil). No Dia 8, o implante foi retirado e receberam 1 mg de cipionato de estradiol- (ECF®, Zoetis, Brasil), 150µg de d-cloprostenol (Prolise®, Arsa, Argentina) e 300 UI de eCG (Folligon® 5000UI, MSD, São Paulo, Brasil). No momento da retirada dos implantes, todas as vacas foram marcadas na região sacro-caudal com bastões de tinta (Raidl-Maxi; RAIDEX, Germany). No dia 10, 50 horas após a retirada do implante, as vacas foram inseminadas. A taxa de expressão de cio (ESCT), avaliada no momento da IATF, foi classificada de acordo com Silva et al. (Animal Reproduction, 2016): 1- sem expressão de cio; 2= baixa expressão de cio; 3- alta expressão de cio. Em metade das vacas com ESCT 1 e 2, foi aplicado GnRH no momento da IATF (GnRH 1 e GnRH2). A outra metade das vacas com ESCT 1 e 2, foi designado Grupo Controle, e foi aplicado 1 ml de sol salina. Em 300 vacas, foi avaliado o diâmetro do folículo no momento da IATF. O diagnóstico de gestação foi realizado 35 dias após a IATF por ultrassonografia. Os dados foram analisados pelo PROC GLIMMIX do SAS (SAS/STAT® 9.2). Houve diferença no diâmetro (cm) do Folículo Pré ovulatório no momento da IATF de acordo com o ESCT (1=1,02c; 2= 1,14 b; 3=1,44 a; P<0,001). A taxa de prenhez dos animais ESC 3 foi de 46,4% e 59,6% no Pantanal e Planalto, respectivamente (P<0,001). Houve diferença na prenhez por IA (P/IA) de acordo com os escores de tinta nos animais Controle (Controle1- 23,45%a; Controle2-39,5%b; P<0,05), porém esta diferença não existiu nos animais que receberam GnRH (GnRH1-52,0%; GnRH2- 49,3%; P=0,97). Quando avaliado conjuntamente os grupos que receberam GnRH ou Controle, os resultados demonstraram efeito positivo da aplicação de GnRH no momento da IATF (Controle (n= 369) - 36,0% b; GnRH (n=415) - 50,3% a; P<0,001). O local influenciou na prenhez por IA (P<0,001) e existiu interação entre Tratamento e local (P= 0,010) (Controle x Pantanal- 35,1%b; Controle x Planalto- 37,0%b; GnRH x Pantanal- 41,7%b; GnRH x Planalto- 61,6%a). Conclui-se que, a aplicação de GnRH nas vacas com baixo ESCT avaliados com bastões marcadores é uma estratégia simples, de baixo custo para elevar as taxas de prenhez de IATF em vacas de corte lactantes submetidos a protocolos de IATF com P4 +BE.

Agradecimentos: FUNDECT- MS; EMBRAPA e Fazendas Ventania, Bom Jardim e Primavera

**Palavras-chave:** Bastão marcador; GnRH; estro

SBTE 087 IATF, TETF e IA

Número de Submissão 1700

#### **Avaliação de um protocolo para inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em cabras leiteiras**

1. *Faculty of Veterinary Sciences, Universidad de Concepción, Chillán, Chile*; 2. *Faculty of Veterinary Medicine, Universidad de Córdoba, Córdoba, Espanha*.

Inseminação artificial em tempo fixo (IATF) poderia simplificar programas reprodutivos e aumentar sua utilização. Este estudo objetivou avaliar o desenvolvimento folicular final, ovulação e performance reprodutiva após um protocolo de IATF baseado progesterona e PGF2α combinadas com estradiol para induzir a ovulação em cabras leiteiras dentro e fora da estação reprodutiva. Na primeira parte do estudo, durante a estação reprodutiva, 17 cabras Saanen não-lactantes, BCS 2,5-3,0, e sob programa nutricional foram tratadas progesterona (CIDR G, Pfizer, Chile) por 6 dias e cloprostenol (0,125 mg, im, Ciclast, Syntex, Chile) na retirada do dispositivo. Naquele momento foram alocadas aleatoriamente nos grupos eCG (300 UI im Novormon, Syntex; n=8), e controle não tratado (n=9). As ovulações foram induzidas com estradiol (0,2 mg im Estradiol Benzoato [BE], Syntex, Chile) 24 h após CIDR. Folículos ≥4 mm em diâmetro, foram mensurados por ultrassonografia transretal (sonda de 10 MHz, Honda 2100 Vet) 24 h após CIDR, na ovulação e no CL de 10 dias e registrados em tabelas individuais enquanto o momento da ovulação foi detectado por meio de scanner de ovário a cada 8 h desde 48 h após CIDR (tempo médio entre a última vez que um folículo foi observado e seu desaparecimento). O intervalo para a ovulação foi considerado como o período entre a remoção de CIDR e a ovulação. A dinâmica folicular, ovulação e desenvolvimento do CL foram avaliados novamente em outro grupo tratado com eCG e BE (n=8) durante o anestro. Em uma segunda parte, 121 cabras Saanen lactantes com BCS 2,5-3,0 foram sincronizadas com o protocolo acrescido de 300 UI de eCG (67 durante e 54 fora da estação reprodutiva) e foram inseminadas com sêmen comercial descongelados dos mesmos machos. A taxa de prenhez foi avaliada por US 35 dias após IA e a performance com 150±8 dias em cabras gestantes. Foram realizadas análises estatísticas descritivas, paramétricas e não paramétricas, com o programa STATISTICA 10.1 (StatSoft Inc, Tulsa, OK, USA). Os resultados mostraram que cabras tratadas com eCG

exibiram performance ovarian similar as controle em termos de número de folículos após CIDR (2,9 vs. 2,4) na ovulação (2,5 vs. 2,7) e CLs após a ovulação (1,6 vs. 2,0), diâmetros de folículo e CL nos mesmos momentos ( $5,8 \pm 0,26$  vs.  $6,4 \pm 0,23$ ;  $P > 0,05$ ;  $6,6 \pm 0,28$  vs.  $7,1 \pm 0,24$  e  $12,5 \pm 0,52$  vs.  $11,4 \pm 0,37$  média  $\pm$  SEM mm;  $P > 0,05$ ) e taxa de ovulação (ambos 100%) mas diferiram no intervalo até ( $P = 0,016$ ) e o agrupamento das ovulações ( $P < 0,001$ ;  $58,5 \pm 0,54$  vs.  $62,6 \pm 1,35$  h respectivamente). As cabras tratadas com eCG apresentaram performance ovarian similar durante o anestro em todos os parâmetros avaliados ( $P > 0,10$ ). Quando a performance reprodutiva foi avaliada, nenhuma diferença foi encontrada entre IATF durante e fora da estação reprodutiva vs. Taxa de prenhez no anestro (52,2% vs. 53,7%), taxa de performance (91,4% vs. 82,8%) ou prolificidade (2,2 vs. 1,9 leitões). Coletivamente os resultados sugerem que o protocolo permite um controle adequado das ovulações a ser utilizado para IATF em cabras leiteiras.

**Palavras-chave:** FTAI; PGF2a; goat

SBTE 088 IATF, TETF e IA

Número de Submissão 1704

**Perfil produtivo e reprodutivo das propriedades leiteiras do município de Realeza – PR**

Adalgiza Pinto-Neto<sup>1</sup>; Nelson Lima Santos jr<sup>1</sup>; Fernando Skoniesky<sup>1</sup>; Marcelo Falci Mota<sup>1</sup>; Antônio Campanha Martinez<sup>2</sup>; Luiz Sérgio Merlini<sup>3</sup>; Rodolfo Casimiro Berber<sup>4</sup>

1.Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS, Realeza, PR, Brasil; 2.Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil; 3.Autônomo, Maringá, PR, Brasil; 4.Universidade Federal do Mato Grosso, Sinop, MT, Brasil.

A Zona Rural de Realeza-PR é formada por pequenas propriedades de agricultores familiares que, na maioria, explora a bovinocultura leiteira (aproximadamente 540 produtores com 11.000 animais), onde se obtém a maior parte da renda familiar. Objetivou-se com esse estudo estabelecer o perfil produtivo e reprodutivo das propriedades leiteiras do Município de Realeza- PR. Para tanto, aplicou-se um questionário a 255 produtores de leite desse município, entre novembro/2014 e agosto/2015. Os dados foram submetidos a Análise de Variância e as médias comparadas pelo Teste de Duncan (SAS). Observou-se que as propriedades rurais do município estudado são caracterizadas por 96% de mão-de-obra familiar, embora o número médio de animais, de fêmeas em reprodução, de fêmeas em lactação e a produção média de leite/dia foi superior nas propriedades leiteiras que possuíam mão de obra contratada (presença de funcionário) ( $p < 0,05$ ). No entanto, a produção média de leite/vaca foi semelhante nas propriedades, independentemente do tipo de mão de obra (contratada ou familiar) ( $p > 0,05$ ). Dos rebanhos, 53,73% (137/255) são compostos por animais mestiços. 91,76% das propriedades possuem até 50 hectares (ha), sendo que o número médio de animais do rebanho, a média de fêmeas em idade reprodutiva e o número médio de fêmeas em lactação foi maior em propriedades acima de 40 ha ( $p < 0,05$ ). No entanto, a produção média de leite/dia foi maior em propriedades de 20-30 ha e 40-50 ha, quando comparada a propriedades de até dez ha ( $p < 0,05$ ). A produção de leite como atividade principal foi observada em 67,84% das propriedades, e em 31,76% como atividade secundária. A utilização exclusiva de IA foi constatada em 36,08%, e em 6,27% em conjunto com a monta natural (MN), levando ao aumento da produção leiteira decorrente dessa utilização ( $p < 0,05$ ). A presença de reprodutor próprio foi observada em 93,87% das 63,92% das propriedades que utilizam MN, sendo que 98,16% deles em MN nunca foram submetidos a avaliação andrológica, e somente 23,31% dos proprietários manifestaram interesse em realizar gratuitamente esse exame. Além da IA, 2,75% das propriedades utilizaram IATF, apresentando aumento do número de fêmeas em reprodução, de fêmeas em lactação e na produção leiteira decorrente dessa utilização ( $p < 0,05$ ). Conclui-se que as propriedades estudadas são caracterizadas pelo perfil de pequenas empresas “locais”, de mão de obra familiar, com menor capacitação técnica para implementação de tecnologias, cujo desempenho reprodutivo e produtivo de seus rebanhos carece de melhorias. Observou-se ainda, a existência de consorciação de atividades agropecuárias, que se trabalhada corretamente poder-se-ia melhorar o perfil produtivo da propriedade, aumentando o retorno econômico ao produtor, fixando as famílias na zona rural e estimulando os descendentes ao estudo, na busca por melhoria da qualidade de vida e capacitação da propriedade para o agronegócio.

**Palavras-chave:** Bovinos leiteiros; produção leiteira; agricultura familiar

SBTE 089 IATF, TETF e IA

Número de Submissão 1706

**Efeito da administração de diferentes fontes de progesterona sobre a indução da puberdade e desempenho reprodutivo em novilhas da raça nelore**

Kleber Menegon Lemes; Milton Maturana Filho; Thiago Santin; Manuel Agustin Silva; Eneiva Carla Carvalho Celeghini; Ed Hoffmann Madureira

Laboratório de Farmacologia e Endocrinologia da Reprodução Animal (LFEA), Departamento de reprodução, Pirassununga, SP, Brasil.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da administração de diferentes fontes de progesterona (P4) sobre a indução da puberdade e o desempenho reprodutivo em novilhas da raça Nelore. Um total de 166 novilhas pré-púberes foram avaliadas por ultrassonografia (Modelo M5 VET; Mindray®) com 7 a 10 dias de intervalo previamente ao início do protocolo de indução. Somente as novilhas que não apresentaram corpo lúteo (CL) em ambas as avaliações foram utilizadas no

experimento. As novilhas apresentaram  $14.67 \pm 0.08$  meses de idade, escore de condição corporal (ECC)  $5.12 \pm 0.05$  (1 = emaciado e 9 = obeso) e peso corporal de  $240.95 \pm 2.31$ kg. Os animais foram aleatoriamente distribuídos nos grupos: Controle (CT; sem tratamento, n=57), P4 injetável (IN; Sincrogest® Injetável, Ourofino Saúde Animal, n=56) e P4 como dispositivo intravaginal (DI; Sincrogest®, Ourofino Saúde Animal, n=53). No início do protocolo de indução (D0), o grupo IN recebeu a dose de 150mg de P4 por via intramuscular (IM), assim como o grupo DI recebeu um dispositivo intravaginal usado previamente por 18 dias (3º uso). Dez dias (D10) após os tratamentos, os dispositivos intravaginais foram removidos no grupo DI, assim como os grupos DI e IN receberam a dose de 1mg de benzoato de estradiol IM (Bioestrogen®, Biogénesis Bagó Saúde Animal) e 150µg de D-Cloprostenol IM (Croniben®, Biogénesis Bagó Saúde Animal). Doze dias após a indução da ovulação (D22), todos os animais foram submetidos à protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF). No início do protocolo, todos os animais receberam um dispositivo intravaginal contendo 1g de P4 (Cronipress® Monodose M-24, Biogénesis Bagó Saúde Animal) e 2mg de benzoato de estradiol IM (Bioestrogen®, Biogénesis Bagó Saúde Animal). Oito dias e meio após, os dispositivos intravaginais foram removidos e foram administrados 1mg de benzoato de estradiol (Bioestrogen®, Biogénesis Bagó Saúde Animal), 150µg de D-Cloprostenol (Croniben®, Biogénesis Bagó Saúde Animal) e 300 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG, Ecegon®, Biogénesis Bagó Saúde Animal), todos IM. Todas as fêmeas foram inseminadas em tempo fixo 36 horas após a retirada dos dispositivos intravaginais. Trinta dias após a IATF foram realizados os diagnósticos de gestação por ultrassonografia. Todas as variáveis foram analisadas pelo PROC GLIMMIX do SAS 9.3. Para indução da puberdade, houve efeito de tratamento ( $P < 0.0001$ ), sendo os grupos IN (71.42%) e DI (58.49%) estatisticamente superiores ao grupo CT (8.77%), sendo que não houve diferença significativa ( $P > 0.05$ ) entre os grupos IN e DI. Para os resultados de prenhez, houve efeito de grupo ( $P = 0.02$ ), sendo o grupo IN (41.84%) superior ao grupo CT (17.54%), e houve tendência de diferença ( $P = 0.09$ ) entre o grupo IN e DI (26.41%), não havendo diferença entre os grupos DI e CT. Em conclusão, a administração de P4 pode ser uma estratégia eficiente para melhoria na indução de puberdade em novilhas Nelore pré-púberes, assim como há indícios de melhoria nas taxas de prenhez em protocolos de IATF, sugerindo a necessidade de estudos com maior número de animais.

Agradecimentos: Biogénesis Bagó Saúde Animal e Ourofino Saúde Animal pelos fármacos utilizados no experimento

**Palavras-chave:** Puberdade; ciclicidade; IATF

SBTE 090 IATF, TETF e IA

Número de Submissão 1712

#### **O momento do início da resincronização da ovulação interfere na taxa de gestação em gado de leite**

Mariana Siqueira Caixeta<sup>1</sup>; Lincoln Silva Amorim<sup>2</sup>; Tatimara Maria Miyachi<sup>2</sup>; Josiane Rossi Ribeiro<sup>2</sup>; Tochimara Aparecida Miyachi<sup>3</sup>; Carlos Antônio de Carvalho Fernandes<sup>3</sup>; Ana Cristina Silva de Figueiredo<sup>3</sup>

1.UFA, Machado, MG, Brasil; 2.BIOTRAN LTDA, Alfenas, MG, Brasil; 3.Departamento de Reprodução Animal Universidade de Alfenas, Alfenas, MG, Brasil.

Os protocolos de resincronização em fêmeas bovinas antes do diagnóstico de gestação, ou seja, com prenhez desconhecida, tem sido utilizado principalmente em gado de corte (Sá Filho et al, 2014), juntamente com protocolos de Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF). Em gado leiteiro, este tipo de protocolo ainda não tem sido muito aplicado. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência e alterações endocrinológicas de protocolos de resincronização em gado de leite, iniciados em períodos distintos após a última inseminação. Foram utilizadas 86 vacas leiteiras, HPB, que receberam inicialmente o seguinte protocolo de IATF: D0-colocação de implante intravaginal de progesterona (IVP) e aplicação de 2mg de Benzoato de Estradiol (BE), D8 – retirada do implante e aplicação de 0,5mg de cloprostenol sódico, D9 – aplicação de 0,1mg de Lecirelina e D10 – IATF. Estes animais foram divididos em dois grupos: G1 (N=43) onde o protocolo de resincronização iniciou 20 a 21 dias após a última inseminação (D 30-31) e G2(N=43), onde o mesmo protocolo foi iniciado 24 a 25 dias após a última inseminação (D 34-35). Em ambos os grupos, oito dias após o início do protocolo de resincronização, o IVP foi retirado e o diagnóstico de gestação foi realizado. Nas fêmeas gestantes não houve qualquer outro procedimento. Naquelas não gestantes, além de colheita de sangue para dosagem de progesterona (P4), foi mensurado o diâmetro do maior folículo e verificado a existência de corpo lúteo (CL). Também foi aplicado 0,5mg de cloprostenol sódico. Um dia mais tarde 0,1mg de Lecirelina e a 2ª IATF foi feita no dia seguinte. Foram avaliados entre os grupos, a taxa de gestação nas duas IATFs, o diâmetro do maior folículo e a concentração sérica de P4 ([P4]) ao final do protocolo de resincronização. Os dados foram submetidos à ANOVA e comparados por teste de Student. A taxa de gestação e % de vacas com CL foi comparada pelo teste Exato de Fisher. Não houve diferença na taxa de gestação na 1ª IATF ( $P > 0,05$ ). A taxa de gestação na 2ª IATF, ou seja, após a resincronização (2ª IATF) foi maior em G2 (22,2 e 50,0% -  $P < 0,05$ ). O diâmetro folicular médio foi maior em vacas do grupo G1 ( $16,3 \pm 3,8$  e  $12,1 \pm 2,7$  mm -  $P < 0,05$ ). Um maior percentual de vacas exibiu CL ao final do protocolo de resincronização em G2 (93,0 e 60,5% -  $P < 0,05$ ). Em G2 a [P4] ao final do protocolo foi superior ( $2,8 \pm 1,1$  e  $1,7 \pm 0,8$  ng/mL -  $P < 0,05$ ). Conclui-se que, quando o protocolo de resincronização é iniciado 20 a 21 dias após a IATF a concentração de P4 ao final do segundo protocolo é menor, apenas aquela originada do IVP, o que pode prejudicar a fertilidade conforme observado.

Agradecimentos: Fapemig; Capes e CNPq

Sá Filho, M.F. et al. Resynchronization with unknown pregnancy status using progestin based timed artificial insemination protocol in beef cattle. Theriogenology, 81 (2014) 284-290.

**Palavras-chave:** Bovino; resincronização; progesterona

SBTE 091 OPU-FIV/TE

Número de Submissão 1474

**Efeito da sazonalidade na produção in vitro de embriões bovinos e bubalinos**

Emílio César Martins Pereira<sup>1</sup>; Eunice Oba<sup>1</sup>; Marcus Vinicius Prado Silva<sup>2</sup>; Virgílio Barbosa Andrade<sup>2</sup>; Álan Maia Borges<sup>2</sup>; Eliane Beatriz Magalhães<sup>2</sup>; João Gabriel Viana de Grázia<sup>2</sup>; Deize de Cássia Antonino<sup>3</sup>; Natália Vieira Sollecito<sup>2</sup>

1.UNESP, Uberlândia, MG, Brasil; 2.UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil; 3.UFU, Uberlândia, MG, Brasil.

Avaliou-se o efeito da redução do fotoperíodo natural no estado de Minas Gerais (Latitude: 19,93 S; Longitude: 43,93 O) sobre a taxa de produção in vitro de embriões (PIVE) (clivagem e blastocistos). De acordo com a duração dos dias, as épocas do ano foram divididas em: período desfavorável para reprodução (outubro a fevereiro), favorável (março a junho) e de transição (julho a setembro). Os ovócitos foram oriundos de ovários de frigorífico. Ao todo foram utilizados 153 ovócitos bubalinos e 662 ovócitos bovinos distribuídos de forma semelhante entre os períodos. Os ovócitos foram colocados em meio de lavagem (TCM 199, 10% de soro de bovino fetal (SFB), 22 ug/mL de piruvato de sódio e 83 ug/mL de sulfato de amicacina). Foram maturados em uma incubadora (38,5°C, 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de umidade) durante 24 horas em meio de maturação (TCM 199 + 10% de SFB, 22 ug/mL de piruvato, 5 UI/mL de LH, 0,05 mg/mL de FSH, 1 ug/mL de estradiol, 83,4 ug/mL de amicacina e 50 mcg/mL de cisteamina) e posteriormente fertilizados durante 18 a 22 horas. Os reagentes usados foram de Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA. Os zigotos foram desnudados e, em seguida, cultivados em meio SOF (fluido sintético de oviduto) + 2,5% de SFB durante 7 dias. A taxa de clivagem dos embriões bovinos e bubalinos foi avaliada entre 48 (D2) a 72 (D3) horas após a FIV e as taxas de blastocistos foram observadas 168 (D7) e 192 (D8) após a FIV. Para análise estatística foram utilizados os testes ANOVA/Duncan ou Kruskal-Wallis e o nível de significância considerado foi  $p < 0,05$ . Com relação as diferentes épocas do ano (favorável; transição e desfavorável) na PIVE em bubalinos, notou-se uma melhoria das taxas de clivagem ( $63,36 \pm 7,00$ ;  $35,92 \pm 3,39$  e  $38,66 \pm 3,5$ ) e blastocistos ( $47,96 \pm 5,01$ ;  $20,18 \pm 3,76$  e  $28,80 \pm 2,99$ ) durante a época favorável para reprodução ( $p < 0,05$ ), diferença não constatada em bovinos ( $66,39 \pm 2,23$ ;  $56,18 \pm 2,60$  e  $67,34 \pm 2,14$ ) ( $p > 0,05$ ). Comparando-se as duas espécies nas diferentes épocas, verificou-se que durante a época favorável para reprodução, a taxa de blastocistos de bubalinos ( $47,96 \pm 5,01$ ) foi superior a encontrada para bovinos ( $28,91 \pm 2,09$ ) ( $p < 0,05$ ), sob as mesmas condições de cultivo. No entanto, nas outras épocas do ano (transição e desfavorável) notou-se uma superioridade da clivagem de bovinos ( $56,18 \pm 2,60$  e  $67,34 \pm 2,14$ ) em relação aos bubalinos ( $20,18 \pm 3,76$  e  $28,80 \pm 2,99$ ) ( $p < 0,05$ ). A produção total de blastocistos de bubalinos ( $25,07 \pm 6,34$ ) e de bovinos ( $27,92 \pm 3,54$ ), desconsiderando a época do ano, não diferiu ( $p > 0,05$ ). Conclui-se que a redução do fotoperíodo influencia positivamente a PIVE em bubalinos, no entanto, nas outras épocas do ano a produção é semelhante à de bovinos.

**Palavras-chave:** Produção in vitro de embriões; bovino; bubalino

SBTE 092 OPU-FIV/TE

Número de Submissão 1479

**Oócitos suínos submetidos ao estresse induzido por pressão negativa melhoram a produção in vitro de embriões**

Guilherme dos Santos; Claudio f. Brogni; Camila Ceccato Ferreira; Larissa G. Silva; Joana Claudia Mezzalira; Iain Uriel Ohlweiler; José Cristani; Alceu Mezzalira

UDESC, Lages, SC, Brasil.

Estudos tem demonstrado que a submissão ao estresse controlado é capaz de aumentar a viabilidade de células e gametas de mamíferos. Nosso grupo vem avaliando o efeito do estresse controlado, induzido por pressão negativa, obtida a partir de um equipamento artesanal (Nitrocooler). Este trabalho teve por objetivo avaliar o desenvolvimento embrionário in vitro de oócitos suínos submetidos à pressão negativa de 500 mBar por um período de 3 minutos. Ovários de fêmeas suínas pré-púberes foram obtidos em abatedouro, sendo aspirados os folículos ovarianos com 3 a 6 mm de diâmetro. Após a busca, os oócitos foram classificados, sendo selecionados para o experimento apenas os de excelente qualidade. Foram conduzidos dois grupos experimentais: grupo Controle (n=709) sem tratamento e grupo Pressão negativa (n=696), que foi submetido a 500 mBar de pressão negativa por três minutos. A maturação foi realizada em duas etapas, sendo a primeira em meio TCM-199 suplementado com 26,19 mM de NaHCO<sub>3</sub>, 25% de Líquido Folicular, 0,1 mg/mL de L-Cisteína, 10 ng/mL de EGF, 100UI/mL de Penicilina G, 0,1 mg/mL Estreptomicina, 0,5 mg/mL de LH, 0,01UI/mL de FSH e 1 mM de dbcAMP, por 22 horas. Na segunda etapa os oócitos foram maturados por 19 horas em meio semelhante ao primeiro, com a exclusão do LH, FSH e dbcAMP. A fecundação in vitro dos oócitos foi realizada em meio m-TBM, suplementado com 0,4 mg/mL de Cafeína e 2 mg/mL de BSA. Foi utilizado sêmen fresco obtido de cachão testado para FIV. Os espermatozoides foram selecionados por gradiente de mini percoll (90% e 45% respectivamente). Os espermatozoides selecionados foram incubados com os oócitos por 3 horas numa concentração de 62.500 espermatozoides/mL. Após esse período os possíveis zigotos foram mecanicamente desnudos e então submetidos a sete dias de cultivo em meio PZM-3, suplementado com 3 mg/mL de BSA. Todas as etapas foram realizadas em estufa a 38,8 °C com 5% CO<sub>2</sub> e umidade saturada. Foi avaliada a taxa de clivagem (dia 2) e a taxa dos blastocistos (dia 7). O experimento contou com 11 repetições, sendo os dados

comparados estatisticamente através do teste de Qui-quadrado ( $P < 0,05$ ). As taxas de clivagem do grupo controle (68,9 %) e do grupo pressão negativa (70,2%) não diferiram estatisticamente ( $P > 0,05$ ). Já a produção de blastocistos do grupo Controle (18,7%) foi inferior ( $P < 0,05$ ) à do grupo Pressão negativa (24,1%). Os dados obtidos demonstram que o estresse induzido por 500 mBar de pressão negativa, durante 3 minutos, melhora a viabilidade de oócitos suínos imaturos, proporcionando um aumento nas taxas de blastocistos. Ainda, o equipamento nitrocooler mostrou-se de fácil e rápida aplicação.

**Palavras-chave:** Estresse controlado; nitrocooler; FIV Suínos

SBTE 093 OPU-FIV/TE

Número de Submissão 1482

**Adaptação do sistema SPOM melhora a taxa de produção *in vitro* de embriões bovinos**

Gabriela Ramos Leal<sup>1</sup>; Maria Alice Guimarães Graciosa<sup>2</sup>; Renata Pasolini<sup>2</sup>; Clara Ana Santos Monteiro<sup>1</sup>; Agostinho Jorge dos Reis Camargo<sup>2</sup>; Clara Slade Oliveira<sup>1</sup>; Raquel Varella Serapião<sup>2</sup>

*1. Embrapa Gado de Leite - CESM, Valença, RJ, Brasil; 2. Pesagro - Rio, Niterói, RJ, Brasil.*

Desde que foi estabelecido, o sistema de maturação *in vitro* (MIV) denominado "Simulated Physiological Oocyte Maturation" (SPOM) tem despertado o interesse de cientistas de todo o mundo. Esse sistema mimetiza os eventos fisiológicos da maturação pelo uso de moduladores de AMPc (100µM Forskolin e 500µM IBMX) que promovem o aumento da competência oocitária através do prolongamento do bloqueio da meiose; consiste em uma etapa de pré-maturação com duração de 2h, seguido por uma etapa de maturação estendida (20uM Cilostamide) por 28h (Albuz, Hum. Reprod, v.25, p.12; 2010). Resultados recentes obtidos por nosso grupo demonstraram uma redução na taxa de produção de embriões do grupo SPOM em relação ao CONTROLE, não sendo observada diferença na taxa de maturação nuclear entre 24 e 28h de MIV (dados não publicados). Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da adaptação do sistema SPOM (SPOM adapted) sobre as taxas de produção *in vitro* de embriões bovinos. Foram realizadas cinco repetições em que os oócitos foram obtidos de ovários de abatedouro, selecionados e distribuídos aleatoriamente nos grupos: CONTROLE (n=243) e SPOMadapted (n=301). A MIV durou 24h no grupo CONTROLE (meio TCM 199) em estufa à 38,5°C, 5% de CO<sub>2</sub> em ar atmosférico e alta umidade. No SPOM adaptado, os oócitos permaneceram por 2h na pré-MIV (Meio TCM 199 com 100µM Forskolin e 500µM IBMX) e seguiram para a MIV (meio TCM 199 + 20µM de cilostamide) também por 24h sob as mesmas condições do grupo CONTROLE. Após a maturação, os COCs foram submetidos à fertilização *in vitro*, realizada com sêmen de um único touro da raça Holandesa e, posteriormente, foram submetidos ao cultivo *in vitro* por sete dias. As taxas de clivagem e de blastocistos foram comparadas entre grupos pelo teste exato de Fisher através do programa InStat GraphPad, com nível de significância de 5%. A taxa de clivagem não apresentou diferença ( $P > 0,05$ ) entre os grupos CONTROLE (69,1%) e SPOMadapted (68,5%). No entanto, a taxa de blastocistos foi maior ( $P < 0,005$ ) no grupo SPOMadapted quando comparada ao grupo CONTROLE (33,9% vs 24,9%). Concluiu-se que a utilização do sistema SPOMadapted, com a redução de quatro horas no período de maturação, é capaz de influenciar positivamente a taxa de blastocistos bovinos produzidos *in vitro* nas condições utilizadas.

Apoio financeiro: FAPERJ, CAPES e FAPEMIG.

**Palavras-chave:** Forskolin; ibmx; cilostamide

SBTE 094 OPU-FIV/TE

Número de Submissão 1483

**A regulação da proteína quinase b (AKT) influencia na maturação *in vitro* de ovócitos bovinos**

Alinne Gloria Curcio; Tainara Iorrani Silva Ribeiro; Roger Cardozo Maia; Carla Sobrinho Paes de Carvalho; Célia Raquel Quirino; Bruna Lomba Dias; Angelo José Burla Dias

*Universidade Estadual do Norte Fluminense-UENF, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil.*

A maturação oocitária envolve uma série de eventos que culminam com a capacitação do gameta feminino para a fertilização e desenvolvimento embrionário. Estima-se que 80% dos ovócitos maturados *in vitro* atinjam a maturação nuclear, porém apenas 60% completam a maturação citoplasmática. Essa falta de sincronia entre a maturação nuclear e a citoplasmática pode afetar o desenvolvimento embrionário inicial e consequentemente a produção *in vitro* de embriões. Trabalhos do nosso grupo têm demonstrado que a modulação da via PI3K/Akt levou a um incremento na taxa de blastocistos bovinos. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito das diferentes concentrações da Triciribina® (Merck, Darmstadt, Alemanha), um inibidor seletivo da Akt, sobre a maturação *in vitro* de ovócitos bovinos. COCs (Grau I e II) foram maturados *in vitro* em meio TCM 199, acrescido de 10% de SFB, 10g/mL de FSH, 5µg/mL de LH e 1% de penicilina/estreptomicina. A esse meio foram adicionados 0 nM (controle), 1 nM (Grupo I - GI), 5 nM (GII) ou 10 nM (GIII) do inibidor. A MIV foi realizada em gotas de 100µL (20 COCs/gota), submersas em óleo mineral e mantidas em atmosfera úmida, contendo 5% de CO<sub>2</sub>, a 38,5 °C, por 22 horas. A avaliação da maturação nuclear foi feita pela coloração com orceína acética. Foram considerados maturados os ovócitos que apresentaram placa metafásica quando observados sob microscópio ótico. A análise da maturação citoplasmática foi realizada pela distribuição das mitocôndrias ativas coradas pelo MitoTracker® Red CMXRos (Molecular Probes®, Invitrogen, Eugene, OR, EUA) observadas por



microscopia de fluorescência e classificadas em 3 categorias: periférica (mitocôndrias situadas na periferia -ovócitos imaturos), transição (distribuição mitocondrial incompleta) ou dispersas (mitocôndrias distribuídas homogeneamente pelo citoplasma - ovócitos maturados). A exposição ao inibidor da Akt nas concentrações analisadas neste trabalho não alterou significativamente a maturação nuclear dos ovócitos bovinos maturados in vitro (teste SNK,  $p > 0,05$ ) (C:  $75,72 \pm 4,55$ ; GI:  $84,50 \pm 13,43$ ; GII:  $75,69 \pm 2,84$ ; GIII:  $69,92 \pm 2,12$ ). Por outro lado, o uso do inibidor reduziu significativamente o número de ovócitos com distribuição de mitocôndrias periféricas (C:  $37,82 \pm 12,11$ ; GI:  $17,34 \pm 4,98$ ; GII:  $23,69 \pm 11,59$ ; GIII:  $8,40 \pm 6,57$ ) e aumentou o número de ovócitos com mitocôndrias em transição (C:  $31,49 \pm 17,22$ ; GI:  $54,82 \pm 8,19$ ; GII:  $39,84 \pm 7,47$ ; GIII:  $49,29 \pm 6,31$ ). O tratamento não alterou significativamente o número de ovócitos que apresentavam as mitocôndrias dispersas (C:  $30,68 \pm 6,57$ ; GI:  $32,0 \pm 6,02$ ; GII:  $36,47 \pm 8,34$ ; GIII:  $42,31 \pm 3,86$ ). O uso da Triciribina®, nas concentrações utilizadas nesse trabalho, não comprometeu a maturação nuclear, porém os resultados demonstram pela primeira vez a participação da via PI3K/Akt na migração mitocondrial e na maturação citoplasmática de ovócitos bovinos. O efeito do inibidor deve ser ainda analisado na produção in vitro de embriões bovinos.

**Palavras-chave:** Via da pi3k/akt ; produção in vitro de embriões ; triciribina

SBTE 095 OPU-FIV/TE

Número de Submissão 1493

**Avaliação morfológica e coloração diferencial de células da mci e do te de embriões bovinos produzidos in vitro com a adição de diferentes suplementos nos meios de maturação e de cultivo**

Elena Carolina Serrano Recalde<sup>1</sup>; Tatiana Lih Ikeda<sup>1</sup>; Elaine Cristina Galhardo<sup>2</sup>; Mateus José Sudano<sup>3</sup>; Fernanda Cruz Landim<sup>1</sup>

1.FMVZ-UNESP, Botucatu, SP, Brasil; 2.IBB/FMVZ-UNESP, Botucatu, SP, Brasil; 3.UNIPAMPA, Bagé, RS, Brasil.

Este estudo teve como objetivo comparar os efeitos da adição de soro fetal bovino (SFB), polivinil álcool (PVA) ou do fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1 (IGF-1), durante as etapas de maturação in vitro (MIV) e cultivo in vitro (CIV) sobre o desenvolvimento embrionário até a fase de blastocistos e porcentagem de células da massa celular interna (MCI) e trofoectoderma (TE). COCs (n=20/grupo) graus I e II obtidos de ovários de abatedouro foram selecionados e maturados in vitro em meio TCM-199 (suplementados com piruvato, hormônios e antibiótico) com a adição de 10% de SFB (SFB), 3 mg/mL PVA (PVA) ou 100 ng/mL de IGF-1 (IGF). A MIV foi realizada em placas de Petri em gotas de 90 µL, cobertas com óleo mineral e incubadas em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> em ar a 38,5°C por 22 a 24 horas. Os oócitos maturados foram fertilizados com 2 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL, co-incubados durante 18 horas. Os prováveis zigotos foram CIV em meio SOFaa (2,7 mM mioinositol, 0,2 mM piruvato, 5 mg/mL BSA, 100 µg/mL estreptomicina, 100 UI/mL penicilina e 85 µg/mL amicacina) com a respectiva adição de: 2,5% de SFB (SFB), 3 mg/mL de PVA (PVA) ou 100 ng/mL de IGF-1 (IGF), por sete dias em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar a 38,5°C. As taxas de clivagem e blastocistos foram avaliadas após 48 e 168 horas pós-inseminação (hpi), respectivamente. Blastocistos, blastocistos expandidos e eclodidos (n=210) foram submetidos à técnica simplificada de coloração diferencial de células da MCI e TE (Thouas, G. Reproductive BioMedicine Online webpaper, v. 3, n. 1, p. 25–29, 2001) e avaliados sob microscópio invertido de epifluorescência. A fluorescência de núcleos de coloração vermelha foi considerada do TE e de coloração azul da MCI. O delineamento experimental é do tipo fatorial 3x3 (três suplementos da MIV e três no CIV), totalizando 9 grupos experimentais (n=120 oócitos/grupo). Foram realizadas três replicatas. Os dados foram analisados pela análise de variância (ANOVA) do modelo PROC GLIMMIX do software estatístico SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA). Foi utilizado o teste de Tukey para comparação de médias ( $P < 0,05$ ). A taxa de clivagem foi similar ( $p > 0,05$ ) para todos os grupos. O grupo SFB-SFB (46,74%  $\pm$  3,28) obteve a maior taxa de blastocisto comparado aos demais grupos, seguido dos grupos PVA-SFB (32,56%  $\pm$  3,28), IGF-SFB (25,23%  $\pm$  3,28) e SFB-IGF (20,13%  $\pm$  3,28). Os grupos SFB-PVA, PVA-IGF, IGF-IGF, PVA-PVA e IGF-PVA tiveram a menor produção, com menos de 12% de blastocistos. Na análise da coloração diferencial, o grupo PVA-PVA (54,26%  $\pm$  6,19) obteve a maior porcentagem de células da MCI comparado aos grupos IGF-SFB, PVA-IGF, PVA-SFB, SFB-PVA e SFB-SFB (32,02%  $\pm$  4,8 a 37,17%  $\pm$  3,28 células). Os grupos IGF-PVA, IGF-IGF e SFB-IGF obtiveram valores intermediários (39,55%  $\pm$  3,71 a 45,82%  $\pm$  7,58). Além disso, o grupo PVA-PVA (45,73%  $\pm$  6,19) obteve a menor porcentagem de células do TE comparado aos grupos IGF-SFB, PVA-IGF, PVA-SFB, SFB-IGF, SFB-PVA e SFB-SFB, os quais obtiveram de 60,44%  $\pm$  3,71 a 67,97%  $\pm$  4,8. Os grupos IGF-IGF e IGF-PVA obtiveram 55,75%  $\pm$  5,87 e 54,14%  $\pm$  7,5 respectivamente. A ausência do SFB, principalmente durante a etapa de CIV, foi deletéria para a taxa de blastocistos, e a suplementação com outras macromoléculas como PVA ou IGF-1 não reverteram tais efeitos negativos.

**Palavras-chave:** Massa celular interna; trofoectoderma; iodeto de propídio

SBTE 096 OPU-FIV/TE

Número de Submissão 1509

**Perfil de eletroforese de células de cumulus de bovino relacionados com a qualidade de oócitos e maturação in vitro**

Monica Marcela Ramirez Hernandez<sup>1</sup>; Isabel Catalina Velez<sup>2</sup>; Paula Rodriguez Villamil<sup>1</sup>; Arlindo de Alencar Araripe Moura<sup>1</sup>

1. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil; 2. Universidade Nacional, Bogotá, Colômbia.

A qualidade dos oócitos e das células do cumulus são essenciais para o desenvolvimento embrionário. Consequentemente, métodos para a avaliação da qualidade dos oócitos é fundamental para melhorar a produção embrionária. Contudo, todos os métodos são invasivos e não predizem a produção de blastocistos. O presente estudo teve por objetivo avaliar o proteoma de células de diferentes qualidades obtidas de complexos cumulus-oócitos (CCOs) de bovinos. Ovários de abatedouro foram coletados e CCOs aspirados de folículos de 3 a 8 mm, depois agrupados em quatro categorias segundo as suas características morfológicas e tempo de maturação. Assim, foram selecionados CCOs imaturos Grau I (GI):  $\geq 4$  camadas de células do cumulus compactas e ooplasma homogêneo; Grau II (GII):  $\geq 4$  camadas de células do cumulus pouco expandidas e ooplasma menos homogêneo; Grau III (GIII):  $\leq 4$  camadas de células do cumulus e ooplasma não homogêneo. Também, um grupo GI foi selecionado para maturação in vitro por 24 horas (GI 24h). As células do cumulus de dez oócitos foram mecanicamente separadas e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Para extração de proteína total, as células foram diluídas numa solução contendo 1% de triton X-100 e sonicadas a  $4^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. Após, as proteínas foram submetidas a 1D SDS-PAGE usando 30  $\mu\text{g}$  totais de proteína/linha. O gel foi corado com Comassie Blue R-350, a imagem foi salva no formato TIFF e analisada pelo programa Quantity One 4,5 (Bio Rad, USA) com exigência de dez vezes maior de fundo para determinar presença/ausência das bandas e as intensidades foram estabelecidas para comparação entre os grupos. Oito bandas foram detectadas no gel com proteínas obtidas de CCOs GI. Dez, três e duas bandas foram observadas no gel com proteínas obtidas de CCOs de GI-24h, GII e GIII respectivamente. Baseado na análise do gel, 43% das proteínas tem pesos entre 61.9 e 78.5 kDa, 39% entre 81.8 e 99.5 kDa e só 17% das bandas tem valores entre 118.3 e 202.3 kDa. A banda de 78.6 kDa foi encontrada em todos os grupos, mostrando maior intensidade nas células do cumulus obtidas do GIII. Igualmente, a banda 99.5 kDa esteve presente no GI e GI-24h, mas com maior intensidade no último grupo. Em conclusão, a identificação das proteínas expressas nas células do cumulus permitirá definir marcadores moleculares para qualidade dos oócitos. Além disso, este estudo contribuirá para o melhor entendimento de como as proteínas das células do cumulus modulam a competência oocitária e estão relacionadas com o desenvolvimento precoce do embrião.

**Palavras-chave:** Eletroforese; células do cúmulo; proteínas

SBTE 097 OPU-FIV/TE

Número de Submissão 1516

**Embriões oriundos da técnica de transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI) são capazes de desenvolver gestação em bovinos**

José Felipe Warmling Srícigo<sup>1</sup>; Severino Bernardino Sena Netto<sup>1</sup>; Carolle Vieira Mutterlle<sup>1</sup>; Felipe Manoel Costa Caixeta<sup>1</sup>; Sarah de Andrade Dias Rodrigues<sup>1</sup>; Ivo Pivato<sup>1</sup>; Margot Alves Nunes Dode<sup>2</sup>

1. Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil; 2. Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil.

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. A 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 o potencial dos embriões derivados da técnica de TIFOI em estabelecer gestação após transferência. Foram realizadas 3 réplicas, sendo que em cada réplica 5 vacas da raça Gir foram submetidas à OPU e 6 novilhas Nelore foram sincronizadas para serem utilizadas como receptoras de ovócitos (ovuladoras). Para sincronização das ovuladoras utilizou-se um protocolo convencional de IATF, com remoção da P4 e aplicação de 2 ml de prostaglandina no D-2, no D-1, 1 ml de BE, sendo D0 considerado o dia da injeção. Após a OPU das vacas Gir, os ovócitos de grau I e II foram acondicionados em 60  $\mu\text{L}$  de líquido folicular, em grupos entre 10-25, e injetados no folículo dominante. Para a seleção das ovuladoras, além do diâmetro levou-se em conta a irrigação folicular e somente foram usados animais que apresentavam um único folículo  $>10\text{mm}$  e com irrigação “inicial” entre 20-40% (aferido pelo ColorDoppler). A injeção dos ovócitos foi realizada aproximadamente 54 horas após a retirada da P4, ainda durante o cio. Foi utilizado uma guia de OPU (WTA) com uma probe de ultrassom de 7,5 MHz, além de um sistema de aspiração modificado. O sistema foi preenchido com PBS e, por pressão negativa, os ovócitos foram alocados na extremidade da agulha (27G X 90mm), juntamente com o líquido folicular. Logo após a TIFOI, uma única dose de sêmen descongelado de um touro da raça Gir foi utilizada para inseminação artificial (IA), seguida imediatamente pela administração de 2ml de GnRH. Oito dias após a TIFOI, os embriões foram coletados por lavagem uterina e o CL foi avaliado. A presença do CL foi confirmada no ovário em que foi realizada a injeção nos 6 (100%) animais. Do total dos 108 CCOs injetados, 28 (26%) estruturas foram recuperadas, sendo 11 (39%) embriões viáveis. Somente em 1 animal não foi recuperada nenhuma estrutura. Considerando que em cada lavagem uterina, provavelmente uma estrutura seria derivada do ovócito da ovuladora, após a exclusão das 5 estruturas (1 por vaca), 23 (21%) foram recuperadas, sendo 6 (26%) embriões viáveis. Após a transferência dos 11 embriões, 4 (36%) prenhez foram confirmadas aos 60 e 90 dias. Visto que após a lavagem uterina de uma única ovuladora foram recuperados 5 embriões e transferidos para 5 receptoras, e que 3 prenhez foram obtidas, pode-se supor que pelo menos 2 prenhez são oriundas dessa técnica. Esse primeiro relato de gestação utilizando a TIFOI em bovinos permite concluir que, apesar de ainda ser pouco eficiente, esta técnica produz embriões de qualidade que podem gerar prenhez após transferência.

**Palavras-chave:** Injeção ovocitária; embrião in vivo; prenhez

SBTE 098 OPU-FIV/TE

Número de Submissão 1533

**Impacto de protocolo com P4 injetável e ECG pré-aspiração na produção *in vitro* de embriões bovinos**

Fabiana Sonnewend<sup>1</sup>; João Paulo Nascimento Andrade<sup>1</sup>; Roberto Azevedo Rezende<sup>2</sup>; Alisson Nicolas Borges<sup>2</sup>; André Luis Silva<sup>2</sup>; Marco Roberto Bourg Mello<sup>1</sup>

1. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, São Jose dos Campos, SP, Brasil; 2. Girolando São Rafael, Andrelândia, MG, Brasil.

Objetivou-se com o presente trabalho avaliar o impacto de um protocolo de sincronização previamente a uma sessão de OPU na produção *in vitro* de embriões bovinos. Foram utilizadas 11 doadoras, sendo nove da raça Gir, uma Holandesa e duas mestiças (Holandês x Gir), mantidas a pasto de Brachiaria MG5 (Brachiaria brizantha cv mg5 vitória) e com suplementação mineral *ad libitum*. O estudo foi realizado em delineamento experimental "cross-over", de forma que todas as doadoras passassem pelos dois tratamentos. As fêmeas foram distribuídas em dois grupos: controle (CON; n=11) e experimental (EXP; n=11). As doadoras do grupo CON foram aspiradas em dia aleatório do ciclo estral. As fêmeas do EXP, em dia aleatório do ciclo estral, receberam 150mg de progesterona injetável im (SincroGest injetável®-Ouro Fino, São Paulo, Brasil), 2mg de benzoato de estradiol (ESTROGIN®, Agroline, São Paulo, Brasil) e 150µg de cloprostenol (CIOSIN®, MSD, São Paulo, Brasil), sendo este considerado dia 0 (D0). No D3, foram aplicadas 400UI de eCG (SincroeCG-Ouro Fino, São Paulo, Brasil) e as fêmeas submetidas à aspiração folicular (OPU) no D6. As OPUs foram realizadas com auxílio de ultrassom (Mindray DP-2200 Vet) e uma bomba de vácuo (BV-003D-WTA Brasil) acoplada a uma guia de aspiração, sempre pelo mesmo técnico. Foram avaliadas as seguintes variáveis: número de oócitos totais (OT), número de oócitos viáveis (OV), porcentagem de vacas com corpo lúteo no dia da OPU (CL) e taxa de blastocisto (TB). Os parâmetros foram analisados estatisticamente pelo teste t, para variáveis contínuas, e Qui-Quadrado para binomial, ambos com significância de 5%. Os grupos CON e EXP apresentaram, respectivamente, 249 e 310 OT; 119 e 151 OV e 46,42 e 31,57% para TB, sendo que não foi observada diferença significativa entre nenhum destes parâmetros. Entretanto, foi detectada diferença entre a porcentagem de doadoras que apresentavam CL no dia da OPU (68 e 18% para CON e EXP, respectivamente). Também foi estudada a relação entre a presença de CL e a porcentagem de oócitos viáveis (OV), independente do tratamento. As vacas que apresentavam CL no dia da OPU apresentaram maiores proporções de oócitos viáveis ( $P<0,05$ ) do que as vacas que não tinham CL na OPU (50,4 e 44% para animais com CL e sem CL, respectivamente). Conclui-se que o protocolo hormonal utilizado previamente à sessão de OPU foi capaz de reduzir o número de CL no dia da aspiração e não resultou em aumento da quantidade e qualidade de oócitos recuperados. A presença de CL no dia da sessão de OPU resultou em maior porcentagem de oócitos viáveis.

**Palavras-chave:** Aspiração folicular; doadoras; progesterona

SBTE 099 OPU-FIV/TE

Número de Submissão 1541

**Ultrassonografia modo Doppler colorido como substituta à laparoscopia na contagem de cl em ovelhas superovuladas**

Pedro Henrique Nicolau Pinto<sup>1</sup>; Gláucia Mota Bragança<sup>1</sup>; Ceci Ribeiro Leite<sup>1</sup>; Gustavo Bervian Santos<sup>1</sup>; Rômulo Mendonça da Rosa<sup>1</sup>; Vivian Angélico Pereira Alfradique<sup>1</sup>; Ioara Helena Santana Gonçalves<sup>1</sup>; Mário Felipe Alvarez Balaro<sup>1</sup>; Jeferson Ferreira da Fonseca<sup>2</sup>; Felipe Zandonadi Brandao<sup>1</sup>

1. UFF, Niterói, RJ, Brasil; 2. Embrapa, Coronel Pacheco, MG, Brasil.

Objetivou-se a adoção da ultrassonografia modo Doppler colorido como substituta à laparoscopia na avaliação de ovelhas da raça Santa Inês superovuladas. Vinte e cinco ovelhas nulíparas da raça Santa Inês ( $11,9 \pm 1,1$  meses de idade; ECC:  $2,8 \pm 0,3$ ) foram superovuladas, utilizando-se o conceito do protocolo Dia 0. Para sincronização prévia da emergência folicular, manteve-se por seis dias uma esponja vaginal contendo 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (Progespon®, Zoetis, Campinas-SP, Brasil); 24 horas antes da remoção do implante, aplicou-se por via intramuscular (IM) 300 UI de eCG (Novormon®, Schering Plough, São Paulo, Brasil) e 0,24mg de cloprostenol sódico (Estron®, Tecnopec, São Paulo, Brasil). Trinta e seis horas após a remoção da esponja, os animais receberam 25µg de lecorelina (Gestran Plus®, Tecnopec, São Paulo-SP, Brasil), IM. A superovulação iniciou 80 horas após a retirada da esponja. Utilizou-se 200 mg de FSH por animal (Folltropin-V®, Bioniche Animal Health, Ontario, Canadá) em seis doses decrescentes a cada 12 horas (50/50, 30/30, 20/20 mg), IM. Na última dose de FSH, aplicou-se 0,24 mg de cloprostenol (Estron®, Agener União, São Paulo, Brasil) e, 24 horas após, 25 µg de lecorelina (Gestran Plus®, Tecnopec, São Paulo-SP, Brasil), ambos IM. Em paralelo, na primeira dose de FSH uma nova esponja (Progespon®, Zoetis, Campinas-SP, Brasil) foi inserida e removida na penúltima dose deste hormônio. Após a última dose de FSH, realizou-se monta natural controlada a cada 12 horas até o final do estro. Doze horas antes da colheita de embriões, estimou-se o número de corpos lúteos (CL-DOPPLER) por meio da ultrassonografia modo Doppler colorido com o auxílio do equipamento Sonoscape S6® (SonoScape, Shenzhen, China), com transdutor linear de 7,5 MHz acoplado a um suporte plástico rígido para o acesso transretal. Previamente à colheita de embriões, o número de CLs foi novamente determinado por meio da laparoscopia (CL-

LAPARO). As variáveis CL-DOPPLER e CL-LAPARO foram comparadas entre si por meio do Índice de Correlação de Person, Análise de Regressão Linear Simples, e Índice de Correlação Intraclassa (ICC). Para todos os testes, considerou-se 1% de significância. Obteve-se uma alta correlação entre a contagem de CL-DOPPLER e CL-LAPARO ( $r=0,92$ ;  $r^2=0,85$ ;  $p<0,01$ ) e um excelente ICC ( $0,93$ ;  $p<0,01$ ). Em conclusão, a alta eficiência da ultrassonografia modo Doppler colorido para a estimativa do número de CLs em ovelhas superovuladas configura um avanço importante, pois elimina a necessidade de uma intervenção laparoscópica invasiva, jejum, uso de fármacos e manipulação desnecessária em animais que não responderam ao tratamento. Assim, a ultrassonografia modo Doppler colorido pode substituir a laparoscopia para a avaliação de resposta superovulatória em ovinos.

**Palavras-chave:** Superovulação; corpo lúteo; ultrassonografia doppler

SBTE 100 OPU-FIV/TE

Número de Submissão 1544

**Sincronização da emergência folicular para aumentar a produção *in vivo* de embriões ovinos da raça Santa Inês**

Rômulo Mendonça da Rosa<sup>1</sup>; Mário Felipe Alvarez Balaro<sup>1</sup>; Pedro Henrique Nicolau Pinto<sup>4</sup>; Helena Fabiana Reis de Almeida Saraiva<sup>1</sup>; Ribrio Ivan Tavares Pereira Batista<sup>1</sup>; Vivian Angélico Pereira Alfradique<sup>1</sup>; Lilian Santos Ribeiro<sup>1</sup>; Jefferson Ferreira da Fonseca<sup>2</sup>; Rodolfo Ungerfeld<sup>3</sup>; Felipe Zandonadi Brandão<sup>1</sup>

1.Faculdade de Veterinária – Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil; 2.Embrapa Caprinos e Ovinos, Coronel Pacheco, MG, Brasil; 3.Universidad de La República Uruguaniteroiy, Montevideú, Uruguai.

O estudo objetivou a avaliação de dois protocolos hormonais para a sincronização da emergência da onda folicular na produção de embriões em ovinos da raça Santa Inês sob clima tropical. Foram utilizadas 22 ovelhas núlparas da raça Santa Inês mantidas sob regime intensivo. Os animais de um grupo receberam um tratamento tradicional (GT;  $n=10$ ) um dispositivo intravaginal contendo 0,33g de progesterona (Eazi-Breed CIDR® Ovinos e Caprinos, Zoetis Ltda, São Paulo, Brasil) e 0,24 mg de clorprostenol (Estron®, Agener União, São Paulo, Brasil) por via intramuscular. As ovelhas do outro grupo tiveram a emergência da onda folicular sincronizada conforme proposto anteriormente (Balaro, M. Domestic Animal Endocrinology, v.54, p. 10-14, 2016) (GEm;  $n=12$ ). A superovulação iniciou após 56 e 80 horas, no GT e GEm, respectivamente. Para ambos os grupos, foi utilizado 200 mg de FSHp (Folltropin®, União Química Farmacêutica Nacional S/A, São Paulo, Brasil) em seis doses decrescentes (25%/25%, 15%/15% e 10%/10%), a cada 12 horas. No GEm, no momento da aplicação da primeira dose de FSHp foi inserida uma esponja impregnada com 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (Progespon®, Schering Plough, São Paulo, Brasil). Na aplicação da quinta dose de FSHp, as ovelhas também receberam 0,24 mg de clorprostenol (Estron®, Agener União, São Paulo, Brasil) e a esponja (GT) ou o implante intravaginal (GEm) foram retiradas ao administrar na última dose de FSHp. A detecção do estro e coberturas ocorreram, na sequência, a cada 12 horas. Após sete dias da última dose de FSH, os embriões foram coletados por meio da lavagem uterina cirúrgica. Utilizou-se o ultrassom (Sonoscape S6®, SonoScape, Yizhe Building, Yuquan Road, Shenzhen, China) acoplado a um transdutor linear de 7,5 MHz (via transretal) a fim de se avaliar a população folicular no dia do implante do progestágeno (D0), na primeira dose superovulatória e na contagem de CL antes da coleta de embriões. A ocorrência de regressão prematura de corpos lúteos (RPCL) também foi verificada. Os dados paramétricos normais e não-normais foram avaliados pelo teste t e Mann-Whitney, respectivamente. Dados de frequência foram avaliados pelo teste Exato de Fisher. Para ambos, considerou-se como significativo quando  $P<0,05$ . Não foram encontradas diferenças ( $P<0,05$ ) na quantidade de folicúlos no dia da inserção do progestágeno ( $7,8 \pm 2,6$  vs.  $6,0 \pm 1,6$ ) e na primeira dose de FSH ( $8,1 \pm 2,6$  vs.  $8,9 \pm 2,3$ ). O número de CL contados no dia da coleta também não diferiu ( $P>0,05$ ) entre GT ( $6,9 \pm 5,1$ ) e GEm ( $7,1 \pm 3,1$ ). O número de animais com RPCL no GT foi de 60% (6/10), superior ( $P<0,01$ ) aos 8,3% (1/12) encontrados no GEm. O número de estruturas coletadas ( $6,6 \pm 4,3$  vs.  $0,6 \pm 0,7$ ;  $P<0,01$ ) e embriões viáveis ( $4,6 \pm 3,9$  vs.  $0,3 \pm 0,5$ ;  $P<0,01$ ) foram superiores no GEm comparado ao GT. A taxa de recuperação também diferiu entre os grupos experimentais, sendo superior no GEm (75,6% vs. 8,1%;  $P<0,01$ ). A maior taxa de RPCL no GT contribuiu para o menor número de embriões viáveis obtidos. Assim, indica-se o GEm ao objetivar a produção de embriões em ovinos da raça Santa Inês manejados sob condições tropicais.

Suporte financeiro: CNPq, Faperj e Embrapa (Projeto 02.13.06.026.00.00)

**Palavras-chave:** Embrião; superovulação; ovino

SBTE 101 OPU-FIV/TE

Número de submissão 1548

**A maturação *in vitro* provoca alterações na expressão de miRNAs nos oócitos bovinos**

Maite Del Collado<sup>1</sup>; Juliano Coelho da Silveira<sup>1</sup>; Tiago Henrique Camara de Bem<sup>2</sup>; Marcelo de Luna Freire Oliveira<sup>1</sup>; Barabara Monteiro da Silva Marques Alves<sup>1</sup>; Augusto Castro Netto<sup>3</sup>; Luciano Andrade Silva<sup>1</sup>; Flávio Vieira Meirelles<sup>1</sup>; Felipe Percin<sup>1</sup>

1.FZEA-USP, Pirassununga, SP, Brasil; 2.FMRP-USP, Ribeirão Preto, SP, Brasil; 3.Fininvitro Reprodução Animal, Bauru, SP, Brasil.

A maturação oocitária ocorre em um momento em que a cromatina do oócito sofre condensação e cessa a transcrição. Todavia, o controle da expressão gênica pode ocorrer de modo pós-transcricional nestas células, em um mecanismo mediado por microRNAs (miRNAs). Pouco se conhece acerca do padrão de expressão de miRNAs em oócitos bovinos nas fases iniciais e finais de maturação. Também é desconhecido como a exposição de oócitos ao ambiente *in vitro* durante a maturação repercute na expressão dos miRNAs oocitários. O objetivo deste trabalho foi determinar a expressão de miRNA em oócitos bovinos imaturos e após a maturação *in vitro* e *in vivo*, identificar miRNAs diferencialmente expressos entre estes três grupos e as vias por eles reguladas. Para tal, pools (3 por grupo) de 20 oócitos desnudos provenientes de COCs imaturos e de COCs maturados *in vivo* e *in vitro* passaram por extração de RNA total mediante uso combinado de reagente TRIzol (Invitrogen) e do kit miRNeasy (Qiagen). A transcrição reversa foi realizada com o kit miScript PCR System (Qiagen). A análise de expressão por RT-qPCR de 348 miRNAs bovinos foi realizada com um total de 100ng do cDNA por repetição. Os dados foram normalizados pela média geométrica de 3 pequenos RNAs endógenos (RNT43 snoRNA, Hm/Ms/Rt T1 snRNA e bta-miR-99b). A expressão foi calculada pelo método  $2^{-\Delta Ct}$ , e os dados submetidos a ANOVA e teste Tukey, com nível de significância de 5%. Um total de 299 miRNAs foi expresso nos oócitos, sendo que destes, 23 foram exclusivamente expressos em oócitos imaturos, 8 em oócitos maturados *in vitro* e 7 em oócitos maturados *in vivo*. Dos miRNAs encontrados nos três grupos, 18 foram diferencialmente expressos, sendo que 4 foram superiores (bta-miR-106b, bta-miR-17-5p, bta-miR-155 e bta-miR-21-5p) e 2 inferiores (bta-miR-451 e bta-miR-764) no grupo *in vitro* comparado ao *in vivo*. Para estudar as vias reguladas por esses miRNAs, foi utilizada a ferramenta de bioinformática DIANA. Os resultados indicam que miRNAs superiores no grupo *in vitro* regulam genes nas vias da TGF-beta (12 genes), p53 (17 genes), adesão celular (17 genes), PI3K-Akt (47 genes), transporte de RNA (26 genes) e ciclo celular (24 genes). Ademais, o bta-miR-451 e bta-miR-764, inferiores no grupo *in vitro*, regulam genes das vias da mTOR (1 gene), de proteólise mediada por ubiquitina (1 gene), de biossíntese de glicoesfingolípídeos (2 genes), da via da TGF-beta (3 genes) e do metabolismo da glicina, serina e treonina (2 genes). miRNAs individuais ou vias reguladas por miRNAs diferencialmente expressos foram previamente associadas com a competência oocitária (Sohel et al., PLoS One, e78505, 2013). Em conclusão, a MIV provoca alterações na expressão de miRNAs associados a vias importantes para a maturação oocitária, com potenciais reflexos no controle transcricional e na qualidade oocitária e embrionária. Apoio financeiro: FAPESP (processos 2014/21034-3, 2014/03281-3 e 2012/50533-2).

**Palavras-chave:** Maturação *in vitro*; maturação *in vivo*; miRNAs

SBTE 102 OPU-FIV/TE

Número de submissão 1554

**Utilização de MAP-5 em protocolo superestimulatório P-36 em vacas da raça Angus (*Bos taurus*)**

Ramiro Martins Bonotto<sup>1</sup>; Fernanda De Souza Rosa<sup>1</sup>; Ana Lucia Martins Bonotto<sup>2</sup>; Bruna Mion<sup>3</sup>; Fabricio D. Mozzaquatro<sup>4</sup>  
1.FAI-Faculdades de Itapiranga, Itapiranga, SC, Brasil; 2.Central ABN Agropecuária, Santiago, RS, Brasil;  
3.Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil; 4.Unipampa Campus Uruguaiiana, Uruguaiiana, RS, Brasil.

A transferência de embriões é uma biotecnologia amplamente utilizada em vacas *Bos taurus*. Este princípio envolve a realização de um protocolo de superestimulação para indução de ovulações múltiplas. O protocolo P-36 é um dos mais utilizados com este propósito, pois permite a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), facilitando o manejo de doadoras e receptoras de embriões. A superestimulação é feita com oito doses decrescentes de pFSH a cada 12h, porém estudos mostram que a administração de pFSH com uma absorção lenta diminui o número de aplicações, mantendo uma produção de embriões semelhante. Por tanto, objetivou-se com o presente estudo comparar a superovulação de vacas utilizando o protocolo P-36 com redução no número de manejos. Foram utilizadas 24 vacas doadoras da raça Angus, distribuídas aleatoriamente em 2 grupos: Controle e MAP-5 (ácido hialurônico), em um delineamento "cross-over". Em dia aleatório do ciclo estral (D0), as doadoras receberam um dispositivo intravaginal contendo 1,0 g de progesterona (DIV) e benzoato de estradiol (3 mg, via IM). No grupo controle, os animais foram superestimulados com pFSH (via IM, dose total = 200 mg) duas vezes ao dia em doses decrescentes do D4 ao D7, enquanto que no grupo MAP-5 foram realizadas somente duas administrações no D4 (75% da dose) e D6 (25% da dose) de pFSH diluído em MAP-5 (5 mg/mL de ácido hialurônico). As coletas de embriões foram realizadas no D15 do protocolo. Os dados foram analisados no Proc Mixed do SAS com nível de significância a 5%, sendo consideradas as variáveis: número de folículos no dia da indução de ovulação, número de corpos lúteos no momento da coleta, número de estruturas totais coletadas, número de estruturas fertilizadas e número de embriões viáveis. O grupo controle demonstrou-se melhor que o grupo MAP-5 quanto ao número de folículos ( $10,08 \pm 0,61$  vs.  $8,25 \pm 0,61$ ;  $p=0,0275$ ) e de corpos lúteos ( $7,25 \pm 0,59$  vs.  $3,25 \pm 0,59$ ;  $p<0,0001$ ), o que resultou em uma taxa de ovulação de 71,90% para o grupo controle e 39,39% para o grupo MAP-5. Quanto ao número de estruturas totais ( $8,29 \pm 0,98$  vs.  $3,08 \pm 0,98$ ;  $p=0,0002$ ), estruturas fertilizadas ( $6,50 \pm 0,90$  vs.  $2,50 \pm 0,90$ ;  $p=0,0015$ ) e embriões viáveis ( $4,21 \pm 0,72$  vs.  $2,00 \pm 0,72$ ;  $p=0,0164$ ) o grupo controle também se demonstrou melhor quando comparado ao MAP-5. Assim, conclui-se que o protocolo superovulatório proposto utilizando MAP-5 não foi eficaz para doadoras da raça Angus.

**Palavras-chave:** Transferência de embriões; ácido hialurônico (MAP-5); pFSH (folitropin)

SBTE 103 OPU-FIV/TE

Número de submissão 1558

**Efeito da duração da etapa de maturação com diferentes atmosferas de oxigênio e do tipo de sêmen nas taxas de clivagem, produção de blastocisto *in vitro* e prenhez na raça nelore**

Natali Zanenga Chacha<sup>1</sup>; Raquel Zanetti Puelker<sup>2</sup>; Katarine Rezende Coelho<sup>1</sup>; Carlos Alberto Zanenga<sup>1</sup>; Maria Clara Caldas-Bussiere<sup>3</sup>; Valter Luis Maciel<sup>3</sup>; Célia Raquel Quirino<sup>3</sup>

1.Embriza, Campo Grande, MS, Brasil; 2.Progest Biotecnologia em Reprodução e Saúde Animal, Botucatu, SP, Brasil; 3.UENF, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil.

Este estudo teve como objetivo avaliar as condições de incubação estabelecidas durante a maturação *in vitro* (MIV) de oócitos (duração e tensão de oxigênio), o tipo de sêmen (convencional, n=12.177 e sexado, n= 3.630) e as possíveis correlações com as taxas de clivagem, produção de blastocistos e prenhez. COCs selecionados foram transportados em criotubos de 2mL (1 oócito/13,3µL de meio), contendo 400µL de meio de maturação TCM-199 (suplementado com 0,2 mM de piruvato, 10% de SFB e gonadotrofinas) e 300µL de óleo de silicone, a uma temperatura controlada de 38,5°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub>. Decorrido o período de transporte, os criotubos foram transferidos para incubadoras com 100% de umidade a 38,5°C, com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar ( $\cong$  20% O<sub>2</sub>), com um tempo total variando de 20-29 horas de MIV (média = 24 h). O tempo de fertilização foi fixado de acordo com o tipo de sêmen utilizado, sendo de 18 a 20 h para o sêmen convencional e 8 a 10 h para o sexado. Os prováveis zigotos foram desnudados e cultivados em meio SOFaa suplementado com 2,5% de SFB até 7 dias. As taxas de clivagem e de blastocistos foram avaliadas as 72 e 168 horas pós-inseminação (hpi), respectivamente, sendo os procedimentos da PIVE realizados no laboratório Embriza, localizado em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. As taxas de clivagem, blastocistos e prenhez foram analisadas pela análise de variância ANOVA; as médias foram comparadas pelo teste SNK (P<0,05) e as variáveis foram analisadas pela correlação simples de Pearson. As maiores taxas de clivagem e blastocistos (P<0,05) foram observadas quando se utilizou sêmen convencional (78,1%  $\pm$  22,79 e 36,0%  $\pm$  21,28) comparado ao sêmen sexado (58,3%  $\pm$  27,80 e 29,3%  $\pm$  20,39). A taxa de prenhez foi maior (P<0,05) quando se utilizou o sêmen sexado (65,5%  $\pm$  25,99) comparado ao sêmen convencional (56,7%  $\pm$  24,94). Quando avaliamos a correlação entre as variáveis, observamos que com o aumento na duração da MIV em transporte (atmosfera de 5% O<sub>2</sub>) houve diminuição na taxa de clivagem (r = - 0,083, P=0,0183). Contudo, o aumento da duração da MIV no laboratório (atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> em ar) aumentou a taxa de clivagem (r= 0,094, P=0,0074), mas não apresentou correlação com a taxa de blastocisto e prenhez. O tempo total de MIV não apresentou nenhuma correlação (P>0,05) com as variáveis estudadas. Portanto, conclui-se que: 1) A variação na duração da MIV e a atmosfera gasosa no transporte de oócitos não exerceu influência nas taxas de blastocisto e prenhez, sendo indicada a sua utilização quando o tempo de transporte; 2) a taxa de prenhez foi maior quando se utilizou sêmen sexado com um menor tempo de fertilização.

**Palavras-chave:** PIVE; efeito; Nelore

SBTE 104 OPU-FIV/TE

Número de submissão 1562

**Desenvolvimento pós-implantacional de embriões holandês-gir biopsiados**

Beatriz Abdalla Ferraz de Barros<sup>1</sup>; Célio Freitas<sup>1</sup>; Carolina Capobianco Romano Quintão<sup>2</sup>; Agostinho Jorge dos Reis Camargo<sup>3</sup>; Paola Maria da Silva Rosa<sup>1</sup>; Raquel Varella Serapião<sup>3</sup>; Clara Ana Santos Monteiro<sup>1</sup>; Luiz Sérgio de Almeida Camargo<sup>2</sup>; Clara Slade Oliveira<sup>1</sup>

1.EMBRAPA Gado de Leite LRA-CESM, Valença, RJ, Brasil; 2.EMBRAPA Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brasil; 3.Pesagro Rio, Niterói, RJ, Brasil.

A biópsia embrionária associada à genotipagem possibilita a obtenção de informações genômicas antes mesmo do nascimento dos animais. O objetivo deste estudo foi avaliar o desenvolvimento pós-implantacional de embriões mestiços Holandês-Gir biopsiados, para comprovar a segurança desta biotécnica. Para tanto, oócitos de doadoras Gir e mestiças ¼Holandes-¾Gir foram obtidos por aspiração folicular guiada por ultrassonografia, maturados e fertilizados com sêmen sexado (fêmea) de touro Holandês. Foi utilizado sistema de incubação a 38,5° C, 5% CO<sub>2</sub> em ar atmosférico e alta umidade, e meios de MIV, FIV e CIV da Bioklone® (Jaboticabal, Brasil). Aproximadamente 155h após a FIV, os blastocistos foram avaliados e posicionados em gotas individuais, e com o auxílio de lâmina de bipartição embrionária (The Micromanipulator Microscope Company®, USA), foi seccionada porção de aproximadamente 20% do embrião, no lado oposto à massa celular interna. Após 3-5 h em meio de cultivo HSOE (Bioklone®, Jaboticabal, Brasil) a 37°C (placa aquecedora), os embriões reexpandidos foram transferidos para receptoras com estro sincronizado (n= 247 embriões; Controle:118, Biópsia:129), dos quais 64 gestações (C:29; B:35) já foram concluídas e estão descritas no presente resumo. Os percentuais de prenhez (30dias), perdas gestacionais (30 a 90 dias, após 90 dias e natimortos) e machos nascidos foram comparados entre os grupos utilizando o teste exato de Fisher (p=0,05). As médias do período de gestação e peso da cria foram comparadas pelo teste T (p=0,05), no programa GraphPad Instat. Aos 30 dias após a transferência, foi observada redução (p=0,03) da taxa de gestação no grupo biópsia (C: 55,1% vs B: 41,1%). Entretanto, no grupo controle, foi observada perda embrionária superior (p=0,004) no período de 30 a 90 dias de gestação (B:0%; C: 13,8%). Desta forma, o percentual de

gestações 90 dias após a TE não diferiu ( $p=0,37$ ) entre os grupos (C: 47,5%; B: 41,1%). Assim, sugere-se que a técnica de biópsia promova uma seleção dos embriões com maior potencial de desenvolvimento, que não ocorre no grupo controle, no qual os embriões com baixo potencial implantam mas apresentam maiores taxas de morte até os 90 dias. As taxas de abortamento no terço médio e final da gestação (C: 3,4%; B: 8,6%,  $p=0,62$ ) e as perdas ao nascimento (C: 6,9; B: 5,7,  $p=1,00$ ) não diferiram entre os grupos. O período de gestação, expresso em média e desvio padrão de dias (C:  $280,6 \pm 3,83$  / B:  $280,7 \pm 4,25$  –  $p=0,92$ ), o peso da cria (C:  $33,0 \pm 4,5$  kg; B:  $34,5 \pm 5,0$  kg –  $p=0,25$ ), e o percentual de machos nascidos (C: 8,3%; B: 20% –  $p=0,41$ ) não diferiram entre os grupos. Conclui-se que a técnica de biópsia embrionária é segura e não afeta as taxas de produção de bezerros mestiços Holandês-Gir.

Agradecimentos: CNPq (118798/2015-4), FAPERJ (E-26/010.002920/2014), FAPEMIG e EMBRAPA Gado de leite.

**Palavras-chave:** Biópsia embrionária; PIVE; biotecnologia

SBTE 105 OPU-FIV/TE

Número de submissão 1563

### **Desempenho de raças bovinas submetidas à OPU e PIV na região do chaco central no Paraguai**

Gabriel Ferreira Soria<sup>1</sup>; Rafael Ferreira Soria<sup>1</sup>; Miguel Ferreira Soria<sup>1</sup>; Francisco Pedra Lopes<sup>1</sup>; Dario Sotomayor Romero<sup>2</sup>; Evald Friesen<sup>3</sup>

1.Fecunda Biotecnologia, Pedro Juan Caballero, Paraguai; 2.Reprogen, Asuncion, Paraguai; 3.Cooperativa Multiactiva Neuland Ltda., Colonia Neuland, Paraguai.

O desempenho de fêmeas das raças híbridas Brahman, Santa Gertrudis e da raça Gelbvieh submetidas à OPU e PIV foi avaliado, bem como a taxa de prenhez de seus embriões em ambiente semi-árido do Chaco Central, no Paraguai. As doadoras e receptoras são criadas em uma propriedade localizada nas coordenadas S 22°46'38" W 60°26'28", 50 Km a Oeste da Colônia Neuland, no departamento de Boqueron, em Gatton Panic (*Panicum maximum*) pastagem megatérmica adaptada à região, com registros de precipitação anual entre 800 a 1.000 mm e tem seu clima caracterizado como Semi-Árido Megatérmico de acordo com Thornthwaite. Os animais formam parte de um rebanho selecionado com objetivo de produzir reprodutores e matrizes para uso principalmente na região do Chaco paraguaio. As doadoras Brahman, Santa Gertrudis e Gelbvieh foram submetidas a sessões de OPU e PIV nos anos de 2014 a 2015, com repetições de sessões que variaram entre uma a sete por indivíduo; o período de trabalho foi de março a novembro de cada ano. A média total de oócitos recuperados por doadora aspirada, média total de embriões PIV transferidos por doadora aspirada e a taxa de prenhez para cada raça, no ano de 2014, foi: Brahman ( $n=16$ ): 15,04 ( $EP \pm 3,76$ ), 3,82 ( $EP \pm 0,96$ ) e 35,48% (77 prenhez / 217 TE); Santa Gertrudis ( $n=15$ ): 14,15 ( $EP \pm 3,65$ ), 3,57 ( $EP \pm 0,92$ ) e 46,53% (67 prenhez / 144 TE) e Gelbvieh ( $n=2$ ): 61,5 ( $EP \pm 43,49$ ), 32 ( $EP \pm 22,63$ ) e 56,25% (36 prenhez / 64 TE). Em 2015, a média total de oócitos recuperados, de embriões PIV transferidos e a taxa de prenhez para a raça Brahman ( $n=11$ ) foi de: 22,9 ( $EP \pm 6,90$ ), 5,87 ( $EP \pm 1,77$ ) e 52,23% (105 prenhez / 201 TE); e para a raça Santa Gertrudis ( $n=12$ ): 22,76 ( $EP \pm 6,57$ ), 4,8 ( $EP \pm 1,38$ ) e 55,26% (105 prenhez / 190 TE). Cabe ressaltar que apenas em 2014, em uma única sessão, duas fêmeas da raça Gelbvieh foram submetidas à OPU e tiveram diferença no total de oócitos recuperados: oito oócitos vs. 115 oócitos; e na PIV, um embrião transferido vs. 63 embriões transferidos, com prenhez de ambas doadoras. Com relação ao desempenho na OPU e PIV não houve diferença estatística quando se compararam as raças Brahman e Santa Gertrudis em um mesmo ano pelo teste t de Student ( $p < 0,1$ ); entretanto, observou-se maior recuperação de oócitos ( $p < 0,1$ ) em 2015 comparado a 2014 para as raças Brahman e Santa Gertrudis. Embora não se tenha observado diferença estatística na produção *in vitro* de embriões transferíveis, tanto esse parâmetro quanto a taxa de prenhez em 2015 foi numericamente maior em relação a 2014, demonstrando expectativa de ganho econômico dos produtores da região do Chaco paraguaio pelo uso das biotecnologias reprodutivas. A taxa de prenhez (%) foi mais elevada entre os embriões da raça Santa Gertrudis comparada à raça Brahman, em ambos os períodos. Os usos das biotecnologias reprodutivas assistidas (OPU, PIV e TE) apresentaram resultados satisfatórios entre as raças selecionadas nessa região, podendo ser utilizadas com sucesso em programas de melhoramento animal.

**Palavras-chave:** Fecundação *in vitro*; doadora; biotecnologia

SBTE 106 OPU-FIV/TE

Número de submissão 1569

### **Produção *in vitro* de embriões bovinos: substituição parcial do soro fetal bovino por albumina sérica bovina no cultivo *in vitro* e adição de ácido fólico na maturação oocitária**

Carolina Gennari Verruma<sup>1</sup>; Anderson Mioranza<sup>2</sup>; Cristiana Libardi Miranda Furtado<sup>3</sup>; Reginaldo Aparecido Vila<sup>3</sup>; Ester Silveira Ramos<sup>3</sup>; Raysildo Barbosa Lôbo<sup>3</sup>

1.Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, SP, Brasil; 2.Biovita, Cascavel, PR, Brasil; 3.Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

A PIVE bovina enfrenta dificuldades que prejudicam a produção e sobrevivência embrionária, como as diferenças morfológicas dos oócitos selecionados (grau I, II e III) e composição dos meios de MIV, FIV e CIV. Os componentes presentes no cultivo embrionário, bem como aqueles armazenados pelo oócito durante a maturação estão frequentemente associados à alterações genéticas e epigenéticas, influenciando na qualidade e consequente sucesso da PIVE. O SFB parece

influenciar na produção embrionária e tem sido relacionado com acúmulo anormal de lipídios durante o processo de criopreservação (Rumpf. Rev. Bra. de Zoo. 36, 229-233. 2007). Já o ácido fólico (AF) parece auxiliar na PIVE, corrigindo possíveis alterações epigenéticas relacionadas às tecnologias de reprodução (Kim et al. Journal of Nutritional Biochemistry. 20, 917-926. 2009). O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da substituição parcial do SFB pelo BSA na composição lipídica embrionária e, posteriormente, verificar a influência do AF na MIV de oócitos graus I e III visando o aumento da produção de embriões provenientes de oócitos grau III. O estudo foi realizado em duas etapas, ambas em triplicata. Na primeira etapa, oócitos (n=297) foram maturados em meio MIV (TCM199 com sais Earles, glutamina, SFB, FSH, LH, amicacina e estradiol). Os embriões foram cultivados em dois tipos de meios: CR2 controle (10% de SFB, 0,03g BSA V, alanina, glicina e amicacina em volume total de 10mL) ou CR2 modificado (5% de SFB, 0,03g BSA V, 0,03g de BSA V FAF, alanina, glicina e amicacina em volume total de 10mL). A produção embrionária foi avaliada utilizando o teste T de Student ( $P<0,05$ ) e a composição lipídica dos embriões, classificados como blastocistos expandidos no dia 7 (D7), foi determinada utilizando Ultra High Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry (UHPLC-MS). A redução de SFB não influenciou ( $P=0,35$ ) a produção embrionária no D7, no grupo controle ( $51,5\% \pm 6,1$ ) e modificado ( $44,9\% \pm 6,3$ ). A análise lipídica evidenciou que o cultivo embrionário em meio CR2 modificado reduziu a concentração de três classes fosfolipídicas, o dioleoil fosfatidilcolina (DOPC), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-[fosfo-rac-(1-glicerol)] (POPG) e esfingomielina (SM2) ( $P=0,04$ ,  $P=0,05$  e  $P=0,01$ , respectivamente). Este resultado corrobora com a hipótese de que o embrião pode absorver lipídios do SFB. Na segunda etapa, 360 oócitos (180 grau I e 180 grau III) foram maturados em meio MIV e 350 oócitos (180 grau I e 170 grau III) foram maturados em meio MIV (suplementado com 10 mM de AF em volume final de 10mL). O cultivo embrionário foi realizado em meio CR2 modificado. A produção embrionária foi avaliada através do teste t de Student ( $P<0,05$ ). A adição de AF no meio MIV aumentou ( $P=0,02$ ) a produção de embriões provenientes de oócitos grau III, apresentando um total de 56 embriões ( $32,6\% \pm 1,6$ ) sem AF e 64 embriões ( $42,3\% \pm 3,0$ ) com AF. Já em oócitos grau I não houve influência ( $P=0,29$ ) da suplementação com AF tendo, no D7, 88 embriões ( $52,7\% \pm 6,9$ ) sem AF e 84 embriões ( $45,4\% \pm 4,6$ ) com AF. Entretanto, mais estudos devem ser realizados para determinar os efeitos da suplementação com AF na etapa de MIV sobre a expressão gênica em oócitos de diferentes qualidades morfológicas.

**Palavras-chave:** Embrião bovino; fosfolipídio; ácido fólico

SBTE 107 OPU-FIV/TE

Número de submissão 1570

#### **Incremento no desenvolvimento de folículos pré-antrais equinos por seis dias de cultivo *in vitro* com suplementação de FSH**

Nathalia Covre da Silva; Marilu Constantino Max; Camila Bizarro da Silva; Suellen Miguez Gonzalez; Andressa Guidugli Lindquist; Isabela Búfalo; Marcelo Marcondes Seneda

*Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.*

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de diferentes concentrações do hormônio folículo estimulante (FSH) no meio essencial mínimo suplementado (MEM+) durante o desenvolvimento de folículos pré-antrais equinos cultivados *in vitro*. Os ovários de 5 éguas em anestro sazonal foram coletados em abatedouro local. Onze fragmentos de tecido ovariano com aproximadamente 3x3x1 mm foram obtidos a partir de um ovário de cada animal. Um fragmento foi selecionado aleatoriamente e imediatamente fixado e processado para análise histológica (grupo de Controle; Dia 0). O restante dos fragmentos foi colocado em PBS suplementado com penicilina (200 UI/mL) e estreptomicina (200 mg/mL) a 4° C durante 1 hora (período de transporte até o laboratório). Os fragmentos foram cultivados *in situ* durante 2 dias (D2) ou 6 dias (D6) em MEM+ (ITS (6,25 mg/mL insulina, 6,25 mg/mL transferina, e 6,25 ng/mL selênio), piruvato (0,23 mM), glutamina (2 mM), hipoxantina (2 mM), albumina sérica bovina (BSA; 1,25 mg/mL), 20 UI/mL de penicilina e 200 mg/mL de estreptomicina), acrescido de concentrações crescentes (10, 50, 100 e 200 ng/mL) de FSH (Folltropin®, Bioniche Canadá Inc, Ontário, Canadá), de acordo com os grupos experimentais: Controle (D0), MEM+ (D2), MEM+ (D6), MEM+ 10 ng/mL FSH (D2), MEM+ 10 ng/mL de FSH (D6), MEM+ 50 ng/mL de FSH (D2), MEM+ 50 ng/mL de FSH (D6), MEM+ 100 ng/mL de FSH (D2), MEM+100 ng/mL de FSH (D6), MEM+ 200 ng/mL de FSH (D2) e MEM+ 200 ng/mL de FSH (D6). Após o cultivo, os fragmentos foram fixados em Bouin e processados para histologia clássica. Os folículos pré-antrais foram classificados de acordo com a fase de desenvolvimento (primordial ou em desenvolvimento: primário + secundário) e quanto a sua morfologia (íntegros ou degenerados). O teste estatístico utilizado foi o Teste Exato de Fisher ( $P<0,05$ ). As lâminas (n=1187) com 4018 secções foram avaliadas por microscopia óptica. Os folículos foram observados em apenas 9,7% (388 de 4.018) das secções histológicas. Dos 861 folículos avaliados, 488 eram primordiais e 373 estavam em desenvolvimento em diferentes estágios (primários e secundários). Além disso, 59,7% eram morfologicamente íntegros. Após 2 dias de cultivo, os grupos cultivados com 200 ng/mL (61/94, 64,9%) de FSH, tal como a concentração 10 ng/mL (21/29, 72,4%) no cultivo por 6 dias apresentaram as melhores taxas de folículos em desenvolvimento comparando-os aos demais tratamentos. Em relação à integridade dos folículos pré-antrais equinos, a concentração de 100 ng/mL (75,6%) no cultivo por 2 dias e as concentrações de 50, 100 e 200 ng/mL (75,0%, 92,9% e 95,4%, respectivamente) no cultivo por 6 dias mostraram resultados superiores em relação ao restante dos grupos. Com base no desenvolvimento



folicular e na presença de folículos morfologicamente íntegros, pode-se concluir que houve um efeito positivo da adição de FSH no cultivo *in vitro*. Porém, os efeitos positivos variaram conforme a concentração aos 2 e 6 dias de cultivo.

**Palavras-chave:** Equino; FSH; folículo pré-antral

SBTE 108 OPU-FIV/TE

Número de submissão 1575

**Validação de modelo experimental para avaliação do crescimento final do folículo dominante de novilhas pré-púberes, tratadas com gonadotrofina coriônica equina (eCG)**

Mayara Mafrá Soares<sup>1</sup>; Gabriel Artur Marciano do Nascimento<sup>2</sup>; Giovana Bongioioli Magenis<sup>2</sup>; Vanessa Garcia Rizzi<sup>2</sup>; Lidia Marinho Silva Lima<sup>2</sup>; Carolina Cive Barbosa<sup>2</sup>; Letícia Hatsue Sobreda Doi<sup>2</sup>; Pietro Sampaio Baruselli<sup>3</sup>; Gustavo Guerino Macedo<sup>1</sup>

1.UFU, Uberlândia, MG, Brasil; 2.Ourofino, Cravinhos, SP, Brasil; 3.Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

O objetivo deste estudo foi validar um modelo de estudo para a onda de crescimento folicular de novilhas zebuínas pré-púberes, assim como o efeito da administração de eCG sobre o crescimento final do folículo dominante (FD). Para este trabalho foram utilizadas 20 novilhas da raça Nelore, com idade entre 12 a 16 meses, pesando  $237 \pm 11$  kg e ECC de  $3.04 \pm 0.17$ . No início do estudo (D0) os animais foram submetidos a duas avaliações ultrassonográficas (10 dias intervalo) para seleção dos que estavam em anestro, seguido do processo de OPU eliminando todos os folículos visíveis dos ovários, estimulando assim uma nova onda folicular. No D5, os animais foram submetidos a um escaneamento por US para efetuar o mapa ovariano com a mensuração do diâmetro dos folículos. No D6, os animais foram divididos de acordo com o tamanho do folículo dominante (FD) e peso, sendo distribuídos em dois tratamentos: injeção I.M de 1.5 mL de solução 0,5% NaCl (Controle; n = 10) ou 300 UI de eCG (Grupo tratado; Folligon®, MSD, São Paulo, Brasil; n = 10). Os animais tiveram seus ovários avaliados por US diariamente até o D12. As análises foram realizadas pelo proc GLIMMIX do SAS. Os dados foram apresentados em média  $\pm$  erro padrão e a significância foi considerada quando  $P < 0,05$ . Todas as fêmeas apresentaram nova onda folicular após a OPU, evidenciando que o modelo elaborado foi eficiente. No momento do tratamento os animais apresentaram o mesmo diâmetro de FD (Controle =  $8.1 \pm 0.4$  mm; eCG =  $8.4 \pm 0.3$  mm;  $p > 0,05$ ). Não houve efeito do eCG no diâmetro do folículo dominante (Controle =  $9.8 \pm 0.5$  mm; eCG =  $10.3 \pm 0.7$  mm;  $p > 0,05$ ) e na taxa de crescimento folicular até o ponto de regressão folicular (Controle =  $1.6 \pm 0.1$  mm/dia; eCG =  $1.9 \pm 0.2$  mm/dia;  $p > 0,05$ ). A emergência de uma segunda onda ocorreu mais rapidamente no grupo eCG ( $2,6 \pm 0,2$  dias) que no grupo Controle ( $3,9 \pm 0,3$  dias;  $p < 0,05$ ). A onda folicular foi mais longa no grupo eCG ( $5,1 \pm 0,5$  dias) que no Controle ( $4,5 \pm 0,2$  dias;  $p < 0,05$ ). Embora neste estudo a eCG não atue como indutora de ovulação, três vacas do grupo eCG ovularam evidenciando o seu papel no crescimento do FD e maior produção de E2 por este, estimulando um pico pré-ovulatório de LH. O estudo descreve o comportamento folicular de novilhas zebuínas pré-púberes por meio da demonstração de um modelo para estudos de dinâmica folicular em vacas em anestro, considerando sua eficiência em novilhas pré-púberes que apresentam baixa pulsatilidade de LH.

**Palavras-chave:** Onda folicular; OPU; bovinos

SBTE 109 OPU-FIV/TE

Número de submissão 1578

**Caracterização de oócitos de animais pré-púberes da raça Gir: tamanho do oócito, morfologia e atividade metabólica**

Paola Maria da Silva Rosa<sup>1</sup>; Beatriz Abdalla Ferraz de Barros<sup>1</sup>; Renata Pasolini<sup>2</sup>; Agostinho Jorge dos Reis Camargo<sup>2</sup>; Raquel Varella Serapião<sup>2</sup>; Clara Slade Oliveira<sup>1</sup>

1.EMBRAPA Gado de Leite LRA-CESM, Valença, RJ, Brasil; 2.Pesagro-Rio, Niterói, RJ, Brasil.

A raça Gir possui relevância significativa nos sistemas leiteiros do Brasil. No entanto, esta raça apresenta puberdade tardia, o que atrasa a sua vida reprodutiva. Uma possível abordagem para superar este atraso é a utilização de animais pré-púberes como doadoras de oócitos para FIV. O objetivo deste estudo foi avaliar, por meio de três abordagens (tamanho do oócito; citoplasma do oócito/qualidade de células do cumulus- avaliação morfológica e de coloração azul brilhante Cresil (ACB)), a qualidade do oócito de doadoras pré-púberes da raça Gir. Para isso, 10 animais pré-púberes foram submetidos a tratamento hormonal durante 18 dias (D0- implante P4 / 1g, D12-remoção do implante e administração de 0,5 mg ECP e 200 UI de eCG, D18- ovum pick up (OPU)). Os animais foram avaliados no D18, em relação à sua resposta ao tratamento hormonal, e agrupados como: Animais que não ovularam (PPN, n=6) ou animais que ovularam (PPO, n=4). As Vacas (V, n=4) foram utilizadas como controles para esta análise, e não foram sujeitas ao tratamento hormonal. Após a OPU, os oócitos foram selecionados e expostos à coloração ACB (Manjunatha et al, Theriogenology, V.68, p.1299-1304, 2007). Imagens de cada estrutura foram capturadas para análise utilizando o software ImageJ, em relação ao tamanho do oócito; avaliação morfológica com base em células do cumulus e citoplasma do oócito (G1, G2, G3 - viável; e G4 - não viável: oócitos desnudos, degenerados); e coloração ACB (ACB-: Oócitos em crescimento, com alto metabolismo de G6PDH; ACB+: Oócitos maduros, com baixo metabolismo de G6PDH). Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética local (CEUA-EGL protocolo: 24.2015). As médias do tamanho do oócito e o número de oócitos por animal foram comparadas por

ANOVA e avaliação morfológica e percentual de ACB foram comparadas pelo teste de qui-quadrado, entre os grupos V, PPN e PPO ( $p=0,05$ , Minitab Software). O número médio de oócitos ( $V=8\pm2,94$ ,  $PPN=18,3\pm13,70$ ,  $PPO=15,2\pm2,21$ ) e o tamanho médio dos oócitos ( $V=136,1\mu\text{M}\pm79,6$ ;  $PPN=132,3\mu\text{M}\pm46,3$ ;  $PPO=138,9\mu\text{M}\pm48,7$ ) não diferiu entre as categorias. A taxa de oócitos ACB+ também foi semelhante entre os grupos ( $C=78,1\%$ ,  $PPN=73,6\%$ ,  $PPO=68,8\%$ ). Em relação à qualidade morfológica, não foi detectada diferença entre os grupos em cada classe ( $G1: C=15,6\%$ ,  $PPN=13,6\%$ ,  $PPO=9,8\%$ ;  $G2: C=9,3\%$ ,  $PPN=14,5\%$ ,  $PPO=8,1\%$ ;  $G3: C=21,8\%$ ,  $PPN=20\%$ ,  $PPO=19,6\%$ ;  $G4: C=0\%$ ,  $PPN=2,7\%$ ,  $PPO=1,6\%$ ). Nenhuma diferença foi detectada na taxa de oócitos viáveis ( $G1, G2$  e  $G3$ ) entre os grupos ( $C=46,8\%$ ,  $PPN=48,1\%$ ,  $PPO=37,7\%$ ). Assim, em todas as três análises, não foi detectada diferença entre a qualidade do oócitos de vacas Gir e animais pré-púberes submetidos a tratamento hormonal, ovulando ou não. Este resultado sugere que os animais pré-púberes Gir podem ser utilizados como doadores de oócitos para produção de embriões *in vitro*, acelerando a sua vida reprodutiva.

Agradecimentos: Embrapa Gado de Leite, FAPERJ e FAPEMIG.

**Palavras-chave:** Qualidade oocitária; OPU; *Bos indicus*

SBTE 110 OPU-FIV/TE

Número de submissão 1584

**A centrifugação com amortecimento durante a seleção espermática incrementa as taxas de clivagem, fecundação e blastocistos na PIV de bovinos**

Cecília Isabel Inês Urquiza Falcão Machado; Fábio Gallas Leivas; Daniele Missio; Karine De Mattos; Daniela Dos Santos Brum

*Universidade Federal do Pampa, Uruguai, RS, Brasil.*

A centrifugação durante a seleção espermática visa além de remover o plasma seminal e diluente, incrementar a recuperação de espermatozoides viáveis. No entanto, esta etapa pode causar danos irreversíveis às células espermáticas. Buscando reduzir estas lesões, métodos de amortecimento têm sido utilizados com sucesso prévio ao congelamento de sêmen equino. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito protetor sob os espermatozoides bovinos do amortecimento durante centrifugação para seleção espermática utilizando o método de Gradientes Descontínuos de Percoll® (GDP), por meio da avaliação da taxa de fecundação e posterior desenvolvimento embrionário. O sistema de amortecimento foi realizado por meio da adição de 150µl de uma solução colóide (CushionFluid®; Minitube, Tiefenbach, Germany), sob os gradientes de Percoll® na primeira centrifugação. Cinco repetições foram realizadas, onde palhetas de dois touros *Bos taurus*, foram descongeladas e divididas em dois grupos: o Controle (C) utilizando apenas o método de GDP (Guimarães, A. G., Anim Reprod Sci, v. 146, p. 103-10, 2014); e o grupo tratamento (CC), método de GDP mais o sistema de amortecimento. Após a seleção espermática, uma dose de  $2 \times 10^6$  espermatozoides/mL foi destinada à FIV de oócitos previamente submetidos a maturação *in vitro*. Um total de 200 prováveis zigotos/tratamento foram desnudados e incubados em uma solução de Hoechst 33342 (10mg/mL) para avaliação da taxa de fecundação, sendo considerados fecundados zigotos com dois ou mais pro núcleos, ou núcleos fusionados. O restante dos prováveis zigotos (85/tratamento) foram cultivados individualmente durante sete dias em meio SOFaaci + 10% SEE (soro de égua em estro) e BSA, sob um sistema de monitoramento embrionário (Primo Vision, Cryo Mangement Ltda, Hungary). Os valores foram analisados por qui-quadrado ( $X^2$ ;  $P<0,05$ ). O grupo CC apresentou maior taxa de fecundação e clivagem (56,1 e 80%), quando comparado ao controle (45,9 e 64,7% respectivamente). Embora o momento da primeira clivagem tenha sido semelhante entre os tratamentos, observou-se que o sistema de amortecimento incrementou a taxa de clivagem até 28h após a FIV, quando comparado ao controle (32,5 e 18,8%, respectivamente), sugerindo que estes embriões possuem maior capacidade de atingirem o estágio de blastocisto (Barreta, M. H., Experimental Cell Research, v. 318, p. 10, 2012). Em relação aos embriões produzidos no D7, a taxa de blastocistos (BI) foi superior no CC (14,0%) quando comparado ao C (2,2%). Os resultados obtidos neste experimento sugerem que a centrifugação com amortecimento protege as células espermáticas, incrementando as taxas de fecundação, clivagem e blastocistos na PIV de embriões bovinos.

**Palavras-chave:** Sêmen bovino; Percoll; FIV

SBTE 111 OPU-FIV/TE

Número de submissão 1593

**Efeito da transferência com embriões frescos ou congelados e da qualidade embrionária sobre a taxa de prenhez em bovinos da raça Angus**

Bruna Mion<sup>1</sup>; Ramiro Martins Bonotto<sup>2</sup>; Ana Lucia Martins Bonotto<sup>3</sup>; Maicon Lorena Gaissler Pinto<sup>4</sup>; Fernanda de Souza Rosa<sup>2</sup>

*1. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil; 2.FAI-Faculdades de Itapiranga, Itapiranga, SC, Brasil; 3. Central ABN Agropecuária, Santiago, RS, Brasil; 4.Epagri Empresa de Pesquisa Agropecuária de Santa Catarina, Lages, SC, Brasil.*

O sucesso da transferência de embriões depende de fatores associados com o embrião, a receptora, a técnica de transferência, ou a interação entre esses fatores. Dentre eles, a qualidade embrionária tem importante influência na taxa de

prenhez, uma vez que embriões de qualidade boa ou excelente têm maiores chances de estabelecer gestação. Sabe-se que o processo de criopreservação pode diminuir a qualidade embrionária, tornando o congelamento um fator capaz de alterar o resultado obtido na transferência de embriões. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da transferência com embriões frescos ou congelados e da qualidade embrionária sobre a taxa de prenhez em bovinos da raça Angus. Foi realizada uma análise retrospectiva dos dados referentes a 3.211 inovulações realizadas na Central ABN Agropecuária, localizada no município de Santiago/RS, entre os anos de 2002 e 2015. Foram realizadas 2.358 inovulações com embriões frescos e 853 com embriões congelados, de qualidade 1 e 2, classificados de acordo com as normas da IETS. As receptoras foram previamente avaliadas e os embriões transferidos após sete dias do estro ( $\pm 24$  horas). Foi realizada avaliação ultrassonográfica após 30 dias, para o diagnóstico de gestação. A análise estatística foi realizada pelo teste qui-quadrado, utilizando o programa SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). O resultado obtido na transferência de embriões frescos (61,64%) e congelados (60,23%) foi semelhante ( $p=0,2373$ ). Contudo, a taxa de prenhez com embriões de qualidade 1 foi superior a com embriões de qualidade 2, obtendo-se o resultado de 64,81% e 57,94%, respectivamente ( $p=0,0014$ ). Desta forma, é possível concluir que a criopreservação não alterou a taxa de prenhez. Entretanto, os resultados obtidos com a transferência de embriões de qualidade diferente, confirmam o que é descrito pela literatura, que embriões de melhor qualidade proporcionam melhores resultados na TE.

**Palavras-chave:** Embrião; TE; criopreservação

SBTE 112 OPU-FIV/TE

Número de submissão 1605

**Efeito da redução do tempo de interação de oócitos e espermatozoides sobre a produção *in vitro* de embriões bovinos**

Ana Carolina Leite; Bárbara Vanelli Rocha Couto; Natália Vieira Sollecito; Telma Mata Martins; Philipe Pimenta Nunes; Eliane Beatriz Magalhães; Alan Maia Borges

UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil.

As condições de cultivo *in vitro* de embriões bovinos têm papel fundamental na clivagem, ativação do genoma embrionário, diferenciação e viabilidade embrionária (Moore et al., Theriogenology, v.68, p.1316, 2007). Além disso, o tempo de co-incubação dos gametas feminino e masculino tem papel essencial em sistemas de fecundação *in vitro* (FIV). Já está bem estabelecido que a incubação de CCOs com espermatozoides, na concentração de  $1-1,5 \times 10^6$  espermatozoides/mL por 18 a 22 horas, produz taxas aceitáveis de produção de embriões. No entanto, também tem sido documentado que a redução do tempo de incubação dos gametas, de 18-24 para 10 horas, utilizando-se baixa concentração de espermatozoides, é capaz de produzir taxas semelhantes de desenvolvimento embrionário. Longos períodos de FIV, bem como altas concentrações espermáticas, aumentam a incidência de polispermia e reduzem a produção embrionária (Berland et al., Vet. Science, p.1, 2011). O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da redução do tempo de interação de oócitos e espermatozoides, durante a fecundação *in vitro*, sobre o potencial de desenvolvimento de embriões bovinos. Oócitos maturados *in vitro* foram submetidos à fecundação com sêmen de touro da raça Holandesa, previamente testado, utilizando-se a concentração espermática de  $0,3 \times 10^6$  espermatozoides/mL, por 10 ou 18 horas de incubação. Os possíveis zigotos foram cultivados em meio SOF acrescido de BSA e SFB por sete dias. Avaliou-se o número de oócitos maturados pré-inseminação, a taxa de clivagem às 72 horas e a produção de blastocistos no oitavo dia pós-fecundação. Para avaliação da maturação dos oócitos, clivagem embrionária e produção de blastocistos foi realizada análise de contingência pelo teste Exato de Fisher. Foram utilizados 1343 oócitos maturados, divididos em dois tempos de incubação para FIV: 10 horas ( $n=533$ ) e 18h ( $n=810$ ). A taxa de maturação dos CCOs submetidos à FIV foi de 96,6% e 92,2% para os grupos 10h e 18h de fecundação, respectivamente, e não diferiu entre os tratamentos. A porcentagem de clivados com 10h de incubação (86,1%) foi superior à 18h (79,1%) ( $P<0,05$ ). A produção de blastocistos em relação ao total de clivados foi de 80,4% e 51,3% para 10h e 18h, respectivamente ( $P<0,05$ ). A taxa de produção de blastocistos em relação ao total de CCOs submetidos à maturação *in vitro* também foi superior em 10h de incubação (69,2%) comparando-se com 18h (40,6%) ( $P<0,05$ ). Observou-se que é possível produzir taxas mais altas de blastocistos utilizando-se 10 horas de duração da co-incubação de espermatozoides na fecundação *in vitro* de oócitos bovinos.

**Palavras-chave:** Fecundação *in vitro*; interação de oócitos e espermatozoides; produção *in vitro* de embriões

SBTE 113 OPU-FIV/TE

Número de submissão 1606

**Efeito da suplementação de vacas pantaneiras com linhaça (*Linum usitatissimum* L.) Sobre a produção *in vitro* de embriões – resultados preliminares**

Ana Caroline Bini de Lima; Christopher Junior Tavares Cardoso; Giovanna de Lima Ortiz; Leticia da Silva Paes; Pedro Gustavo Loesia Lima; Ruan Francisco Da Silva; Wilian Aparecido Leite da Silva; Mariane Gabriela Cesar Ribeiro Ferreira; Mirela Brochado Souza; Fabiana de Andrade Melo Sterza

UEMS, aquidauana, MS, Brasil.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação com linhaça sobre a produção de embriões bovinos obtidos por OPU. Nesse sentido, foram utilizadas seis vacas da raça Pantaneira, com condição corporal de 3,5 – 4,0 (escala de 1-5), manejados em regime de pastejo rotacionado em capim Mombaça (*Panicum maximum*) e suplementadas com 2 kg de ração concentrada (22% PB e 70% NDT) ao dia. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos experimentais: grupo controle (CONTR, n = 3) e grupo linhaça (LINH, n = 3), diferindo apenas pelo fornecimento de 0,800kg/animal/dia de linhaça na dieta do grupo LINH. O período de suplementação foi de 92 dias em que foram realizadas 3 sessões de aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU) com intervalo médio de 30 dias entre si. Os animais foram submetidos a OPU em um dia aleatório do ciclo estral sem estimulação hormonal. Foram obtidos 313 Complexos Cumulus Oócitos (COC's) e apenas COC's de grau 1 e 2 foram considerados viáveis e submetidos a maturação *in vitro* (MIV) por 24 horas em TCM 199 suplementado com 10% de SFB, 22 µg/mL de piruvato, 0,5 µg/mL de hormônio foliculo estimulante e 50 µg/mL de hormônio luteinizante. Após a MIV, os COCs foram colocados em gotas de 100 µL de meio Tyrodes, suplementado com 0,6 % de albumina sérica bovina (BSA), gentamicina, 22 µg/mL de piruvato e 10 µg/mL de heparina. Foi utilizado sêmen de um único touro da raça Pantaneira com fertilidade comprovada na fecundação *in vitro* (FIV), o qual foi preparado em gradiente de Percoll®. A dose inseminante foi de 10<sup>6</sup>espermatozoides vivos/mL. A FIV foi realizada em meio Talp por 18-22 horas e o cultivo *in vitro* em meio SOF contendo 8 mg/mL de BSA livre de ácido graxo, 1 mM de glutamina e 5% de SFB, onde os prováveis zigotos foram mantidos por 8 dias (D8). Todas as etapas da PIVE foram realizadas com produtos da Sigma Aldrich®, em incubadora a 38,5 °C, 5% de CO<sub>2</sub> e máxima umidade. Foi realizado delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2 x 5 (2 tratamentos x 5 repetições). Não houve efeito ( $P > 0,05$ ) da suplementação lipídica sobre a taxa de clivagem (67,62% vs 72,0% grupo controle e linhaça, respectivamente), bem como da taxa de blastocistos (CONTR 30,98% vs LINH 30,11%). Conclui-se que a suplementação com 0,800 kg de linhaça na dieta de vacas Pantaneiras não interferiu sobre a produção de embriões produzidos *in vitro*.

Agradecimentos a FUNDECT, CNPq e CPP.

**Palavras-chave:** Suplementação; embriões; bovinos

SBTE 114 OPU-FIV/TE

Número de submissão 1607

**Efeito da categoria (pré-púberes, púberes e prenhes) na produção *in vitro* de embriões de novilhas da raça holandesa**

Bernardo Marcozzi Bayeux<sup>1</sup>; Luciano Mundim de Carvalho<sup>2</sup>; Yeda Fumie Watanabe<sup>1</sup>; Rodolfo Daniel Mingoti<sup>3</sup>; Aline de Sousa Oliveira<sup>3</sup>; Marina Okano Chiba<sup>3</sup>; Alexandre José Azrak<sup>4</sup>; Pedro Meirelles do Nascimento Castro<sup>5</sup>; Alexandre Henryli Souza<sup>6</sup>; Pietro Sampaio Baruselli<sup>1</sup>

1.Departamento de Reprodução Animal, VRA-FMVZ-USP, São Paulo, SP, Brasil; 2.Bovigênese Biotecnologia da Reprodução, Bofete, SP, Brasil; 3.Watanabe Tecnologia Aplicada (WTA), Cravinhos, SP, Brasil; 4.PECTEC Manejo e Assessoria, Ribeirão Preto, SP, Brasil; 5.Médico Veterinário Autônomo, Ribeirão Preto, SP, Brasil; 6.CEVA Sante Animale, Paulínia, SP, Brasil.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a produção *in vitro* de embriões em novilhas da raça Holandesa (*Bos taurus*). Um total de 179 animais de 3 categorias: novilhas pré-púberes (PP, 8 a 10 meses; n = 60), novilhas púberes (PU, 10 a 12 meses; n = 60) e novilhas prenhes (PR, 14 a 18 meses; n = 59) foram submetidas à aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU), em fase aleatória do ciclo estral. As novilhas foram confirmadas como não cíclicas (pré-púberes) ou cíclicas (púberes) pela presença ou ausência de corpo lúteo avaliado por meio de ultrassonografia (Mindray® DP 2200) 14 dias antes e imediatamente antes da OPU. Foram realizadas seis réplicas com 10 animais de cada categoria, totalizando 30 doadoras por réplica. Em cada réplica, todos os folículos  $\geq 2$  mm foram puncionados e o total de estruturas recuperadas, quantidade e qualidade de oócitos viáveis foram registrados. Os oócitos viáveis foram submetidos à produção *in vitro* e o desenvolvimento embrionário (taxa de clivagem e de blastocisto) foi avaliado. No dia 7 da produção *in vitro* os embriões foram vitrificados para posterior transferência. Os oócitos foram fertilizados com sêmen sexado de um mesmo touro da raça Holandesa (*Bos taurus*) e mesma partida. Os dados obtidos foram analisados utilizando o procedimento GLIMMIX do SAS®. As novilhas púberes apresentaram maior número de oócitos recuperados ( $PU=15,6 \pm 1,4^a$  vs  $PP=9,8 \pm 1,3^b$  vs  $PR=9,8 \pm 1,6^b$ ;  $P < 0,001$ ) e de oócitos viáveis ( $PU=9,1 \pm 0,95^a$  vs  $PP=4,6 \pm 0,6^b$  vs  $PR=5,6 \pm 1,1^b$ ;  $P < 0,001$ ) quando comparadas às demais categorias. Diferentemente, a taxa de clivagem foi semelhante entre novilhas púberes e prenhes ( $PU=56\%^a$  vs  $PR=78\%^a$  vs  $PP=31\%^b$ ;  $P < 0,001$ ). No entanto, novilhas prenhes apresentaram maior número de embriões produzidos por OPU ( $PR: 1,76 \pm 0,3^a$  vs  $PU: 0,9 \pm 0,2^b$  vs  $PP: 0,13 \pm 0,1^c$ ;  $P < 0,001$ ) e maior taxa de blastocisto ( $PR=37\%^a$  vs  $PU=4\%^b$  vs  $PP=2\%^c$ ;  $P < 0,001$ ) quando comparadas às demais categorias. Dessa maneira, a produção *in vitro* de embriões de novilhas prenhes apresentou melhores resultados quando comparadas às novilhas pré-púberes e púberes da raça Holandesa (*Bos taurus*).

**Palavras-chave:** Novilhas; PIVE; *Bos taurus*

SBTE 115 OPU-FIV/TE

Número de submissão 1620

**Kisspeptina: Efeito na maturação *in vitro* de ovócitos bovinos**

Mayara Oliveira<sup>1</sup>; Kele Amaral Alves<sup>2</sup>; Luciana Ribeiro Peixoto<sup>1</sup>; Tatiane Silva Maia<sup>1</sup>; Emílio César Martins Pereira<sup>1</sup>; José Octavio Jacomini<sup>1</sup>; Marcelo Emílio Belleti<sup>1</sup>; Ricarda Maria Santos<sup>1</sup>; Gustavo Guerino Macedo<sup>1</sup>

1.Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil; 2.Universidade Estadual do Ceará, Itaperi, CE, Brasil. Objetivou-se avaliar diferentes concentrações de kisspeptina, assim como a interação da kisspeptina e FSH/LH na MIV e na competência ovocitária de bovinos. No experimento 1 foi determinada a concentração mínima de Kisspeptina (Kp) a ser utilizada, e no Experimento 2 foi avaliada sua interação com FSH e LH. Foram coletados ovários bovinos em abatedouro comercial e apenas ovócitos Grau I foram utilizados. No Experimento 1 foi utilizado como embasamento a adição de 10-6M de Kp-10, usada na maturação *in vitro* de ovócitos de suínos (Saadeldin, I.M. Reproduction, Fertility and Development, v.24(5), p.656-668, 2012). Os ovócitos foram cultivados em meio TCM-199 com Bicarbonato, acrescido de 10% de SFB, piruvato de sódio (22µg/mL), amicacina (83mg/mL), FSH (0,5 µg/mL) com diferentes concentrações de Kp, sendo: T1.1: FSH + 0M Kp-10; T1.2: FSH + 10-7M Kp-10, T1.3: FSH + 10-6M Kp-10; T1.4: FSH + 10-5M Kp-10. No Experimento 2, foi utilizada a melhor concentração de Kp encontrada no Experimento 1, nos seguintes tratamentos: T2.1: sem hormônios; T2.2: FSH; T2.3: FSH + Kp-10; T2.4: FSH + LH; T2.5: FSH, LH + Kp-10; T2.6: Kp-10. A competência ovocitária foi determinada pela maturação nuclear, distribuição mitocondrial, intensidade de fluorescência de MitoTracker® Orange CMTMRos e DCF. A avaliação da maturação nuclear foi realizada após 24h de incubação e os ovócitos foram corados com DAPI para determinar o estágio nuclear (Vesícula Germinativa-VG, MetáfaseI-MI e MetáfaseII-MII). A distribuição mitocondrial, classificada em periférica/semiperiférica e difusa em aglomerados/grânulos, e a intensidade de fluorescência, foram avaliadas após a coloração com o MitoTracker® Orange CMTMRos. Para determinar a intensidade de ROS os ovócitos foram corados com DCF. As análises foram realizadas pelo PROC GLIMMIX do SAS. No Experimento 1 ovócitos em meio com apenas FSH atingiram uma menor maturação nuclear quando comparados àqueles maturados com a Kp em diferentes concentrações (T1.1:13/33; T1.2:28/35; T1.3:30/34; T1.4:28/32; P=0,0001). Não houve diferença estatística na distribuição mitocondrial entre os tratamentos (P>0,05). A intensidade de fluorescência do MitoTracker não variou entre os tratamentos (P>0,05). A intensidade de fluorescência do DCF foi menor, quanto maior a concentração de Kp no meio (T1.1:12177726,1; T1.2:10945982,83; T1.3:9820536,53; T1.4:9147016,38; P<0,0001). Baseado nos resultados do Experimento 1, a concentração de Kp foi determinada em 10-7M. No Experimento 2 a distribuição mitocondrial foi diferente entre os tratamentos, pois ovócitos maturados apenas com Kp ou FSH+LH, apresentaram maior competência ovocitária do que aqueles que foram maturados apenas com FSH ou sem a adição dos hormônios (T2.1:66,66%; T2.2:66,66%; T2.3:75,86%; T2.4:91,17%; T2.5:82,85%; T2.6:91,17%; P<0,05). O T2.1 resultou em uma menor maturação nuclear do que os demais tratamentos (T2.1:5/18; T2.2:18/32; T2.3:22/29; T2.4:26/33; T2.5:26/34; T2.6:25/34; P=0,0094). A intensidade de fluorescência das probes MitoTracker e DCF foi menor quando a Kp foi adicionada ao meio de maturação (T2.1:1228363/540069; T2.2:2307984/1395751; T2.3:1941890/1114948; T2.4:2502145/1722376; T2.5:2286173/1467782; T2.6:1859411/979325; P<0,0001). Assim, esse é o primeiro trabalho que evidencia que a Kisspeptina estimula a maturação ovocitária sem a presença de gonadotrofinas no meio de maturação.

**Palavras-chave:** Competência ovocitária; vacas; kisspeptina

SBTE 116 OPU-FIV/TE

Número de submissão 1627

### **Produção *in vitro* de embriões bovinos em meio de cultivo contendo diferentes concentrações de antioxidante extraído do óleo de *Lippia organoides***

Natália Vieira Sollecito<sup>1</sup>; Emílio César Martins Pereira<sup>2</sup>; João Gabriel Viana de Grázia<sup>1</sup>; Ana Carolina Leite<sup>1</sup>; Bárbara Vanelli Rocha Couto<sup>1</sup>; Virgílio Barbosa Andrade<sup>1</sup>; Eliane Beatriz Magalhães<sup>1</sup>; Alan Maia Borges<sup>1</sup>

1.Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil; 2.Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil.

Na produção *in vitro* de embriões tem-se buscado alternativas para aumentar a taxa de blastocistos, dentre elas a adição de antioxidantes aos meios de cultivo. Este estudo teve como objetivo avaliar as taxas de clivagem e de produção *in vitro* de blastocistos bovinos, utilizando-se meios de maturação e cultivo contendo os antioxidantes cisteamina e o extraído do óleo da *Lippia organoides*. Foram utilizados ovários bovinos de abatedouros, transportados em solução salina NaCl 0,9% a 38,0°C até o laboratório. A aspiração folicular foi realizada com agulha (40x12G) acoplada a seringa descartável de 5ml, e o líquido folicular foi depositado em tubos de 15ml, por 10 minutos, para sedimentação dos oócitos. O sobrenadante foi retirado e o excedente foi lavado em TCM-199 HEPES. Foram selecionados oócitos de graus 1 e 2, de acordo com a análise das células do complexo cumulus oophorus. Os oócitos foram lavados em meio TCM-bicarbonato suplementado com 10% de soro fetal bovino + 22µg/ml de piruvato de sódio + 50µg/ml de sulfato de gentamicina + 5µg/ml de LH + 1µg/ml de FSH + 10µg/ml de estradiol + 2,5µg/ml de antioxidante da *Lippia organoides* e, posteriormente, foram incubados em estufa de cultivo em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> a 38,5°C, por 22 a 24 horas. A fecundação *in vitro* dos oócitos foi realizada com 1x10<sup>6</sup> espermatozoides, incubados em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> a 38,5°C, por 18 a 20 horas. Após esse período, os oócitos foram desnudados mecanicamente e divididos em cinco tratamentos que continham meio SOF-m (modificado) sem acréscimo de antioxidantes (T1), meio SOF-m suplementado com 50µM/mL de cisteamina (T2), e meio SOF-m suplementado com 2,5; 5,0 e 10µg/ml de antioxidante da *Lippia organoides* (T3; T4 e T5, respectivamente). O

teste de Shapiro Wilk foi utilizado para avaliar a normalidade das variáveis contínuas. Para análise estatística foi utilizado os testes ANOVA (post-hoc Tukey) e Kruskal-Wallis, com nível de significância de  $P < 0,05$ . As taxas de clivagem não diferiram entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ) e foram de 74,5; 72,5; 66,7; 67,3 e 64,2%, respectivamente para T1, T2, T3, T4 e T5. As taxas de produção de blastocistos foram de 40,4; 28,6; 24,1; 30,7 e 33,8%, para T1, T2, T3, T4 e T5, respectivamente. A taxa de produção de blastocistos do T1 foi superior ( $P < 0,05$ ) ao T5. Já o T2, T3 e T4 não diferem entre si ( $P > 0,05$ ). Apesar dos tratamentos suplementados com o antioxidante da *Lippia origanoides* apresentarem taxas de clivagem satisfatórias, a produção final de blastocistos nos grupos suplementados com antioxidantes foi inferior à encontrada no grupo controle. Sendo assim, no presente trabalho, a utilização do óleo de *Lippia origanoides*, não apresentou bons resultados para taxa de blastocistos na produção *in vitro* de embriões.

**Palavras-chave:** Produção *in vitro*; antioxidante; *Lippia origanoides*

SBTE 117 OPU-FIV/TE

Número de submissão 1642

**Efeito do tratamento com FSH sobre o escore de vascularização ovariana em vacas holandesas doadoras de oócitos**

Júlio César Barbosa Silva; Roberta Machado Ferreira; Bruna Marcele Oliveira; Kleber Menegon Lemes; Milton Maturana Filho; Julianne de Resende Naves; Thiago Santin; Guilherme Pugliesi; Ed Hoffmann Madureira

USP, Pirassununga, SP, Brasil.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes tratamentos hormonais sobre o escore de vascularização ovariana de vacas doadoras de oócitos. O experimento foi conduzido na Fazenda Santa Maria, Pouso Alegre - MG. Trinta e seis vacas da raça Holandesa, não lactantes e não gestantes foram homogeneamente divididas em 3 grupos experimentais: controle e tratadas com 4 (4FSH) ou 6 (6FSH) aplicações de FSH. Para possibilitar uma distribuição equitativa das vacas entre os grupos de tratamento, foi considerado o ECC e histórico de produção de oócitos e embriões das doadoras, pois as mesmas participavam de um programa comercial mensal de PIVE. Todas as vacas foram mantidas em piquetes com pastagem, água e mistura mineral ad libitum, além de suplementação com 2 kg de concentrado contendo 12% de proteína. Em dia aleatório do ciclo estral, definido como D0, todas as vacas receberam um dispositivo intravaginal com 1 g de P4 (Primer®, Tecnopec, São Paulo, Brasil), associado à administração i.m. de 2 mg de benzoato de estradiol (Ric-BE®, Tecnopec, São Paulo, Brasil). As vacas do grupo controle, ( $n = 12$ ) não receberam aplicação de FSH. Já as vacas do grupo 4FSH ( $n = 12$ ) receberam 200 mg de FSH, nos dias D4 e D5, divididos em quatro doses iguais de 50 mg cada, em intervalos de 12 h. Nos D3, D4 e D5, as vacas do grupo denominado 6FSH ( $n = 12$ ) receberam mesma dose de FSH (200 mg, Folltropin, Tecnopec, Brasil), porém divididos em seis doses de 33,3 mg administradas com intervalos de 12 h. As vacas dos três grupos foram tratadas com PGF2 $\alpha$  (Cioprostin®, Inovare Biotecnologia e Saúde Animal Ltda, São Paulo, Brasil) no D3 de manhã. No D7, o dispositivo de P4 foi retirado e em seguida a vascularização ovariana foi avaliada, utilizando-se um aparelho de ultrassonografia Doppler com transdutor linear transretal de 6,5 MHz (M5vet, Mindray®, China). O modo color Doppler foi utilizado para a avaliação subjetiva da vascularização dos ovários. As imagens de ambos os ovários foram acompanhadas por 10 a 15 seg em cada ovário, gravadas e analisadas por dois avaliadores diferentes. Uma classificação em escores de 1 a 4 foi realizada de acordo com o filme obtido de cada ovário, sendo 1 (um) referente à vascularização mínima e 4 (quatro) à vascularização máxima, adaptado de Silva e Ginther (J. Reproduction 139, n. 2, p. 453-463, 2010). Todas as vacas passaram por todos os tratamentos, em delineamento crossover. Os dados foram analisados pelo PROC GLIMIX do SAS 9.3, utilizando contrastes ortogonais. O escore de vascularização ovariana foi semelhante ( $P = 0,43$ ) em vacas tratadas ( $1,9 \pm 0,1$ ) ou não ( $1,7 \pm 0,1$ ) com FSH. Também não foi observado efeito da dose de FSH ( $P = 0,67$ ) sobre a vascularização ovariana (4FSH =  $1,8 \pm 0,1$  e 6FSH =  $1,9 \pm 0,1$ ). Portanto, pode-se concluir que o tratamento com FSH, independentemente do fracionamento de sua dose em 4 ou 6 momentos de administração, não influenciou na vascularização ovariana avaliada por color Doppler.

Agradecimentos: Menge Gado Holandês, União Química e CNPq 486089/2013-4.

**Palavras-chave:** Doppler; FSH; OPU

SBTE 118 OPU-FIV/TE

Número de submissão 1649

**Efeito do Catosal® B12 na reprodução animal: qualidade de ovócito e produção embrionária**

Emivaldo de Siqueira Filho<sup>1</sup>; Andrei Antonioni Fidelis<sup>2</sup>; Andreia Faria Silva<sup>1</sup>; Louynne Conceição Feliciano<sup>1</sup>; Mara Emília Abadia<sup>1</sup>; Alexandre Sardinha Carvalhêdo<sup>1</sup>

1. Embriotec Reprodução Animal, Anápolis, GO, Brasil; 2. UPIS, Brasília, DF, Brasil.

Raças taurinas produzem baixas taxas de embriões *in vitro*, sendo um dos principais motivos a baixa qualidade e quantidade de ovócitos recuperados após aspiração folicular quando comparados com raças zebuínas. A utilização de Catosal® B12 tem sido descrita como responsável por melhorias no metabolismo energético do animal. Este projeto avaliou o efeito do uso do Catosal® B12 em fêmeas da raça holandesa tratadas previamente ao procedimento de produção *in vitro* de embriões. Um total de 57 animais foi submetido à aspiração folicular. Dois grupos foram formados: 1º - controle (19 vacas), sem uso de Catosal® B12; 2º - tratado (38 vacas), com duas aplicações de Catosal® B12 antes da aspiração folicular. Para o

tratamento com catosal empregou-se o seguinte delineamento: D0 – 1 ° aplicação de catosal – 25 ml; D3- 2 ° aplicação de catosal – 25 ml; D6- aspiração folicular. Os ovócitos aspirados foram colocados em microgotas com meio de maturação por 22-24 horas. Após esse período, foram transferidos para gotas de meio de fecundação e fecundados com sêmen sexado de fêmea. Ovócitos e espermatozoides ficaram co-incubando por 15-18 horas. Os possíveis zigotos foram transferidos para o meio de cultivo, avaliados três dias após a fecundação (D3) para observação da taxa de clivagem e sete dias (D7) para taxa de blastocisto. Na sequência, foram transferidos para receptoras previamente sincronizadas. Após 30 dias da transferência, as receptoras foram avaliadas por ultrassonografia para averiguação da taxa de prenhez. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade dos dados e, em seguida, o teste de variância de eleição para todos os parâmetros foi o Mann – Whitney. A porcentagem de ovócitos viáveis (79% controle e 72,2% tratamento) não diferiu entre os grupos, assim como a taxa de prenhez (52,6% X 42,5%, respectivamente). Contudo, a taxa de clivagem e de produção de embriões *in vitro* em D7 teve um melhor resultado ( $P<0,01$ ) no grupo tratado quando comparado ao controle (89,4% X 52,8% e 62,4% X 27,6%, respectivamente). Diante dos resultados obtidos no presente trabalho, a utilização do Catosal B12 pode ser um complemento dentro do protocolo de aspiração folicular, visando uma melhoria nos resultados de produção de embrião para doadoras holandesas.

**Palavras-chave:** Catosal; fecundação *in vitro*; bovino

SBTE 119 OPU-FIV/TE

Número de submissão 1656

**Expressão diferencial de membros do sistema IGF em COCS provenientes de OPU em vacas das raças Gir, Holandesa e meio sangue (½ Holandesa x ½ Gir)**

Asafe Costa Lopes<sup>1</sup>; Tatimara Maria Miyauchi<sup>1</sup>; Miller Pereira Palhão<sup>1</sup>; Rubia Bueno da Silva<sup>2</sup>; Mateus José Sudano<sup>3</sup>; Carlos Antônio de Carvalho Fernandes<sup>1</sup>; Anthony César Souza Castilho<sup>4</sup>; Ester Siqueira Caixeta<sup>5</sup>

1. Departamento de Medicina Veterinária, Laboratório de Reprodução Animal, Unifenas, Alfenas, MG, Brasil; 2. Curso de Medicina Veterinária, Faculdade Sudoeste Paulista, Avaré, SP, Brasil; 3. Unipampa, Uruguai, RS, Brasil; 4. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, SP, Brasil; 5. Departamento de Medicina Veterinária, Laboratório de Reprodução Animal, Unifenas / Unifal, Alfenas, MG, Brasil.

Nos últimos anos observou-se um aumento expressivo do uso da PIVE em raças bovinas leiteiras. Neste contexto, é conhecido que as diferenças na quantidade e no potencial de desenvolvimento oocitário entre fêmeas de raças europeias (*Bos taurus*) e zebuínas (*Bos indicus*) afetam consideravelmente a eficiência e a viabilidade econômica da PIVE. Sabendo-se que o sistema dos fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF) está relacionado à capacidade de desenvolvimento dos oócitos, o objetivo deste estudo foi avaliar a expressão de genes do sistema IGF nos complexos cumulus oócitos (COCs) oriundos de doadoras das raças Gir, Holandesa e mestiças F1 (1/2 Holandesa x 1/2 Gir). Os COCs imaturos foram recuperados por aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU) em fazendas nas cidades de Alfenas e Três Pontas, MG, Brasil. Em seguida, os oócitos e as células do cumulus (CC) provenientes de grupos de 20 COCs ( $n=4$ /raça) foram mecanicamente separados e armazenados em nitrogênio líquido. Foram selecionados para as análises somente COCs com citoplasma homogêneo e circundados por, no mínimo, três camadas de CC. O RNA total foi extraído de pools de 20 oócitos e das CC correspondentes utilizando o kit RNeasy® (Qiagen). A expressão dos genes alvo (*IGF1* e *IGF2*, seus receptores - *IGFR1* e *IGFR2*, proteínas de ligação aos IGFs - *IGFBP2* e *IGFBP4* e proteína de inativação IGFBPase - também conhecida como “pregnancy-associated plasma protein-A”; *PAPP-A*), foi investigada por RT-PCR em tempo real utilizando o sistema Power Sybr® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e normalizada pela Ciclofilina-A (*CYC-A*). A quantificação relativa do RNAm foi determinada pelo método de  $\Delta\Delta C_t$ . Os efeitos das diferentes raças sobre a expressão dos genes alvo nos oócitos e CC foram testados por ANOVA e os grupos foram comparados pelo teste de Tukey-Kramer HSD. O nível de significância foi considerado  $P<0,05$ . A abundância relativa de RNAm do *IGF2*, *IGFR2* e *IGFBP4* foi maior nas CC de vacas Holandesas quando comparado às vacas Gir e 1/2 Holandesa x 1/2 Gir. Nos oócitos houve uma maior expressão do RNAm codificante para *IGFR1* em doadoras Gir em relação às 1/2 Holandesa x 1/2 Gir e Holandesas. A expressão do RNAm da enzima *PAPP-A* foi maior nas CC e nos oócitos das doadoras Gir e 1/2 Holandesa x 1/2 Gir em comparação com as Holandesas. Não houve alteração na expressão dos genes *IGF1*, *IGFR1* e *IGFBP2* nas CC, assim como dos genes *IGF1*, *IGF2*, *IGFR2*, *IGFBP2* e *IGFBP4* nos oócitos entre diferentes raças. Em conclusão, a maior expressão de *PAPP-A* nos oócitos e CC de COCs provenientes de doadoras das raças Gir e 1/2 Holandês x 1/2 Gir associada à baixa expressão de *IGFBP4* nas CC destas raças, sugere uma degradação mais eficiente das IGFBPs, resultando em maior biodisponibilidade dos IGFs em COCs imaturos das raças Gir e meio sangue (1/2 Holandesa x 1/2 Gir) quando comparado com COCs da raça Holandesa. Agradecimentos: Fapemig, Fazenda Rancho Grande, Biotran.

**Palavras-chave:** Gado de leite; qualidade oocitária; expressão gênica

SBTE 120 OPU-FIV/TE

Número de submissão 1657

**Tratamento cirúrgico de prolapso parcial da mucosa vaginal em vacas Nelore submetidas à aspiração folicular guiada por ultrassom – relato técnico**

Gabriel Artur Marciano do Nascimento; Ingo Aron Sousa Mello; Rafael Rodrigues Corrêa  
*Ouro Fino Saúde Animal, Cravinhos, SP, Brasil.*

O prolapso parcial da mucosa vaginal é uma afecção do aparelho reprodutivo comumente relatada em vacas com idade superior aos 24 meses, gestantes ou não, manejadas em sistema intensivo, superalimentadas e submetidas à aspiração folicular. O objetivo do trabalho foi relatar os casos de prolapso parcial da mucosa vaginal e o respectivo tratamento em seis vacas nelore adultas manejadas em uma mesma propriedade, situada no estado de São Paulo. O prolapso parcial da mucosa vaginal impossibilitava muitas vezes a aspiração folicular desses animais e consequentemente comprometia a atividade reprodutiva desses dentro do rebanho. Para o tratamento dos animais optou-se pela técnica de vaginectomia parcial da mucosa prolapsada. Para o procedimento cirúrgico, foi utilizada anestesia epidural baixa e bloqueio anestésico da região prolapsada. Foi realizada a higienização do períneo e da vulva e em seguida a porção prolapsada foi tracionada manualmente com a utilização de gaze estéril e pinças obstétricas. Foi inserida uma sonda na uretra dos animais e posteriormente o ânus foi suturado provisoriamente utilizando o padrão bolsa de fumo, tudo isso para evitar a contaminação do campo operatório. Para o procedimento foram utilizadas pinças de inox produzidas para tal finalidade, sendo essas responsáveis pela tração, fixação, estabilidade e delimitação da porção a ser seccionada. Na porção anterior à fixada com pinça, realizou-se a sutura com pontos simples separados utilizando fio absorvível, e para maior segurança um novo plano de sutura paralelo ao primeiro foi feito. Após a sutura realizou-se a amputação da porção prolapsada. Imediatamente após o procedimento cirúrgico os animais foram tratados com antibióticos e antiinflamatórios, ambos em dose única pela via intramuscular, sendo que 3 animais receberam a associação Penicilina G Benzatina 5.000.000 UI + Penicilina G Procaína 5.000.000 UI + Dihidroestreptomicina 10 g (Penfort® PPU, Ourofino Saúde Animal, Cravinhos, Brasil) e 20 mg de Dexametasona (Cortiflan, Ourofino Saúde Animal, Cravinhos, Brasil) e os outros 3 animais receberam a associação entre Oxitetraciclina 10 g e Diclofenaco sódico 0,5 g (Ourotetra Plus LA, Ourofino Saúde Animal, Cravinhos, Brasil). Após o procedimento cirúrgico um animal apresentou hemorragia, contudo, a mesma foi controlada e o animal não apresentou complicações. Outro animal apresentou novo prolapso, porém, de menor intensidade, 15 dias após o procedimento inicial devido a ressecção primária insuficiente, e uma nova interferência cirúrgica foi realizada 55 dias após a primeira. Todos os animais se recuperaram plenamente e não apresentaram novos prolapsos da mucosa vaginal e seguiram em atividade reprodutiva regular, demonstrando a eficácia do procedimento cirúrgico realizado.

**Palavras-chave:** Prolapso da mucosa vaginal; vaginectomia parcial; aspiração folicular guiada por ultrassom

SBTE 121 OPU-FIV/TE

Número de submissão 1668

**Habilidade do corpo lúteo ovino formado após aspiração folicular no estabelecimento e manutenção de gestação obtida a partir da transferência intrafalopiana de oócito**

Renan Denadai; Luiz Fernando Salgado Scagion; Tatícia Lieh Ikeda; Fernanda Cruz Landim; Eunice Oba; Sony Dimas Bicudo

*FMVZ-Unesp-Botucatu, Botucatu, SP, Brasil.*

Visando-se avaliar a capacidade de ovelhas desenvolverem gestação após transferência intrafalopiana de oócitos (OIFT) e com corpo lúteo (CL) gestacional formado após aspiração do folículo pré-ovulatório, utilizou-se cinco ovelhas adultas, sem raça definida, com ciclicidade ovariana confirmada por ultrassonografia. As fêmeas foram submetidas a tratamento de sincronização do estro, pela inserção de dispositivo intravaginal de liberação lenta de progesterona natural (EZI-BREED CIDR OVINOS E CAPRINOS®, InterAg, Nova Zelândia), no quinto dia após inserção do implante foi administrado 5mg de dinoprost (Lutalyse®, Laboratório Pfizer Ltda., Brasil) por via intramuscular. No décimo quarto dia foi removido o dispositivo vaginal e administrado 500 UI de eCG (Novormon®, Syntex Industrias Bioquímica e Farmacêutica S.A., Argentina). Decorridas 48 horas do uso da gonadotrofina realizou-se ultrassonografia dos ovários, visando constatar a presença de pelo menos um folículo com diâmetro, igual ou superior a 5mm, indicando ser um folículo pré-ovulatório, na sequência foi realizada aspiração de todos os folículos visíveis guiada por laparoscopia. O material aspirado dos folículos foi avaliado em estereomicroscópio, para identificação dos complexos cumulus oophorus (COCs) e classificação, quanto às características do ooplasma e das células do cumulus. Durante procedimento laparoscópico foi realizada inseminação artificial com sêmen fresco diluído, depositando-se  $100 \times 10^6$  espermatozoides em cada corno uterino e em 3 ovelhas realizou-se ipsilateral ao ovário do maior folículo pré-ovulatório a OIFT, de apenas um COCs autólogo, que apresentavam citoplasma homogêneo e cúmulos expandidos. Este procedimento não foi realizado em duas ovelhas por não apresentarem COCs adequados aos critérios estabelecidos. Nas três receptoras o número de COCs recuperados foi idêntico ao número de folículos aspirados, demonstrando-se a impossibilidade da ocorrência de ovulações espontâneas ou presença de oócitos residuais após a LOPU. O monitoramento ultrassonográfico dos ovários foi realizado para a constatação dos CLs, onde o número de estruturas luteínicas formadas correspondeu ao de folículos pré-ovulatórios aspirados em cada ovelha. Decorridos 35 dias da OIFT foi realizado diagnóstico ultrassonográfico de gestação e duas das três receptoras foram diagnosticadas gestantes, apresentando o conceito e os envoltórios fetais com características compatíveis com a idade gestacional, em relação a data da OIFT. Os partos ocorreram transcorridos 151 dias pós-transferência em uma das fêmeas e 153 dias na outra, com nascimento de um cordeiro de cada receptora, e sem alterações clínicas no pós-parto imediato. Com isso, demonstrou-se ser possível o estabelecimento e desenvolvimento gestacional normal após OIFT em



receptoras com CL formados após aspiração de folículos guiada por laparoscopia. Novos estudos se fazem necessários para melhor conhecer as potencialidades desses procedimentos biotecnológicos.

**Palavras-chave:** Ovelha; corpo lúteo; aspiração folicular

SBTE 122 OPU-FIV/TE

Número de submissão 1679

#### **Efeito da sincronização do crescimento da onda folicular na produção de oócitos de bubalinos**

Eunice Oba<sup>1</sup>; Barbara Virgínia Rodrigues Rizoto de Mattos<sup>2</sup>; Alan Maia Borges<sup>3</sup>; Marc Roger Jean Marie Henry<sup>3</sup>; Ana Carolina Leite<sup>3</sup>; Virgílio Barbosa Andrade<sup>3</sup>; Marcus Vinicius Prado Silva<sup>3</sup>; João Gabriel Viana de Grázia<sup>3</sup>; Emílio César Martins Pereira<sup>2</sup>

1.Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil; 2.Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil; 3.Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

Objetivou-se averiguar o efeito de diferentes protocolos de sincronização da onda folicular de doadoras de oócitos bubalinas sobre o número de folículos, a taxa de recuperação, o número e a qualidade dos oócitos produzidos. Foram utilizadas 12 búfalas adultas submetidas a diferentes protocolos que resultavam na aspiração dos folículos guiada por ultrassom (OPU) 1,21 ha 4 dias após a emergência da onda folicular. Cada animal foi submetido, pelo menos três vezes, a cada tratamento. Os tratamentos foram: Tratamento 1 (T1): animais não protocolados com OPU realizada em dia aleatório do ciclo estral; Tratamento 2 (T2): onda de crescimento folicular reiniciada com aspiração prévia de todos folículos ovarianos, realizando-se a OPU 3-4 dias depois; Tratamento 3 (T3): colocação de dispositivo intravaginal de progesterona por 6 dias, associado a 2mg de benzoato de estradiol, 50mg de progesterona e 150µg de prostaglandina, sendo a OPU feita na retirada do implante; Tratamento 4 (T4): similar ao T3, no entanto, no T4 foi aplicado, 100mg de FSH, 36-48 horas antes da OPU. No momento da OPU, os animais foram avaliados quanto ao número e tamanhos dos folículos, classificando-os em pequenos (2-5mm), médios (6-9mm) e grandes ( $\geq 9$ mm). Após a coleta, os oócitos foram processados e classificados de acordo com as características morfológicas em: Grau A, Grau B, Grau C, Grau D, expandidos ou desnudos. Para análise estatística foi realizado o teste ANOVA/Teste Duncan ou Teste Kruskal-Wallis e o nível de significância considerado foi  $p < 0,05$ . O número de folículos observados, por animal, no T2 ( $7,50 \pm 0,63a$ ) não diferiu do número do T1 ( $9,39 \pm 0,66ab$  -  $p > 0,05$ ); porém foi inferior aos valores dos T3 ( $10,44 \pm 0,92b$ ) e T4 ( $11,39 \pm 0,67b$  -  $p < 0,05$ ). Em relação à qualidade, o número de oócitos grau A no T3 foi superior aos outros tratamentos (T1=  $0,78 \pm 0,22$ ; T2=  $0,36 \pm 0,20$ ; T3=  $2,00 \pm 0,50$ ; T4=  $0,82 \pm 0,32$ ). A taxa de recuperação, o número de oócitos recuperados e o número de oócitos grau B, C, D, desnudos e expandidos não alterou ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos. Os tratamentos de sincronização utilizando hormônios (T3, T4) ou não (T2), não alteraram o número médio de folículos, já que não diferiram do T1 ( $p > 0,05$ ). Não houve diferença também entre o número total de folículos observados no momento da OPU entre os diferentes tratamentos ( $p > 0,05$ ). Entretanto, comparando o número de folículos entre o mesmo tratamento observou-se maior número de folículos pequenos em relação aos folículos médios e grandes ( $p < 0,05$ ). Conclui-se que os protocolos propostos não foram eficientes para melhorar o número e a qualidade de estruturas recuperadas na OPU.

**Palavras-chave:** Búfalos; protocolo; ovário

SBTE 123 OPU-FIV/TE

Número de submissão 1683

#### **Influência do sistema ILPF sobre a produção de embriões bovinos**

Fabiana de Andrade Melo Sterza<sup>1</sup>; Wilian Aparecido Leite da Silva<sup>1</sup>; Mariane Gabriela Cesar Ribeiro Ferreira<sup>1</sup>; Henrique Kischel<sup>1</sup>; Giovanna de Lima Ortiz<sup>1</sup>; Mirela Brochado Souza<sup>1</sup>; Ana Caroline Bini de Lima<sup>1</sup>; Elielton Dias da Silva Arruda<sup>1</sup>; Ruan Francisco da Silva<sup>1</sup>; Ralf Poehland<sup>2</sup>

1.Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, Aquidauana, MS, Brasil; 2.Leibniz Institute For Farm Animal Biology, Dummerstorf, Alemanha.

A influência negativa do estresse térmico sobre a embriogênese é conhecida. O manejo do ambiente, por meio de sombreamento natural ou artificial, pode atenuar o estresse térmico e pode favorecer o controle homeotérmico animal e, consequentemente, melhorar o seu desempenho reprodutivo. O Índice de Temperatura e Umidade (ITU) é usado para avaliar o conforto térmico dos animais. Quando o ITU ultrapassa o valor de 72, considera-se que o bovino se encontra em estresse pelo calor e a partir de 83 considera-se estresse severo, podendo comprometer importantes funções orgânicas. Neste sentido, o objetivo do estudo foi avaliar a produção de embriões bovinos *in vitro* a partir de 16 doadoras manejadas em sistema integração lavoura-pecuária-floresta (ILPF) ou não. Para este experimento foram utilizados animais da raça nelore, peso médio de 350 kg, idade de 2 anos, divididos em duas áreas experimentais: o grupo da sombra, com oferta de sombreamento adequado em sistema de ILPF (n=8), e o grupo ILP (integração-lavoura-pecuária), com pouco ou nenhum sombreamento natural (n=8). Foram instaladas mini-estações meteorológicas nos dois campos experimentais para a mensuração e controle dos dados ambientais, para cálculo de ITU. Os animais foram submetidos a 3 sessões de OPU no período entre dezembro e março de 2016. Os CCO's viáveis (Graus 1 e 2) foram maturados *in vitro* (MIV) por 24 horas em TCM 199. Foi utilizado sêmen da raça Nelore de fertilidade comprovada na fecundação *in vitro* (FIV), o qual foi

preparado em gradiente Percoll®. A dose inseminante foi de 10<sup>6</sup> espermatozoides vivos/mL. A FIV foi realizada em meio Talp por 18-22 horas. Logo após foi realizado o cultivo *in vitro* (CIV) em meio SOF, onde os prováveis zigotos foram mantidos por 8 dias (D8). Todas as etapas da PIVE foram realizadas em incubadora a 38,5 °C, 5% de CO<sub>2</sub> e máxima umidade. O ITU demonstrou que os dois grupos estavam em condição de estresse térmico, no entanto o grupo ILP em situação próxima do estresse severo, (ITU ILPF = 77,70 e sol 82,21; p<0,05), demonstrando que o sistema de ILPF é capaz de minimizar o estresse térmico. As taxas de viabilidade de CCOs e clivagem não diferiram entre os grupos (Tx. Viab. 55,8 e 53,65; Tx. Cliv. 49,60% e 29,40% para ILPF e ILP respectivamente). Entretanto, a taxa de blastocistos foi significativamente superior no grupo ILPF (31,7% x 16,1%). Os resultados desse estudo demonstram que o sistema ILPF é capaz de minimizar o estresse térmico com consequências diretas sobre a produção de embriões bovinos.

Agradecimento : CAPES, FUNDECT.

**Palavras-chave:** Estresse térmico; reprodução; Nelore

SBTE 124 OPU-FIV/TE

Número de submissão 1707

**Diminuição de espécies reativas de oxigênio em ovócitos suínos pelo uso da proteína recombinante específica do oviduto de porcas no meio de maturação *in vitro***

Taynan Stonoga Kawamoto<sup>1</sup>; Lincoln Silva Amorim<sup>2</sup>; Leandro Licursi de Oliveira<sup>3</sup>; Paulo Sávio Lopes<sup>4</sup>; Simone Elisa Facione Guimarães<sup>4</sup>; José Domingos Guimaraes<sup>5</sup>

1.Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil; 2.Biotran Ltda, Alfenas, MG, Brasil; 3.Departamento de Biologia UFV, Viçosa, MG, Brasil; 4.Departamento de Zootecnia da UFV, Viçosa, MG, Brasil; 5.Departamento de Veterinária UFV, Viçosa, MG, Brasil.

A produção *in vitro* de embriões em suínos destaca-se pela possibilidade das técnicas de cultivo auxiliarem nas biotecnologias de clonagem e transgenia que cada vez mais ganham importância no campo biomédico. Porém, a produção *in vitro* de embriões suínos apresentam entraves relacionados as elevadas taxas de polispermia e devido aos prejuízos que as espécies reativas de oxigênio (ROS) causam em ovócitos e embriões. Assim, o presente estudo teve como objetivo a produção de proteína recombinante específica do oviduto de porcas (pOSP) para uso em meios de maturação *in vitro* (MIV) de ovócitos de porcas. Avaliou-se o efeito da pOSP (10 µg/mL) nas últimas quatro horas de maturação sobre a concentração de ROS em ovócitos suínos maturados *in vitro*. Para isso, foram aspirados ovários de abatedouro para obtenção de ovócitos grau I e II. Posteriormente, esses ovócitos foram colocados para maturar em meio North Carolina State University 23 (NCSU 23) suplementado com 10 % de fluido folicular suíno (v:v), 10 mg/mL de EGF (sigma), 10 UI/mL de hCG (Vetecor®, Hertape Calier, Brasil), 10 UI/mL de eCG (Folligon®, MSD Saúde Animal, Brasil) e 0,1 mg/mL de cisteína (sigma), nas primeiras 22 horas. Nas 22 horas seguintes os ovócitos foram colocados em meio NCSU 23 sem suplementação hormonal. Foram realizadas 4 repetições, sendo observados aproximadamente 80 ovócitos, distribuídos nos dois grupos experimentais. Para a produção da proteína específica do oviduto foi adquirido um plasmídeo, da empresa Gen Script®. Este plasmídeo foi inserido em células E. coli competentes para, então, se obter a proteína específica do oviduto, fazendo-se uso, assim, de técnicas de transgenia, indução da expressão, purificação e dosagem da proteína. A avaliação de ROS foi feita através da coloração com diacetato de diclorofluoresceína (DCFDA) e em seguida, os dados foram analisados por ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Duncan com significância de 5 %. Para avaliar a produção de pOSP, realizou-se a eletroforese em gel de poliacrilamida e a dosagem foi obtida pelo método de Bradford. Em relação a dosagem de ROS houve diferença (p<0,05) entre o controle e o tratamento com a pOSP (26,4±10,9 x 16,6±10,5%), mostrando que a pOSP foi eficiente em diminuir as espécies reativas de oxigênio em ovócitos suínos. Assim, conclui-se que a técnica para a produção de pOSP foi satisfatória e esta foi eficiente em diminuir a quantidade de ROS, podendo a pOSP ser considerada um antioxidante proteico.

**Palavras-chave:** Maturação *in vitro*; proteína recombinante; espécies reativas de oxigênio

SBTE 125 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Número de submissão 1451

**miRNAs diferencialmente expressos em células e vesículas secretadas por células no ambiente folicular em bovinos**

Gabriella Mamede Andrade; Juliano Coelho Da Silveira; Flavio Vieira Meirelles; Felipe Perecin

FZEA-USP, PIRASSUNUNGA, SP, BRASIL.

Durante a foliculogênese a interação entre oócitos e células foliculares é essencial para induzir a proliferação e diferenciação celular, para o desenvolvimento dos oócitos e adequada aquisição de competência. Vesículas extracelulares (VEs) tais como microvesículas e exossomos foram identificadas no fluido folicular e são sugeridas como importantes mediadores de comunicação celular, que transferem moléculas bioativas, tais como lípidos, proteínas, mRNA e miRNAs entre células. O objetivo deste estudo foi analisar as diferenças entre o conteúdo de miRNAs das células da granulosa (CGs) e do complexo-cumulus-oócito (COCs) e de suas respectivas VEs. As CGs e os COCs foram coletadas a partir de folículos de 3-6mm e cultivados com meio DMEM suplementado com albumina sérica bovina, ITS liquid media supplement (100x), fungizona, penicilina, MEM non-essential amino acids solution (100x), androstenediona. Após 48h o meio de cultivo foi

suplementado com FSH (1ng/mL) para que estas células se tornem mais semelhantes às células de folículos em crescimento. As células e o meio de cultivo foram recolhidos 48 horas após o tratamento e ambos armazenados a -80°C. As VEs do meio de cultivo foram isoladas por ultracentrifugação e as extrações do RNA total foram feitas utilizando reagente TRIzol® (Invitrogen). A transcrição reversa foi feita com kit miScript PCR System (Qiagen). Foram feitas análises por RT-PCR de 351 miRNAs bovinos, em triplicata, nas células foliculares (CGs e COCs) e suas respectivas VEs (CG-VEs e COC-VEs). A expressão foi calculada pelo método  $2^{-\Delta Ct}$ , e os dados submetidos a ANOVA e teste Tukey, com nível de significância de 5%. Análises de bioinformática dos miRNAs presentes nas células e respectivas VEs identificaram vias reguladas por miRNAs em ambos tipos celulares. Inicialmente, foram identificados dezesseis miRNAs presentes apenas em COCs e oito apenas em células da granulosa. As CGs e COCs tiveram em comum 302 miRNAs dos quais dez foram superiores ( $p < 0,05$ ) nos COCs: let7a-3p, miR-128, miR-15b, miR-196b, miR-342, miR-411a, miR-497, miR-502b, miR-542-5p, o miR-592; e um superior ( $p < 0,05$ ) nas CGs: miR-454. O enriquecimento funcional indicou regulação de vias de meiose oocitária pelos miRNA aumentados nas COCs, e de vias de sinalização como mTOR, ErbB, TGF-beta, pelo miRNA com maior nível nas CGs. Foram identificados treze miRNAs presentes apenas em CG-VEs e 30 em COC-VEs. Vinte e quatro miRNAs foram comuns entre CG-VEs e COC-VEs, dos quais dois (miR-127 e miR-433) foram superiores ( $p < 0,05$ ) em CG-VEs, regulando a maturação oocitária mediada pela progesterona, junções aderentes e ciclo celular; e outros dois (miR-323 e miR-631) superiores ( $p < 0,05$ ) em COC-VEs, e regulando vias como junções comunicantes e de sinalização ErbB. Os resultados sugerem que os miRNAs presentes no ambiente folicular são parte da complexa rede de comunicação e interação celular que regulam e modulam as vias celulares associadas ao desenvolvimento folicular e oocitário.

**Palavras-chave:** Células foliculares; microRNAs; vesículas extracelulares

SBTE 126 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Número de submissão 1454

**Efeito da ingestão do chá branco (*Camellia sinensis* (L.) kuntze) sobre a expressão gênica do VEGF no corpo lúteo de ratas superovuladas**

Francislaine Anelize Garcia Santos<sup>1</sup>; Deyvid Pereira Vieira<sup>1</sup>; Samuel Aparecido Freire<sup>1</sup>; Paula De Carvalho Papa<sup>2</sup>; Caliê Castilho<sup>1</sup>; Lilian Francisco Arantes De Souza<sup>1</sup>; Luciana Machado Guaberto<sup>1</sup>; Inês Cristina Giometti<sup>1</sup>

1.Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, SP, Brasil; 2.Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

O chá é uma das bebidas mais populares e a segunda mais consumida no mundo. A população ingere chás em média, de duas a três vezes ao dia, sendo em sua maioria oriundos da planta *Camellia sinensis*. São bem conhecidos os efeitos benéficos para a saúde do consumo dos chás provenientes dessa planta, como a prevenção de câncer, de doença cardiovascular e da osteoporose. Apesar disso, pouco se sabe sobre a ação do chá branco na reprodução, sendo importante avaliar as possíveis consequências do seu consumo no desenvolvimento luteal. Visto que a principal catequina, a epigallocatequina galato (EGCG) presente neste chá influencia a expressão gênica do Vegf em tumores e é um importante fator angiogênico dos órgãos reprodutivos, este estudo teve como objetivo verificar o efeito da ingestão do chá branco sobre a abundância relativa do mRNA do Vegf em ratas superovuladas. Para tanto, as ratas foram distribuídas em dois grupos, grupo controle (n=30) que recebeu água e grupo com ingestão de chá branco (n=30). Os ovários de 10 animais de cada grupo ao final de cada mês (três meses) foram dissecados e os corpos lúteos (CLs) armazenados em Trizol à -80°C. Os CLs foram submetidos à extração de RNA pelo protocolo Trizol® (Invitrogen) e a abundância relativa de mRNA do Vegf foi avaliada por PCR em Tempo-Real, assim como os controles endógenos: Beta-actina, Gapdh, Hprt-1 e Rps-18. Os dados foram avaliados quanto ao pressuposto de normalidade (Shapiro-Wilk) e as comparações estatísticas foram realizadas por meio dos testes t não pareado entre os grupos e nos diferentes momentos de coletas ( $p < 0,05$ ). A abundância relativa de mRNA do Vegf foi alterada pelo consumo de chá branco em todos os momentos analisados: 30 dias (CT= 0,99±0,31, CB= 2,29±0,35); 60 dias (CT= 0,83±0,32, CB = 1,74±0,73); 90 dias (CT= 1,02±0,26, CB= 2,24±0,91), como no período total de 3 meses: CT= 0,95±0,30 e CB= 2,13±0,75. Conclui-se que a ingestão prolongada de chá branco altera a expressão do Vegf no corpo lúteo de ratas Wistar.

**Palavras-chave:** Fator de crescimento endotélio-vascular; corpo lúteo; RT-PCR

SBTE 127 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Número de submissão 1455

**Perfil de miRNAs de exossomos isolados de folículos ovarianos bovinos: associação com a competência oocitária**

Juliano Coelho Da Silveira<sup>1</sup>; Gabriella Mamede Andrade<sup>1</sup>; Rosane Mazzarella<sup>1</sup>; Marcelo César<sup>1</sup>; Marcelo Fabio Gouveia Nogueira<sup>2</sup>; Cláudia Perrini<sup>3</sup>; Felipe Perecin<sup>1</sup>; Flavio Vieira Meirelles<sup>1</sup>

1.Universidade De São Paulo, Pirassununga, SP, Brasil; 2.Universidade Estadual Paulista, Assis, SP, Brasil; 3.Università Degli Studi Di Milano, Lodi, Itália.

A foliculogênese resulta da proliferação e diferenciação das células foliculares (granulosa e cumulus). Por outro lado a maturação oocitária é dependente do acúmulo de moléculas de RNA e do remodelamento epigenético do núcleo gamético. A comunicação intercelular está envolvida em ambos processos. Parte da comunicação celular que ocorre no fluido

folicular (FF) é mediada por vesículas extracelulares conhecidas como exossomos. Exossomos possuem entre 30-150nm e contém proteínas, mRNAs e miRNAs. MiRNAs são moléculas de RNA não-codificante entre 18-26 nucleotídeos e atuam bloqueando a tradução de moléculas de mRNA alvo. Nossa hipótese é que exossomos contidos no fluido folicular apresentam diferentes conteúdos de miRNAs de acordo com a competência oocitária. A fim de testar esta hipótese folículos de ovários bovinos, entre 3-6 mm de diâmetro foram isolados individualmente. Os conteúdos dos folículos foram separados sob o estereoscópio para permitir a coleta de fluido folicular (FF) e do complexo cumulus-oócito (CCO), os quais foram cultivados individualmente. O FF foi submetido à centrifugação diferencial para a remoção de componentes celulares e debris antes do congelamento em -80°C. CCOs foram maturados *in vitro* por 18h, em seguida avaliados quanto à presença do 1º corpúsculo polar (1oCP). Oócitos desnudados foram ativados 26 horas após o início da MIV para gerar embriões partenogênicos. Os FFs foram agrupados de acordo com a competência oocitária, sendo os menos competentes aqueles que não maturaram (Nmat) pela ausência do 1oCP e os mais competentes aqueles que atingiram a fase de blastocisto (Blast). Com base nos grupos de competência, exossomos foram isolados utilizando grupos de 10 FFs (Exo-Blast e Exo-Nmat) por meio de ultracentrifugação à 100.000 xg. As amostras foram processadas para a extração de miRNAs e analisadas por PCR em tempo real com plasmídeos de miRNAs customizados para bovinos. A análise do perfil de miRNAs de exossomos de acordo com a qualidade oocitária revelou 185 miRNAs exclusivos de FF de folículos que geram blastocistos. Enquanto que 107 miRNAs foram identificados em exossomos originados de FF de folículos dos quais os oócitos não possuem a capacidade de maturar. Análise de bioinformática revelou que os 13 miRNAs que apresentaram altos níveis em exossomos do FF estão envolvidos na regulação de vias como a interação com matriz extra-celular, via de sinalização PI3K-AKT e Focal Adhesion. A análise de bioinformática dos miRNAs de Exo-Blast sugeriu o envolvimento na regulação de vias como a de Transporte de RNA, Ciclo Celular e Maturação Oocitária Mediada pela Progesterona. A análise de bioinformática de miRNAs do Exo-Nmat revelou o envolvimento na regulação de vias como a Transporte de RNA, Câncer de Endométrio e mTOR signaling pathway. Assim, nossos resultados demonstraram que exossomos transportam moléculas de miRNA envolvidas na regulação de diferentes vias celulares. Além disso, os conteúdos de miRNAs exclusivos estão envolvidos na regulação de vias distintas sugerindo que estas vesículas estão envolvidas na foliculogênese e maturação oocitária. Outros experimentos são necessários para explorar os diferentes mecanismos de ação dos conteúdos de exossomos encontrados nos folículos ovarianos de mamíferos 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 e JP-2014/22887-0.

**Palavras-chave:** miRNA; exossomos; bovinos

SBTE 128 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Número de submissão 1462

### **Efeito da alta e baixa contagem de folículos antrais sobre a taxa de crescimento e o diâmetro folicular em vacas Nelore (*Bos indicus*) submetidas à sincronização da ovulação**

Fabio Morotti<sup>1</sup>; Gustavo Martins Gomes Santos<sup>1</sup>; Katia Cristina Silva-Santos<sup>1</sup>; Fábio Ferri<sup>2</sup>; Marcelo Marcondes Seneda<sup>1</sup>  
1.UEL, Londrina, PR, Brasil; 2.MSD Saúde Animal, Londrina, PR, Brasil.

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da alta vs. baixa contagem de folículos antrais (CFA) sobre a taxa de crescimento e o diâmetro folicular de vacas Nelore submetidas à inseminação artificial em tempo-fixado (IATF). Vacas multíparas (n = 250, 40 a 60 dias pós-parto) foram avaliadas por ultrassom transvaginal (Aquila PRO, Pie Medical, Maastricht, Holanda) para determinar a CFA (folículos  $\geq 3$  mm) sete dias antes do início do estudo (D-7). Após determinação da CFA, 43 vacas de alta contagem (G-alta;  $\geq 40$  folículos) e 32 de baixa (G-baixa;  $\leq 15$  folículos), com ECC  $2,8 \pm 0,2$  (escala 1 a 5) foram selecionadas para acompanhamento da dinâmica folicular ovariana. A sincronização da ovulação consistiu no uso de um implante auricular de norgestomet (3 mg, Crestar®, MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil) e uma aplicação intramuscular (IM) de benzoato de estradiol (2 mg, Gonadiol®, MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil) em um dia aleatório do ciclo estral (D0). No momento da remoção do implante (D8), os animais receberam D-cloprostenol (0,150 mg, Prolise®, Tecnopec, São Paulo, Brasil), gonadotrofina coriônica equina (300 UI, Novormon®, Syntex SA, Buenos Aires, Argentina) e cipionato de estradiol (1 mg, ECP®, Zoetis, São Paulo, Brasil) por via IM. A IATF foi realizada 48 h após a retirada do implante. Exames ultrassonográficos foram realizados no D-7, D4 e D18 para determinação da CFA, no D0 e diariamente (D4 ao D10) para controle dos diâmetros foliculares, e a cada 12 h (D10 ao D12) para detecção da ovulação. Em cada exame os folículos  $\geq 3$  mm foram identificados, mensurados e registrados em fichas individualizadas para posterior avaliação e cálculos da taxa de crescimento folicular. Os dados foram analisados por ANOVA seguido do Teste de Tukey ( $p < 0,10$ ) e estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. A média de CFA observada em D-7, D4 e D18 foram respectivamente  $48,9 \pm 5,7$ ;  $49,5 \pm 5,7$  e  $49,6 \pm 6,8$  folículos para G-alta e  $12,5 \pm 4,1$ ;  $12,4 \pm 4,3$  e  $12,9 \pm 3,8$  folículos para G-baixa ( $p = 0,01$ ). As taxas de crescimento folicular se mantiveram similar entre os G-baixa e G-alta do D4 ao D8 ( $0,40 \pm 0,22$  vs.  $0,32 \pm 0,21$  cm/dia;  $p = 0,30$ ), do D8 ao D9 ( $0,11 \pm 0,08$  vs.  $0,12 \pm 0,08$  cm/dia;  $p = 0,73$ ) e do D8 ao D10 ( $0,11 \pm 0,06$  vs.  $0,14 \pm 0,06$  cm/dia;  $p = 0,16$ ), bem como não houve diferença no tempo de ovulação ( $70,2 \pm 6$  vs.  $69,8 \pm 7$  h;  $p = 0,85$ ). No entanto, o G-baixa apresentou maior diâmetro folicular que G-alta no D4 ( $0,73 \pm 0,22$  vs.  $0,62 \pm 0,14$  cm;  $p = 0,06$ ), no D8 ( $1,12 \pm 0,18$  vs.  $0,94 \pm 0,18$  cm;  $p = 0,01$ ), no D9 ( $1,23 \pm 0,17$  vs.  $1,06 \pm 0,16$  cm;  $p = 0,01$ ), e no D10 ( $1,34 \pm 0,13$  vs.  $1,22 \pm 0,18$  cm;  $p = 0,01$ ), sendo que o diâmetro estimado do folículo

ovulatório também foi maior no G-baixa ( $1,44 \pm 0,15$  cm) do que no G-alta ( $1,34 \pm 0,2$  cm;  $p = 0,08$ ). Neste estudo a CFA não exerceu efeito sobre a taxa de crescimento folicular. No entanto, vacas de baixa CFA apresentaram maiores folículos dominantes e maior diâmetro do folículo ovulatório, sugerindo que a CFA pode apresentar algum efeito na taxa de concepção de vacas Nelore submetidas à IATF.

**Palavras-chave:** Folículo antral; diâmetro folicular; *Bos indicus*

SBTE 129 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Número de submissão 1472

**Efeito do IGF-I na maturação *in vitro* de oócitos bovinos submetidos ao choque térmico**

Ivan Júnior Ascari<sup>1</sup>; Nadja Gomes Alves<sup>1</sup>; Jasmin Jasmin<sup>2</sup>; Carolina Capobianco Romano Quintão<sup>3</sup>; Eliza Diniz De Souza<sup>4</sup>; Jessica Fernanda Souza<sup>3</sup>; Ribrio Ivan Tavares Pereira Batista<sup>2</sup>; Vivian Rachel Araújo Mendes<sup>5</sup>; Felipe Barbosa Junqueira<sup>1</sup>; Luiz Sérgio de Almeida Camargo<sup>3</sup>

1.Universidade Federal de Lavras, Juiz De Fora, MG, Brasil; 2.Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; 3.EMBRAPA - Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brasil; 4.Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, Brasil; 5.Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

O estresse térmico ocasiona o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) celular. O IGF-I demonstrou atividade antioxidante, reduzindo o efeito prejudicial do peróxido de hidrogênio, no desenvolvimento de embriões de camundongos (Kurzawa et al., Zygote, 2004; 12:231-240). Então, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de IGF-I adicionado ao meio de maturação *in vitro* (MIV) sobre a atividade mitocondrial e EROS em oócitos bovinos submetidos ao choque térmico. Oócitos imaturos foram aspirados de ovários obtidos de matadouro, foram selecionados e distribuídos aleatoriamente em um fatorial 3 x 2. Foram testadas três concentrações de IGF-I (0, 25 e 100 ng/mL - Sigma-Aldrich, São Paulo, BR) adicionadas ao meio MIV e duas condições de incubação (convencional: 24 horas a 38,5°C e 5% CO<sub>2</sub>; ou choque térmico: 12 horas a 41°C seguido por 12 horas a 38,5°C e 5% CO<sub>2</sub>). A MIV foi realizada em placa Nunc contendo 400 µL de TCM-199 (Invitrogen, São Paulo, BR) suplementado com 20 µg/mL de FSH (Pluset<sup>®</sup>, Hertape Calier, Juatuba, BR) e 10% de soro de vaca em estro. Após o período de MIV, os oócitos foram desnudados em solução de PBS acrescida de hialuronidase (0,1%) (Sigma-Aldrich, São Paulo, BR) em vórtex por cinco minutos e lavados duas vezes em PBS contendo PVP (0,1%). Para a análise de atividade mitocondrial os oócitos foram incubados em PBS suplementado com PVA (0,1%) e MitoTracker Red CMX-Ros (50 nM) (Invitrogen, São Paulo, BR) durante 30 minutos a 38,5°C. Em seguida, os oócitos foram lavados em PBS-PVA e incubados em gotas de PBS, contendo 10 µM de diacetato 2',7'-diclorofluoresceína (Sigma-Aldrich, São Paulo, BR) durante 15 minutos a 38,5°C. Em seguida, os oócitos foram lavados três vezes em gotas de PBS-PVA e montados em lâminas para mensurar a emissão de fluorescência da atividade mitocondrial ( $n = 351$ ) e EROS ( $n = 331$ ). A intensidade emitida foi quantificada por meio do software ImageJ. Foram realizadas três repetições. Os dados foram analisados pelo Proc Mixed do SAS (versão 9.3, SAS Inst., Inc., USA), utilizando o oócito como efeito aleatório. Foram considerados os efeitos da concentração de IGF-I, condição de incubação, repetição e interação entre a concentração de IGF-I e condição de incubação. Os dados foram apresentados como média  $\pm$  E.P.M. Não houve interação ( $P > 0,05$ ) entre adição de IGF-I e condição de incubação na atividade mitocondrial e produção de EROS. A atividade mitocondrial foi aumentada ( $P < 0,01$ ) pela adição do IGF-I ( $15015 \pm 757$  a;  $21448 \pm 994$  b e  $21425 \pm 1042$  b unidades arbitrárias (UA) com 0, 25 e 100 ng/mL IGF-I, respectivamente) e reduzida ( $P < 0,01$ ) pelo choque térmico (convencional:  $21274 \pm 899$  vs choque térmico:  $17387 \pm 652$  UA). A produção de EROS foi aumentada ( $P < 0,05$ ) pelo IGF-I ( $9170 \pm 457$  a;  $14869 \pm 727$  b; e  $15205 \pm 723$  b UA com 0, 25 e 100 ng/mL IGF-I, respectivamente) e choque térmico ( $P < 0,05$ ) (convencional:  $11590 \pm 509$  vs choque térmico:  $15025 \pm 622$  UA). A redução da concentração de EROS era esperada uma vez que o IGF-I pode aumentar a atividade da glutatona peroxidase (Higashi et al., 2013, Biochim. Biophys. Acta., 2013; 1832:391-399). No entanto, o IGF aumentou a produção de EROS e reduziu o efeito prejudicial do choque térmico pelo aumento da atividade mitocondrial oocitária, mas o seu efeito termoprotetor não está relacionado à atividade antioxidante.

**Palavras-chave:** Atividade mitocondrial; espécies reativas de oxigênio; choque térmico

SBTE 130 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Número de submissão 1492

**Restrição alimentar e suplementação lipídica: idade, peso e concentração de progesterona até a primeira ovulação**

Nadja Gomes Alves<sup>1</sup>; Felipe Barbosa Junqueira<sup>1</sup>; Ivan Júnior Ascari<sup>1</sup>; José Camisão de Souza<sup>1</sup>; João Pedro Araújo Campos<sup>1</sup>; Letícia Rodrigues Faria<sup>1</sup>; Débora Regina Silva<sup>1</sup>; Fabiane Angélica de Paiva Paula<sup>1</sup>; Renato Ribeiro de Lima<sup>1</sup>; Jeferson Ferreira da Fonseca<sup>2</sup>

1.Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil; 2.EMBRAPA, Juiz de Fora, MG, Brasil.

A idade da primeira ovulação é influenciada por vários fatores e a nutrição tem um papel essencial. Lipídios fornecem ácidos graxos essenciais que estão associados de forma positiva aos aspectos reprodutivos. Os objetivos deste estudo foram avaliar os efeitos da inclusão lipídica e da restrição do consumo na idade e peso a primeira ovulação e na concentração sérica de progesterona (P4) no sexto dia após a primeira ovulação. Foram utilizadas trinta e cinco cordeiras Santa Inês com

peso corporal (PC) inicial de  $21,5 \pm 0,3$  kg e idade de  $91,6 \pm 1,4$  dias. Os animais foram blocados de acordo com o PC inicial e distribuído a um dos quatro tratamentos: animais que receberam dieta sem inclusão de lipídeos (3,5% de extrato etéreo - EE), consumo ad libitum (SEM-ALI, grupo controle, n=9); dieta sem inclusão de lipídeos e restrição do consumo (SEM-RE, n=9); dieta com inclusão lipídica, representada pela soja tostada e quebrada (9,8% EE), consumo ad libitum (LIP-ALI, n=8); e dieta com inclusão lipídica e restrição do consumo (LIP-RE, n=9). Cordeiras submetidas a restrição do consumo tiveram 84% da dieta oferecida em comparação aos tratamentos ad libitum. O consumo individual diário de matéria seca (CMS) e de EE (CEE) foram mensurados e os animais foram pesados semanalmente até 35 kg de PC. Para a análise de P4, amostras de sangue foram coletadas uma vez por semana depois que os animais atingiram 25 kg de PC e duas vezes por semana após 30 kg até 35 kg de PC. Estimou-se que a ovulação ocorreu no sexto dia que antecedeu  $P4 \geq 1$  ng/mL. CMS, CEE, ganho de peso médio diário até a primeira ovulação (GPD), peso e idade da primeira ovulação, a concentração sérica de P4 e dias em experimento até a primeira ovulação foram analisados pelo PROC GLM do software SAS (versão 9.3). A ovulação ocorreu em 60% (21/35) das cordeiras (5; 5; 6; 5 do SEM-ALI; SEM-RE; LIP-ALI e LIP-RE, respectivamente). CMS de cordeiras do grupo SEM-ALI foi maior ( $P < 0,01$ ) do que os outros grupos e o consumo de cordeiras do grupo LIP-RE foi menor ( $P < 0,01$ ) do que os grupos SEM-RE e LIP-ALI ( $802,9 \pm 12,9$ ;  $678,0 \pm 15,8$ ;  $726,5 \pm 22,9$ ;  $661,3 \pm 21,2$  g/dia). CEE diferiu entre os grupos ( $P < 0,01$ ) e o maior foi observado em LIP-ALI e o menor em SEM-RE. Peso ( $30,0 \pm 0,8$ ;  $29,3 \pm 1,3$ ;  $30,5 \pm 1,3$ ;  $28,5 \pm 1,6$  g/dia) e idade a primeira ovulação ( $153,2 \pm 5,9$ ;  $170,0 \pm 9,5$ ;  $165,2 \pm 10,5$ ;  $170,6 \pm 15,5$  dias), GPD ( $132,2 \pm 21,1$ ;  $94,4 \pm 6,4$ ;  $128,2 \pm 12,6$ ;  $93,4 \pm 12,3$  g/dia), P4 no soro ( $3,1 \pm 0,6$ ;  $2,0 \pm 0,6$ ;  $2,1 \pm 0,5$ ;  $2,7 \pm 0,6$  ng/mL) e dias em experimento até a primeira ovulação ( $60,6 \pm 5,8$ ;  $81,0 \pm 8,9$ ;  $62,8 \pm 9,8$ ;  $69,8 \pm 14,6$  dias) não apresentaram diferença ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos SEM-ALI, SEM-RE, LIP-ALI e LIP-RE, respectivamente. A primeira ovulação em borregas Santa Inês ocorreu com 30 kg de PC. A restrição do consumo imposta neste estudo não retardou a idade a primeira ovulação. A maior ingestão de lipídios não favoreceu os parâmetros reprodutivos. A P4 sérica não aumentou com a inclusão de soja na dieta.

Agradecimentos: CNPq e FAPEMIG.

**Palavras-chave:** Energia ; suplementação lipídica; extrato etéreo

SBTE 131 foliculogênese, oogênese e ovulação

Número de submissão 1496

#### **Restrição alimentar e suplementação lipídica: efeitos sobre o desenvolvimento folicular ovariano em cordeiras da raça Santa Inês**

Felipe Barbosa Junqueira<sup>1</sup>; Nadja Gomes Alves<sup>1</sup>; Ivan Júnior Ascari<sup>1</sup>; Débora Regina Silva<sup>1</sup>; João Pedro Araújo Campos<sup>1</sup>; Letícia Rodrigues Faria<sup>1</sup>; Renato Ribeiro de Lima<sup>1</sup>; José Camisão de Souza<sup>1</sup>; Fabiane Angélica de Paiva Paula<sup>1</sup>; Jeferson Ferreira da Fonseca<sup>2</sup>

1. Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil; 2. EMBRAPA, Juiz de Fora, MG, Brasil.

A eficiência reprodutiva é diretamente relacionada ao manejo nutricional. A suplementação lipídica nas dietas, principalmente com fontes ricas em ácidos graxos das famílias ômega-6 e ômega-3, tem sido positivamente associada ao desenvolvimento folicular ovariano de ruminantes. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da inclusão de soja grão tostada de forma ad libitum ou restrita sobre o desenvolvimento folicular ovariano de cordeiras Santa Inês. Trinta e cinco cordeiras da raça Santa Inês com peso inicial de  $21,5 \pm 0,27$  kg e idade de  $91,6 \pm 1,36$  dias foram utilizadas. Os animais foram blocados de acordo com o peso inicial e distribuídos aos tratamentos: consumo ad libitum de uma dieta sem inclusão lipídica (AL-SIL, 3,5% de extrato etéreo - EE, n=9); consumo restrito da dieta SIL (CR-SIL, n=9); consumo ad libitum de uma dieta com inclusão lipídica na forma de soja grão tostada e quebrada (AL-IL, 9,8% EE, n=8); e consumo restrito da dieta IL (CR-IL, n=9). O fornecimento das dietas aos animais dos tratamentos CR-SIL e CR-IL foi restrito a 80% do consumo dos animais dos respectivos tratamentos ad libitum. A atividade ovariana foi avaliada em todos os animais por meio de exames ultrassonográficos (ALOKA, SSD 500, 7,5 MHz) em dias alternados por 10 dias aos três, quatro e seis meses de idade, enquanto uma única avaliação foi realizada aos cinco e sete meses de idade. Folículos com  $\geq 3$  mm foram mensurados em tempo real. O diâmetro dos folículos foi calculado como a média dos dois maiores diâmetros da cavidade antral. O diâmetro do maior folículo foi analisado ao longo do tempo, utilizando o procedimento MIXED (SAS®). O número de folículos nas categorias de  $\geq 3-5$  mm e  $> 5$  mm foi analisado ao longo do tempo utilizando modelos lineares mistos generalizados, considerando a distribuição de Poisson e função de ligação log, utilizando o procedimento GLIMIX (SAS®). O diâmetro do maior folículo, o número de folículos  $\geq 3-5$  mm e de folículos  $> 5$  mm não diferiram entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ). O número de folículos  $\geq 3-5$  mm aumentou com a idade, atingiu o máximo de 2,49 folículos aos 168 dias e depois declinou ( $\hat{y} = 0,00027x^2 + 0,09148x - 6,83727$ ,  $P < 0,05$ ). O número de folículos  $> 5$  mm apresentou aumento mais acentuado a partir de 150 dias ( $\hat{y} = -0,00037x^2 + 0,1639x - 18,0185$ ,  $P < 0,05$ ). O diâmetro folicular aumentou de forma linear de acordo com o aumento da idade do animal ( $\hat{y} = 15,68177 + 0,1599x$ ,  $P < 0,05$ ). Provavelmente com o aumento da frequência dos pulsos de LH com a aproximação da puberdade promoveu o desenvolvimento dos folículos, que aumentaram em tamanho até atingirem a categoria de folículos  $> 5$  mm. Concluindo, o diâmetro do maior folículo e o número de folículos  $> 5$  mm não foram influenciados pela restrição alimentar ou pela suplementação lipídica, mas aumentaram com a idade dos animais.

Agradecimentos: CNPq e FAPEMIG.

**Palavras-chave:** Puberdade; atividade ovariana; lipídeos

SBTE 132 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Número de submissão 1507

**Efeito da dose de FSH em protocolo de superovulação sobre a dinâmica folicular ovulatória em ovelhas**

Giovanna Serpa Maciel<sup>1</sup>; Mariana Garcia Kako Rodriguez<sup>1</sup>; Ricardo Perecin Nociti<sup>1</sup>; Ana Paula Rodrigues Simões<sup>1</sup>; Renata Sitta Gomes Mariano<sup>1</sup>; Ricardo Andres Ramirez Uscategui<sup>1</sup>; Jeferson Ferreira da Fonseca<sup>2</sup>; Marcus Antônio Rossi Feliciano<sup>1</sup>; Wilter Ricardo Russiano Vicente<sup>1</sup>; Maria Emilia Franco Oliveira<sup>1</sup>

1.Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, Brasil; 2.EMBRAPA Caprinos e Ovinos, Coronel Pacheco, MG, Brasil.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da dose de FSH exógeno no tratamento gonadotrófico sobre a dinâmica folicular ovulatória em ovelhas. Vinte e quatro ovelhas Santa Inês foram submetidas à sincronização do estro com um dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR®, Pfizer, Hamilton, Nova Zelândia) inserido no D0 e permaneceu até D8. No D0 e D8 foram administrados 0,125 mg de um análogo sintético da PGF2 $\alpha$ , intramuscular (Sincrocio®, Ouro Fino, Cravinhos, Brasil). O tratamento gonadotrófico teve início 48 horas antes da retirada da progesterona (D6), quando as fêmeas foram aleatoriamente divididas em três grupos experimentais de acordo com a dose total de FSH suíno exógeno (Folltropin-V®, Bioniche, Belleville, Canadá): G200 (n=8) - 200 mg; G133 (n=8) - 133 mg; e G100 (n=8) - 100 mg. As doses totais foram administradas em 8 aplicações a intervalos de 12 horas, intramuscular (20, 20, 15, 15, 10, 10, 5 e 5% de FSH). No D6, as fêmeas receberam 300 UI de eCG, intramuscular (Novormon®, Shering-Plough S. A., Syntex S.A., Buenos Aires, Argentina). Foram realizadas avaliações ultrassonográficas (Modo B) com o propósito de acompanhar o crescimento folicular e o momento da ovulação da onda ovulatória. A análise estatística foi realizada com o software R® (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) e os resultados foram comparados pelo teste de Kruskal Wallis e pós-teste de Dunns ( $P < 0,05$ ) (valores médios  $\pm$  desvio padrão). As taxas foram comparadas pelo teste Chi-quadrado. O dia da emergência ( $6,17 \pm 0,92$ ), diâmetro máximo (mm;  $5,96 \pm 0,86$ ), dia do diâmetro máximo ( $9,38 \pm 0,58$ ), duração de crescimento (h;  $78,76 \pm 18,38$ ), taxa de crescimento (mm/dia;  $1,06 \pm 0,30$ ) e diâmetro ovulatório (mm;  $5,76 \pm 0,78$ ) não apresentaram diferença estatística entre os grupos experimentais ( $P > 0,05$ ); momento ovulatório ocorreu tardiamente nos animais pertencentes ao G200 (h;  $P = 0,0037$ ;  $45,36 \pm 11,46$ ) em relação ao G100 ( $40,39 \pm 12,19$ ) e G133 ( $39,61 \pm 11,11$ ); redução do tamanho do folículo pré-ovulatório e taxa de redução do tamanho do folículo pré-ovulatório foram maiores (mm; mm/dia;  $P = 0,0027$  e  $0,0024$ , respectivamente) para ovelhas do G200 ( $0,26 \pm 0,38$ ;  $0,52 \pm 0,77$ , respectivamente) em relação ao G100 ( $0,13 \pm 0,30$ ;  $0,25 \pm 0,59$ , respectivamente), entretanto semelhante ao G133 ( $0,23 \pm 0,39$ ;  $0,46 \pm 0,83$ , respectivamente). Pôde-se concluir que diferentes doses de FSH exógeno (100, 133 e 200 mg) não interferem na dinâmica folicular ovulatória em protocolos de superovulação, com exceção do momento ovulatório, redução do tamanho do folículo pré-ovulatório e da taxa de redução do tamanho do folículo pré-ovulatório.

Auxílio financeiro: Fapesp n°2014/04614-6, EMBRAPA n° 02.13.06.026.00.00, PROPE n° TC1288/2015

**Palavras-chave:** FSH; superovulação; ovino

SBTE 133 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Número de submissão 1518

**Parâmetros sanguíneos e taxa de viabilidade oocitária de vacas girolando suplementadas com linhaça (*Linum usitatissimum* L.) – resultados preliminares**

Christopher Junior Tavares Cardoso<sup>1</sup>; Wilian Aparecido Leite da Silva<sup>1</sup>; Henrique Kischel<sup>1</sup>; Elielton Dias da Silva Arruda<sup>1</sup>; Mariane Gabriela Cesar Ribeiro Ferreira<sup>1</sup>; Ana Caroline Bini de Lima<sup>1</sup>; Marcus Vinicius Moraes de Oliveira<sup>1</sup>; Mirela Brochado Souza<sup>2</sup>; Erikliis Nogueira<sup>3</sup>; Fabiana de Andrade Melo Sterza<sup>1</sup>

1.UEMS, Aquidauana, MS, Brasil; 2.UEL, Londrina, PR, Brasil; 3.EMBRAPA Pantanal, Corumbá, MS, Brasil.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação com linhaça sobre as concentrações séricas de glicose, albumina e colesterol, bem como a qualidade de oócitos bovinos obtidos por aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU). Para tanto, foram utilizadas doze fêmeas bovinas da raça Girolando, distribuídas aleatoriamente em 2 grupos experimentais: grupo controle (CONTR, n = 6) e grupo linhaça (LINH, n = 6), diferindo apenas pelo fornecimento de 0,800kg/animal/dia de linhaça na dieta do grupo LINH. O período de suplementação foi de 126 dias, pois de acordo com (Webb, R. et al., Journal of Animal Science v. 82, p.63-74, 2004), em bovinos, são necessários, aproximadamente, três meses para que os folículos pré-antrais cresçam até o estágio de folículo pré-ovulatório. Foi realizada ablação folicular um dia antes do início da suplementação da dieta com linhaça para que os oócitos possam ser expostos ao tratamento. Foram realizadas 6 sessões de OPU com intervalo de 20 dias entre si. Amostras de sangue foram coletadas das fêmeas em cada uma das sessões de OPU, centrifugadas e os metabólitos foram quantificados pelo método enzimático colorimétrico por espectrofotometria automatizada. Apenas os oócitos classificados como graus I e II foram considerados viáveis. As análises dos metabólitos sanguíneos e das taxas de viabilidade foram realizadas com o PROC GLIMMIX do SAS versão 9.3. Não houve efeito ( $P > 0,05$ ) da suplementação de linhaça sobre as concentrações séricas de glicose, albumina, colesterol e taxa de viabilidade oocitária (60,4% vs 64,4 % grupo controle e linhaça, respectivamente). Assim como o tempo de

suplementação não interferiu em nenhuma das variáveis avaliadas. Portanto, a suplementação com 0,800 kg de linhaça na dieta de vacas Girolando não foi suficiente para alterar as concentrações séricas de glicose, albumina e colesterol, bem como a qualidade dos oócitos ao longo do período de suplementação, possivelmente devido ao elevado escore de condição corporal inicial dos animais.

**Palavras-chave:** Criopreservação; embriões; ácidos graxos poli-insaturados

SBTE 134 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Número de submissão 1525

**Epigallocatequina-3-galato mantém a sobrevivência folicular semelhante ao controle fresco após cultivo *in vitro* de tecido ovariano ovino**

Jamile Maiara da Silva Santos; Thae Lanne Barbosa Gama Lins; Ricássio de Sousa Barberino; Vanuzia Gonçalves Menezes; Bruna Bortoloni Gouveia; Maria Helena Tavares de Matos

*Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, PE, Brasil.*

Epigallocatequina-3-galato (EGCG) é um polifenol natural com potencial antioxidante (JIANG et al., International Journal of Clinical and Experimental Medicine, 9, 2.479-2.485, 2016). Estudos já mostraram que esta substância diminui o estresse oxidativo (ÓRTIZ-LOPEZ et al., Neuroscience, 322, 208-220, 2016) e tem baixa toxicidade (FIORINI et al., Liver Transplantation, 11, 298-308, 2005) em diferentes tipos celulares. Entretanto, não se sabe se a EGCG poderia influenciar no cultivo *in vitro* de folículos ovarianos ovinos. O objetivo deste estudo foi verificar o efeito da EGCG sobre a morfologia e ativação de folículos pré-antrais ovinos cultivados em tecido ovariano. Ovários ovinos (n=10) foram fragmentados (aproximadamente 3x3x1 mm), sendo um fragmento fixado para histologia (controle fresco) e os fragmentos restantes foram cultivados individualmente em 1 mL de meio durante 7 dias, a 39° C, com 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultivo de base (meio controle:  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>) consistia de  $\alpha$ -Meio Essencial Mínimo ( $\alpha$ -MEM) suplementado com 10 ng/mL de insulina, 5,5  $\mu$ g/mL de transferrina, 5,0 ng/mL de selênio, 2 mM de glutamina, 2 mM de hipoxantina, 1,25 mg/mL de BSA, 100  $\mu$ g/mL de penicilina e 100  $\mu$ g/mL de estreptomicina. Para avaliar os efeitos da EGCG, os fragmentos ovarianos foram cultivados em  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> sozinho ou adicionado de EGCG (0,01; 0,1; 1; 10 ou 100  $\mu$ g/mL - diluída em água ultrapura). Após o cultivo, os fragmentos foram destinados à histologia e classificados como morfologicamente normais quando não apresentavam retração citoplasmática ou núcleo picnótico no oócito, ou células da granulosa e/ou da teca organizadas; folículos atresícos apresentavam algum destes parâmetros. A ativação folicular (passagem de folículos primordiais para folículos em desenvolvimento) também foi avaliada. Os reagentes utilizados no cultivo e na histologia foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA) e Dinâmica (São Paulo, Brasil), respectivamente. As porcentagens de folículos morfologicamente normais, primordiais e em desenvolvimento foram submetidos à ANOVA e teste de Tukey (P<0,05). Os resultados mostraram que, após o cultivo *in vitro*, apenas o tratamento contendo 1  $\mu$ g/mL de EGCG manteve a porcentagem de folículos morfologicamente normais semelhante (P>0,05) à observada no controle fresco. Entretanto, 100  $\mu$ g/mL de EGCG reduziu (P<0,05) o percentual de folículos morfologicamente normais quando comparado ao  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> e às demais concentrações de EGCG. Em todos os tratamentos ( $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> e diferentes concentrações da EGCG), observou-se uma redução (P<0,05) na porcentagem de folículos primordiais e um concomitante aumento (P <0,05) na porcentagem de folículos em desenvolvimento, comparado ao controle fresco. Em conclusão, 1  $\mu$ g/mL de EGCG mantém a sobrevivência folicular semelhante ao controle fresco. Além disso, todas as concentrações de EGCG, com exceção de 100  $\mu$ g/mL, apresentaram sobrevivência folicular semelhante ao  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>, após o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais ovinos.

**Palavras-chave:** Ovário; antioxidante; foliculogênese

SBTE 135 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Número de submissão 1528

**Resposta de novilhas Nelore pré-púberes a dois tratamentos de indução da ovulação— dados preliminares**

Dayane Priscila Vrisman<sup>1</sup>; Natália Marins Bastos<sup>2</sup>; André Roberto Franco Oliveira<sup>2</sup>; Rogério Ribeiro Vicentini<sup>3</sup>; Guilherme Fazan Rossi<sup>1</sup>; Naiara Nantes Rodrigues<sup>1</sup>; Luana Lelis Souza<sup>3</sup>; Fabio Morato Monteiro<sup>3</sup>; Pedro Paulo Maia Teixeira<sup>4</sup>; Maria Emília Franco Oliveira<sup>1</sup>

*1.UNESP Jaboticabal, Jaboticabal, SP, Brasil; 2.UNESP Ilha Solteira, Ilha Solteira, SP, Brasil; 3.Instituto de Zootecnia, Sertãozinho, SP, Brasil; 4.Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil.*

A puberdade é o marco inicial no processo produtivo e reprodutivo de uma fêmea bovina, uma vez que sua antecipação pode afetar a produtividade do rebanho como um todo. Vários hormônios podem ser utilizados para indução da puberdade em novilhas, dentre os quais pode-se citar a progesterona, o estradiol, a associação progesterona e estradiol, ou também o GnRH e seus análogos, porém cada um com eficiências diferentes (EMERICK, L.L. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 33, p.11-19, 2009.). O presente estudo teve por objetivo avaliar a resposta ovariana a dois tratamentos de indução da ovulação em novilhas Nelore (*Bos indicus*). Cinquenta e sete novilhas pré-púberes (ausência de corpo lúteo em duas avaliações ultrassonográficas com intervalo de sete dias entre elas) com peso de 294,63±26,41 kg e idade de 17,47±0,81 meses, foram divididas em dois grupos de tratamento: grupo GP4+GnRH foi realizado a indução da ovulação com



dispositivo intravaginal de progesterona e indutor da ovulação e, grupo GGnRH somente com o indutor da ovulação. No GP4+GnRH (n=29) foi utilizado dispositivo intravaginal de progesterona (uma grama/dispositivo) de terceiro uso (Primer®, Tecnopec, São Paulo, Brasil) permanecendo no animal por dez dias. Dois dias após sua retirada foi aplicado um indutor da ovulação - 0,02mg de Acetato de Buserelina (GnRH) (Sincroforte®, Ouro Fino, São Paulo, Brasil) pela via intramuscular. No GGnRH (n=28) a indução da ovulação foi realizada utilizando somente o indutor da ovulação, sendo esse aplicado na mesma concentração, via e dia de administração que o grupo GP4+GnRH. Noventa e seis horas após administração do GnRH foi realizada acompanhamento com ultrassonografia Doppler para determinar ovulação, formação e funcionalidade do corpo lúteo (CL). Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas por meio do teste de Tukey, com nível de significância a 5%. A média do diâmetro folicular no dia da aplicação do GnRH no GP4+GGnRH foi de  $12,21 \pm 2,27$  mm, e no GGnRH de  $10,12 \pm 1,16$  mm. Todos os animais que ovularam tiveram formação de CL, porém não foi observada diferença na ovulação e formação de CL entre os grupos GP4+GnRH (89,66%) e GGnRH (89,29%),  $p=0,08$ . Neste estudo os dois tratamentos hormonais de indução da ovulação foram eficientes, uma vez que o diâmetro folicular no momento da aplicação do GnRH estava entre 10 e 12 mm, valores superiores a capacidade ovulatória em *Bos indicus* (BARUSELLI, P.S. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 31, p. 205-211, 2007).

Agradecimentos: FAPESP (processo 2015/13079-0), Ouro Fino e Centro APTA Bovinos de Corte (Instituto de Zootecnia/Sertãozinho – SP).

**Palavras-chave:** Corpo lúteo; diâmetro pré-ovulatório; zebuínos

SBTE 136 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Número de submissão 1532

#### **Distribuição regional de folículos pré-antrais em ovários equinos**

Suellen Miguez Gonzalez; Camila Bizarro da Silva; Andressa Guidugli Lindquist; Isabela Búfalo; Camila Bortoliero Costa; Livia Aires Lisboa; Nathalia Covre da Silva; Fabio Morotti; Marcelo Marcondes Seneda  
*Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.*

O objetivo desse estudo foi determinar a distribuição dos folículos pré-antrais (FOPAs) equinos no parênquima ovariano. Ovários (n=7) de éguas provenientes de abatedouro foram dissecados e seccionados no plano sagital (curvatura maior) resultando em dois hemiovários. No experimento 1 (n=3), cada hemiovário foi seccionado verticalmente em seis fragmentos, totalizando 12 fragmentos para cada ovário inteiro, medindo cerca de  $1,5 \times 0,5 \times 0,5$  cm. Esses fragmentos foram delimitados em três regiões que contemplam a extensão do ovário, nomeadas como: região mais interna do parênquima (C1), região média (entre a região mais interna e a externa; C2) e o terceiro corte, a região mais externa (C3). No experimento 2 (n=4), cada hemiovário foi seccionado em quatro fragmentos simétricos, totalizando oito fragmentos para cada ovário inteiro, nos quais estes localizavam-se distantes ou próximos da fossa ovulatória (DFO e PFO). Os fragmentos referentes à curvatura menor do ovário foram definidos como próximos da fossa ovulatória (PFO1+PFO2) e os fragmentos da curvatura maior do ovário foram definidos como distantes da fossa ovulatória (DFO3+DFO4). Os FOPAs foram classificados como íntegros ou degenerados de acordo com a morfologia do oócito e das células da granulosa. A análise estatística para comparação dos dados foi realizada utilizando o teste Exato de Fisher, com nível de 5% de significância através do programa estatístico Minitab® 16.1.1. No primeiro experimento 1.130 FOPAs foram visualizados, sendo 1.054 (93,3 %) folículos primordiais e 76 (4,7 %) em desenvolvimento. No experimento 2 foram encontrados 938 FOPAs, sendo 894 (95,30%) primordiais e 44 (4,7 %) em desenvolvimento. Houve diferença ( $p<0,05$ ) quanto a presença de FOPAs nas regiões interna (C1 41,6 %; 470/1130), média (C2 32,4 %; 366/1130) e externa (C3 26 %; 294/1130) do ovário equino. Estas três regiões diferiram quando comparadas entre si, porém a região C1 apresentou maior percentagem de FOPAs em relação às demais ( $p<0,05$ ). As regiões C2 e C3 apresentaram maior percentagem de folículos íntegros primordiais e em desenvolvimento que a região C1, desta forma a região interna obteve uma maior ( $p<0,05$ ) quantidade de folículos degenerados em relação as demais. As regiões próximas à fossa ovulatória (PFO1+PFO2 58,7 %; 551/938) apresentaram maior concentração folicular em relação à região distante da fossa ovulatória (DFO3+DFO4 41,3; 387/938;  $p<0,05$ ). A região DFO apresentou menor proporção de folículos degenerados primordiais e em desenvolvimento que a região PFO, demonstrando maior presença de folículos ovarianos íntegros ( $p<0,05$ ). Desta forma, a distribuição dos FOPAs no ovário equino ocorreu de forma heterogênea, apresentando maiores quantidades de FOPAs nas regiões interna e próxima da fossa ovulatória ( $p<0,05$ ). Este estudo sugere novos conceitos quanto a localização dos folículos ovarianos equinos, tais como pouca delimitação entre as camadas ovarianas e a presença de folículos na camada mais externa.

**Palavras-chave:** Folículos ovarianos; localização folicular; égua

SBTE 137 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Número de submissão 1535

#### **Efeito da administração de prostaglandina no momento da IATF em novilhas búfalas submetidas à sincronização da ovulação durante a estação reprodutiva desfavorável (resultados preliminares)**

Nelcio Antonio Tonizza de Carvalho<sup>1</sup>; Julia Gleyci Soares<sup>2</sup>; Diego Cavalcante de Souza<sup>2</sup>; José Nélcio de Sousa Sales<sup>3</sup>; Pietro Sampaio Baruselli<sup>2</sup>

1.APTA, Registro, SP, Brasil; 2.USP, São Paulo, SP, Brasil; 3.Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil.

Avaliou-se o efeito da administração de prostaglandina ( $\text{PGF}_{2\alpha}$ ) em novilhas búfalas submetidas à sincronização da ovulação e a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) durante a estação reprodutiva desfavorável (primavera-verão; 24° 26' 15" S e 47° 48' 45" O). A hipótese levantada foi que a administração de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  no momento da IATF aumenta a sincronização da ovulação, assim como a taxa de ovulação. As prostaglandinas são mediadores locais importantes para as funções da tuba uterina e estão envolvidas nos processos de ovulação e fecundação (Małysz-Cymborska et al., Repr. Dom. Ani., 48:1034-1042, 2013). Em dia aleatório do ciclo estral (D0), 35 novilhas búfalas receberam um dispositivo intravaginal de progesterona (P4; Sincrogest®, Ourofino Agronegócio, Brasil) e 2mg im de benzoato de estradiol (BE, Benzoato HC®, Hertape Calier Saúde Animal S.A., Brasil). No D9, os animais receberam 0,53mg im de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (Cloprostenol sódico, Sincrocio®, Ourofino Agronegócio, Brasil) e 400UI im de eCG (Folligon®, MSD Saúde Animal, Brasil), seguido da remoção da P4. Após 24h (D10), a ovulação das novilhas foi induzida por meio da aplicação de 1,0mg im de BE (Benzoato HC®) e, 32 horas mais tarde, todas as novilhas foram submetidas à IATF (D11). Os animais foram submetidos a avaliações ultrassonográficas (Mindray DP2200Vet, China) realizadas no D0 para verificar a atividade ovariana, no D9 e no D10 para aferir o diâmetro ( $\emptyset$ ) folicular e do D11 ao D14 (12/12h por 60h) para verificar o momento da ovulação e o  $\emptyset$  do folículo ovulatório (FO). As novilhas que apresentaram folículos < 9mm no D10 (n=10) ou que ovularam antes da IATF (n=3), foram removidas do experimento. As demais fêmeas foram distribuídas de acordo com a idade, o peso, o escore de condição corporal, a atividade ovariana e o  $\emptyset$  do maior folículo no D10 em dois grupos: Controle (n=10) e  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (n=12). As novilhas do grupo  $\text{PGF}_{2\alpha}$  receberam 0,53mg im de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (Sincrocio®, Ourofino Agronegócio, Brasil) no momento da IATF. Nos D19 e D41, os animais foram submetidos às avaliações ultrassonográficas (Mindray DP2200Vet) para a aferição do  $\emptyset$  do CL e para o diagnóstico de gestação, respectivamente. A análise estatística foi realizada pelo procedimento GLIMMIX do SAS®. Não houve diferença entre os grupos experimentais para as variáveis analisadas:  $\emptyset$  do FO (13,3±0,4 vs. 13,0±0,5 mm; P=0,82); momento da ovulação (68,7±1,8 vs. 66,0±0,0 h, P=0,13); taxa de ovulação [90,0% (9/10) vs. 100,0% (12/12); P=0,98];  $\emptyset$  do CL (17,9±0,7 vs. 17,9±0,7 mm; P=0,45) e taxa de prenhez [40,0% (4/10) vs. 75,0% (9/12); P=0,12]. No entanto, ao avaliar a homogeneidade das variâncias, verificou-se maior sincronização da ovulação no grupo  $\text{PGF}_{2\alpha}$  que no Controle (P<0,00001). Conclui-se que a administração de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  no momento da IATF aumenta a sincronização da ovulação, porém, não proporciona maior taxa de ovulação em novilhas búfalas submetidas à sincronização da ovulação e a IATF durante a estação reprodutiva desfavorável.

**Palavras-chave:** Novilhas; sincronização; ovulação

SBTE 138 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Número de submissão 1536

#### **Efeito dos lipopolissacarídeos sobre a expressão de genes envolvidos na esteroidogênese e na ativação da resposta inflamatória nas células da granulosa bovina**

João Alveiro Alvarado Rincón<sup>1</sup>; Felipe Terres de Campos<sup>1</sup>; Diego Andres Acosta<sup>2</sup>; Pedro A S Silveira<sup>1</sup>; Bernardo Garziera Gasperin<sup>1</sup>; Marcio Nunes Correa<sup>1</sup>; Ligia Margareth Cantarelli Pegoraro<sup>3</sup>; Augusto Schneider<sup>1</sup>

1.Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil; 2.Corporacion Colombiana de Investigacion Agropecuaria, Bogotá, Colômbia; 3.EMBRAPA Clima Temperado, Pelotas, RS, Brasil.

Os lipopolissacarídeos (LPS) promovem a resposta inflamatória e têm sido detectados no fluido folicular (FF), fluido uterino e no plasma sanguíneo de vacas com metrite e com mastite infecciosa. O LPS atua no hipotálamo ou na hipófise, inibindo a liberação de gonadotrofinas. No entanto, o LPS pode ter um efeito direto no ovário, principalmente nas células da teca e da granulosa, alterando desta maneira a esteroidogênese. Objetivou-se avaliar o efeito do LPS sobre a expressão de genes envolvidos na esteroidogênese e na ativação da resposta inflamatória nas células da granulosa do folículo dominante em bovinos. Para isto 20 vacas da raça Jersey foram distribuídas aleatoriamente em 2 grupos: grupo controle (n=10) e grupo LPS (n=10). A onda folicular de ambos os grupos foi sincronizada utilizando dispositivo intravaginal liberador de progesterona (CIDR; Eazi-Breed CIDR®, Zoetis Saúde Animal, NJ, USA) e 2 mg de benzoato de estradiol (Hertape Calier, MG, Brasil) no dia 0. Doze horas antes da remoção do CIDR (dia 8) as vacas receberam uma injeção intramuscular de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (25 mg de dinoprost-trometamina; 5 mL de Lutalyse, Zoetis Saúde animal). Duas horas após a remoção do CIDR foi administrada uma dose única de LPS IV (2,5 ug/kg PV; SIGMA-ALDRICH® Inc., MO, EUA) no grupo LPS e uma solução placebo IV (2 mL de NaCl 0,9%) no grupo controle. Seis horas após a aplicação do LPS, o folículo dominante de cada animal foi identificado através de ultrassonografia e aspirado. As células da granulosa foram recuperadas através da centrifugação do FF. A temperatura retal foi aferida cinco horas após a aplicação do LPS. O RNA das células da granulosa foi extraído utilizando Trizol® e a expressão de RNAm dos genes alvo foi realizada através de qRT-PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) usando o gene H2α como controle endógeno. Para a análise estatística foi aplicado o teste de Mann-Whitney (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). As vacas recebendo LPS apresentaram uma resposta inflamatória sistêmica, suportado pela maior temperatura retal (40,4 ± 0,1 °C) em comparação ao grupo controle (38,8 ± 0,1 °C) (P<0,05). Além disso, observou-se uma diminuição de 91% na expressão do *TLR4* (P=0,002) e de 89% na expressão de *TNF* (P=0,001), importantes reguladores da resposta imune, no grupo recebendo LPS. Além disso, o gene *STAR*, um importante regulador da esteroidogênese, apresentou uma diminuição de

93% na sua expressão ( $P=0,01$ ) no grupo desafiado com LPS. Em contrapartida, não observou-se diferença na expressão dos genes *NF-kB*, *CYP19A1*, *P450C17*, *LHCGR*, *CYP11A1* e *HSD3B1* entre os grupos ( $P>0,05$ ). A concentração intrafolicular de estradiol não foi diferente entre os grupos ( $P>0,05$ ). Conclui-se que o LPS induz uma resposta inflamatória nas células da granulosa de folículos dominantes, mediada pela via do *TLR4*, porém, mediante mecanismos que devem ser melhor esclarecidos. Além disso, o LPS pode alterar a produção de hormônios esteroides em longo prazo, visto que reduziu drasticamente a expressão de *STAR*.

**Palavras-chave:** Estradiol; atividade ovariana; resposta imune

SBTE 139 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Número de submissão 1537

**Perfil de genes relacionados ao metabolismo lipídico em células da granulosa de vacas Nelore submetidas à superestimulação ovariana**

Priscila Helena Santos<sup>1</sup>; Patrícia Kubo Fontes<sup>1</sup>; Fernanda Fagali Franchi<sup>1</sup>; Marcelo Fabio Gouveia Nogueira<sup>1</sup>; Ciro Moraes Barros<sup>1</sup>; Mateus José Sudano<sup>2</sup>; Anthony César Souza Castilho<sup>3</sup>

1.Unesp, Botucatu, SP, Brasil; 2.Unipampa, Uruguaiana, RS, Brasil; 3.Unoeste, Presidente Prudente, SP, Brasil.

A superestimulação ovariana com gonadotrofina exógena afeta a qualidade oocitária, embrionária e também a diferenciação das células da granulosa. Os lipídios desenvolvem um papel significativo no estoque de energia, na estrutura, na modificação das propriedades físicas e funcionais das membranas biológicas; eles também têm um efeito importante na interação célula-célula, proliferação celular e transporte intra e intercelular. Adicionalmente, vacas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) superestimuladas possuem diferenças no perfil e abundância de fosfolipídios no fluido folicular. Assim, para investigação dos efeitos da superestimulação com FSH (Protocolo P-36) ou FSH combinado com eCG (Protocolo P-36/eCG) foi quantificada a abundância de mRNA dos genes relacionados ao metabolismo lipídico (*ACSL1*, *ACSL3*, *ACSL6*, *SCD*, *ELOVL5*, *ELOVL6*, *FASN*, *FADS2*, *SREBP1*, *CPT1B*) nas células da granulosa de vacas submetidas ou não a protocolos superestimulatórios. Para tanto, vacas Nelore foram tratadas com dois protocolos superestimulatórios: Protocolo P-36 ( $n=14$ ) ou Protocolo P-36/eCG ( $n=16$ ; substituição da administração de FSH por eCG no último dia de tratamento). Vacas não superestimuladas ( $n=14$ ) foram submetidas somente a sincronização estral sem a superestimulação ovariana. Os animais foram abatidos 12 horas após a remoção do dispositivo intravaginal de progesterona. O fluido folicular foi aspirado e as células da granulosa removidas por centrifugação a 1.200g. A quantificação da abundância relativa de mRNA foi mensurada por RT-PCR em tempo real usando oligonucleotídeos específicos para bovinos. Os dados foram normalizados pela expressão do gene endógeno peptidil isopropil isomerase (*PPIA*). O efeito dos tratamentos superestimulatórios foi testado por ANOVA e as médias comparadas por teste de Tukey. Diferenças foram consideradas significativas quando  $P\leq 0,05$ . A superestimulação ovariana não afetou a expressão dos genes relacionados ao metabolismo lipídico nas células da granulosa bovina. Somente a abundância de mRNA do *CPT1B* foi afetada pela superestimulação ovariana, demonstrando menores valores nas células da granulosa de vacas submetidas ao tratamento P-36/eCG ( $2,25\pm 0,47$ ) comparado às vacas não superestimuladas ( $6,48\pm 1,51$ ). Em conclusão, apesar dos dados anteriores mostrarem que a abundância de alguns PL no fluido folicular bovino foi afetada pela superestimulação ovariana, somente a abundância relativa de mRNA do *CPT1B* parece ser modulada nas células da granulosa de vacas Nelore submetidas à superestimulação ovariana com FSH combinado ao eCG (protocolo P-36/eCG).

Financiado pela FAPESP.

**Palavras-chave:** Superestimulação ovariana; células da granulosa; metabolismo lipídico

SBTE 140 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Número de submissão 1538

**Efeito da administração de somatotropina sobre a expressão de genes em células foliculares do folículo dominante de vacas**

Diego Andres Acosta<sup>1</sup>; Joao Alveiro Alvarado Rincón<sup>2</sup>; Pedro A S Silveira<sup>2</sup>; Jorgea Pradie<sup>3</sup>; Marcio Nunes Correa<sup>2</sup>; Ligia Margareth Cantarelli Pegoraro<sup>3</sup>; Augusto Schneider<sup>2</sup>

1.Corporacion Colombiana de Investigacion Agropecuaria, Bogotá, Colômbia; 2.Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil; 3.EMBRAPA Clima Temperado, Pelotas, RS, Brasil.

O objetivo deste estudo foi determinar o efeito da administração de somatotropina sobre a expressão de genes em células foliculares obtidas do folículo dominante de vacas leiteiras. Foram utilizadas 20 vacas Jersey manejadas sob as mesmas condições e regime nutricional (sistema baseado em pastagem). As vacas foram distribuídas aleatoriamente em dois tratamentos: somatotropina; (ST;  $n = 10$ ), que recebeu uma dose de somatotropina (500 mg, subcutâneo, Lactotropin, Elanco, SP, Brasil) 60 dias previamente ao início do protocolo de sincronização (dia 0) e tratamento controle; (CN;  $n = 10$ ) que não recebeu aplicação de somatotropina. No dia 0 do protocolo, as vacas receberam uma injeção de GnRH (100 mg, intramuscular, de gonadorelina hy- drochloride; 2 mL de Factrel, Zoetis Saúde Animal, NJ, USA) e um dispositivo intravaginal de liberação controlada de progesterona (CIDR; Eazi-Breed CIDR, Zoetis Saúde animal). No dia 8, 12h antes da remoção do CIDR, as vacas receberam uma injeção de PGF2a (25 mg, intramuscular de dinoprost-trometamina; 5 mL

de Lutalyse, Zoetis Saúde animal) e o folículo dominante de cada vaca foi aspirado 12h após a retirada do CIDR. Para determinar o número de folículos e identificar o folículo dominante, foi monitorado o desenvolvimento folicular por meio de ultrassom nos dias -60, -53, -46, -14, -7, 0, 8 e no momento de aspiração. O fluido folicular do folículo dominante de cada vaca foi aspirado e as células foliculares foram recuperadas imediatamente por centrifugação, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C até a extração do RNA. Foi avaliada a expressão de RNAm dos genes LHCGR, STAR, HSD3B, P450scc, CYP19A1, IGFR e PAPPa através de qRT-PCR. Testes-T foram realizados utilizando GraphPad (GraphPad Software, Inc. CA, USA) para a comparação entre as médias. A expressão de RNAm do gene STAR foi maior nas vacas do tratamento ST ( $2,88 \pm 0,85$  vezes maior) do que nas vacas CN ( $P=0,02$ ). No entanto, as vacas ST tiveram uma menor expressão do RNAm ( $P<0,05$ ) de PAPPa, P450scc e CYP19A1 ( $0,19 \pm 0,09$ ,  $0,39 \pm 0,17$  e  $0,24 \pm 0,10$  vezes, respectivamente) do que as vacas CN. A expressão do RNAm de HSD3B, IGFR e LHCGR não foi diferente entre os tratamentos ( $P>0,05$ ). Em conclusão, a injeção de somatotropina em vacas leiteiras tem efeitos a longo prazo sobre o desenvolvimento folicular e foi capaz de aumentar a expressão de RNAm do gene STAR e reduzir a expressão de PAPPa, P450scc e CYP19A1 nas células foliculares do folículo dominante 60 dias após o tratamento, potencialmente aumentando as chances de ovulação desta classe de folículos.

**Palavras-chave:** Folículo dominante; expressão gênica; somatotropina

SBTE 141 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Número de submissão 1540

#### **População folicular na estimativa da resposta superovulatória em ovelhas da raça Santa Inês**

Helena Fabiana Reis de Almeida Saraiva<sup>1</sup>; Pedro Henrique Nicolau Pinto<sup>1</sup>; Gláucia Mota Bragança<sup>1</sup>; Gustavo Bervian Santos<sup>1</sup>; Lilian Santos Ribeiro<sup>1</sup>; Ribrio Ivan Tavares Pereira Batista<sup>1</sup>; Isabel Oliveira Cosentino<sup>1</sup>; Joanna Maria Gonçalves de Souza Fabjan<sup>1</sup>; Jeferson Ferreira da Fonseca<sup>2</sup>; Felipe Zandonadi Brandão<sup>1</sup>

1.Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil; 2.EMBRAPA Caprinos e Ovinos, Juiz de Fora, MG, Brasil.

Objetivou-se verificar a correlação entre a população folicular na resposta superovulatória e na recuperação de estruturas viáveis em programas de produção in vivo de embriões ovinos. Vinte e cinco ovelhas nulíparas da raça Santa Inês ( $11,9 \pm 1,1$  meses, ECC:  $2,8 \pm 0,3$ ) foram superovuladas utilizando-se o cio base para início do protocolo (D0). Para sincronização prévia da emergência folicular, manteve-se por seis dias um implante vaginal contendo 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (Progespon®, Zoetis, Campinas-SP, Brasil), 24 horas antes da remoção do implante aplicou-se 300 UI de eCG (Novormon®, Schering Plough, São Paulo, Brasil) e 0,24mg de cloprostenol sódico (Estron®, Tecnopec, São Paulo, Brasil). Trinta e seis horas após a remoção da esponja, os animais receberam 25 µg de leirelina (Gestran Plus®, Tecnopec, São Paulo-SP, Brasil). A superovulação iniciou 80 horas após a retirada da esponja. Utilizou-se 200 mg de FSH/por animal (Folltropin®, União Química Farmacêutica Nacional S/A, São Paulo, Brasil) em seis doses decrescentes a cada 12 horas (50/50, 30/30, 20/20 mg). Na última dose de FSH, aplicou-se 0,24 mg de cloprostenol (Estron®, Agener União, São Paulo, Brasil) e, 24 horas após, 0,025 mg de leirelina (Gestran Plus®, Tecnopec, São Paulo-SP, Brasil). Em paralelo, na primeira dose de FSH uma nova esponja (Progespon®, Zoetis, Campinas-SP, Brasil) foi inserida e removida na penúltima dose deste hormônio. Após a última dose de FSH realizou-se monta natural controlada a cada 12 horas. Utilizou-se um aparelho de ultrassom (Sonoscape S6®, SonoScape, Shenzhen, China) acoplado a um transdutor linear de 7,5MHz, por via transretal, para a quantificação da população folicular (PF) em dois momentos: no início do protocolo de sincronização do estro base (PFESTROBASE) e no momento da aplicação da primeira dose de FSH (PFFSH-1). As coletas foram realizadas por via cirúrgica, seis a sete dias após as coberturas, e as estruturas viáveis (EV) quantificadas. O número de CLs (NCLs) foi determinado por laparoscopia no dia da recuperação embrionária. As variáveis PFESTROBASE e PFFSH-1 foram comparadas com o NCLs e EV por meio do Índice de Correlação de Person e pela Análise de Regressão Linear Simples. Para todos os testes, considerou-se 5% de significância. Foram obtidos  $7,5 \pm 4,8$  corpos lúteos e  $4,0 \pm 3,5$  estruturas viáveis por doadora. Foram encontradas correlações significativas, medianas e baixas, entre o PFESTROBASE e NCLs ( $r=0,45$ ;  $r^2=0,17$ ;  $p<0,05$ ); PFFSH-1 e NCLs ( $r=0,41$ ;  $r^2=0,13$ ;  $p<0,05$ ); PFESTROBASE e EV ( $r=0,55$ ;  $r^2=0,27$ ;  $p<0,05$ ) e também entre o PFFSH-1 e EV ( $r=0,41$ ;  $r^2=0,13$ ;  $p<0,05$ ). Em conclusão, existe uma correlação mediana entre população folicular observada por ultrassonografia e estruturas viáveis recuperadas após protocolo de superovulação. Assim, esta metodologia não é indicada como ferramenta de triagem isolada na seleção de ovelhas doadoras de embriões da raça Santa Inês.

Suporte financeiro: CNPq, Faperj e Embrapa (Projeto 02.13.06.026.00.00)

**Palavras-chave:** FSH; ovinos; Santa Inês

SBTE 142 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Número de submissão 1546

#### **Exossomos do fluido folicular de vacas Nelore modulam a expressão gênica em células do cumulus e blastocistos bovinos**

Fernanda Fagali Franchi<sup>1</sup>; Patrícia Kubo Fontes<sup>1</sup>; Priscila Helena Santos<sup>1</sup>; Eduardo Montanari Razza<sup>1</sup>; Bárbara Loureiro<sup>2</sup>; Juliano Coelho da Silveira<sup>3</sup>; Marcelo Fabio Gouveia Nogueira<sup>1</sup>; Ciro Moraes Barros<sup>1</sup>; Anthony César Souza Castilho<sup>4</sup>

1.UNESP, Botucatu, SP, Brasil; 2.UVV, Vila Velha, ES, Brasil; 3.USP, Pirassununga, SP, Brasil; 4.Unoeste, Presidente Prudente, SP, Brasil.

A superestimulação ovariana afeta eventos celulares e moleculares nas células foliculares ovarianas, nos complexos *cumulus*-oócito (CCOs), no oviduto e em embriões, bem como, a comunicação celular através da secreção e captação de exossomos (Exo). O objetivo desse estudo foi investigar os efeitos das vesículas extracelulares (especificamente, Exo), recuperadas do fluido folicular (FF), sobre a progressão da meiose e apoptose oocitária; e também sobre a expressão gênica de CCOs e blastocistos. Para tanto, os Exo foram recuperados através da ultracentrifugação e filtração do FF proveniente de vacas Nelore submetidas à superestimulação ovariana com FSH (Exo/FSH), com FSH combinado com eCG (Exo/eCG) ou de vacas não superestimuladas (Exo/NS). A presença de Exo foi confirmada por Microscopia Eletrônica de Transmissão. CCOs oriundos de abatedouro foram submetidos à maturação *in vitro* (MIV) por 22-24h em meio TCM199 enriquecido com 10% Exo de cada grupo (Exo/FSH, Exo/eCG ou Exo/NS) ou sem Exo (Controle). A progressão da meiose (marcação Hoechst-33342) e a apoptose (ensaio TUNEL) foram analisadas nos oócitos maturados *in vitro*. Pools de 20 oócitos foram separados de suas células do *cumulus* e cada tipo celular foi submetido à quantificação de mRNA por RT-qPCR dos genes *GDF9*, *BMP15*, *EGFR*, *AREG*, *GREM1* e *PDE3*. CCOs também foram maturados e fertilizados *in vitro* e, os blastocistos, recuperados no dia 7. Pools de 3 blastocistos foram utilizados para avaliação da abundância de mRNA de 44 genes relacionados a qualidade embrionária em um sistema de qPCR de alto rendimento (Biomark™HD). Os dados foram obtidos a partir de 5 réplicas. Os efeitos da adição de Exo foram testados por ANOVA ( $P < 0.05$ : diferença significativa; e  $0.05 < P < 0.10$ : tendência) e as médias foram comparadas pelo teste Tukey-Kramer HSD. A adição de Exo não afetou a porcentagem de oócitos em metáfase II, em apoptose ou a expressão gênica em oócitos. No entanto, a abundância de mRNA de *GDF9* e *BMP15* nas células do *cumulus* foi maior no grupo Exo/FSH quando comparado aos grupos Exo/NS e Exo eCG. A adição de Exo não afetou as taxas de blastocistos, mas modulou a abundância de mRNA de alguns genes alvo: *HAND1* foi mais expresso em Exo/eCG quando comparado ao Exo/NS e controle; *PFKP* foi mais expresso em Exo/FSH quando comparado ao Exo/NS e controle; *PKP2* foi menos expresso em Exo/FSH se comparado ao Exo/NS e Exo/eCG; e a expressão de *SLC2A3* foi maior em Exo/eCG quando comparado ao Exo/FSH. Adicionalmente, 3 genes tenderam a ser diferentes entre os grupos: *ARO*, *CDH1* e *HSPA1A*. A expressão de *OCN* tendeu a ser maior nos grupos tratados com Exo de vacas superestimuladas. Em conclusão, embora o mecanismo preciso e as moléculas envolvidas nessa complexa regulação permaneçam obscuros, nossos resultados indicam que a superestimulação ovariana em vacas Nelore parece modificar o perfil de Exo no FF, os quais podem modular a expressão gênica de células do *cumulus* e blastocistos quando adicionados na MIV.

**Palavras-chave:** Superestimulação ovariana; vesículas extracelulares; maturação *in vitro*

SBTE 143 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Número de submissão 1553

**Mitofusina 1 é essencial para a fertilidade oocitária, enquanto que a Mitofusina 2 é necessária para a eliminação de DNA mitocondrial mutante em oócitos de camundongos**

Thiago Simões Machado<sup>1</sup>; Carolina Habermann Macabelli<sup>1</sup>; Karen Freire Carvalho<sup>1</sup>; Bruna Martins Garcia<sup>1</sup>; Fernanda Karina da Silva Ribeiro<sup>1</sup>; Mariana Trevisan<sup>1</sup>; Fabiana de Dio Sarapião<sup>2</sup>; Marcelo Marcondes Seneda<sup>2</sup>; Francisco Eduardo Gontijo Guimarães<sup>3</sup>; Marcos Roberto Chiaratti<sup>1</sup>

1.Lagenbio, DGE, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil; 2.Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil; 3.IFSC, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brasil.

Mitocôndrias têm papel fundamental durante o crescimento do oócito, porém os mecanismos atrelados a tal função são elusivos. Comparado com as demais células do organismo, o oócito contém maior quantidade de DNA mitocondrial (mtDNA) e mitocôndrias que se distinguem por serem pequenas e de formato arredondado. Tais características são dependentes da fusão e fissão mitocondrial, o que é determinante para a função e herança da organela. Logo, visando estudar o papel da fusão mitocondrial no oócito, os genes *Mfn1* e *Mfn2* foram condicionalmente nocauteados por expressão de cre-recombinase dirigida pelo promotor *Zp3*. Para tanto, foram utilizados camundongos heteroplásmicos, contendo ~50% de mtDNA mutante (NZB). Oócitos selvagens (WT) ou nocautes para *Mfn1* (*Mfn1*-null), *Mfn2* (*Mfn2*-null) ou ambos (*Mfn*-dm) foram comparados quanto a competência de desenvolvimento, função mitocondrial e herança do mtDNA NZB. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste de Duncan. Diferenças com  $P < 0,05$  foram consideradas significativas. O acasalamento de fêmeas contendo oócitos *Mfn1*-null com machos WT não resultou em nascimento. Tal infertilidade associou-se à falha na ovulação, acúmulo de folículos secundários ( $251 \pm 36$  vs.  $54 \pm 12$  folículos) e bloqueio da progressão meiótica quando do cultivo *in vitro*. Oócitos *Mfn1*-null também apresentaram menor diâmetro ( $57,8 \pm 0,73$  vs.  $85,7 \pm 0,49$   $\mu$ m) e menor nível de mtDNA ( $39.263 \pm 2.878$  vs.  $198.164 \pm 18.611$  cópias), ATP ( $0,03 \pm 0,016$  vs.  $0,46 \pm 0,076$  pmol) e potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ m;  $0,71 \pm 0,03$  vs.  $1,00 \pm 0,03$  u.a.). A menor expressão nos oócitos *Mfn1*-null da proteína Alix, associada com vesículas extracelulares, sugere uma deficiência na secreção de fatores parácrinos derivados do oócito. Já os oócitos *Mfn2*-null, apesar do menor diâmetro ( $78,6 \pm 0,68$   $\mu$ m) e menor taxa de ovulação ( $10,3 \pm 4,29$  vs.  $23,0 \pm 3,82$  oócitos), não foram afetados quanto ao nível de mtDNA, ATP e  $\Delta\Psi$ m. Como resultado, o número de nascimentos não diferiu entre oócitos *Mfn2*-null e WT ( $6,3 \pm 0,76$  vs.  $6,1 \pm 1,19$

nascidos/cópula). Ademais, a progênie oriunda de oócitos Mfn2-null apresentou crescimento normal, apesar de maiores níveis de glicose pré (135±3,9 vs. 115±3,5 mg/dl) e pós-jejum (172±7,2 vs. 137±4,1 mg/dl). Surpreendentemente, oócitos Mfn-dm apresentaram defeito menos severo quando comparados com oócitos WT, caracterizado por diâmetro ligeiramente menor (76,7±0,79 µm), nível intermediário de mtDNA (104.215±12.657 cópias) e  $\Delta\Psi_m$  (0,81±0,020 u.a.), e nível normal de ATP, ADP e ATP/ADP. No entanto, os oócitos Mfn-dm apresentaram mitocôndrias em menor tamanho e quantidade, as quais se agregaram ao retículo endoplasmático. Apesar de ovulados (10,3±1,48 oócitos), os oócitos Mfn-dm também apresentaram fuso meiótico desorganizado e incapacidade de desenvolvimento a termo. No que se refere a herança mitocondrial, o nível de mtDNA NZB diminuiu em oócitos WT (-10,1±1,25) e Mfn1-null (-10,3±1,58) em comparação com as fêmeas doadoras, sugerindo uma seleção contra o mtDNA mutante. Contudo, tal seleção foi menor nos oócitos Mfn2-null (-3,0±1,50) e Mfn-dm (-4,4±1,21). Em suma, este trabalho evidencia que o Mfn1 é essencial para promover oócitos com competência de desenvolvimento, enquanto que o Mfn2 é necessário para a eliminação de mtDNA mutante no oócito. Esses achados dão suporte ao papel-chave das mitofusinas na modulação mitocondrial visando o atendimento às exigências dos oócitos e a prevenção da herança de mtDNA mutantes.

Financiamento: FAPESP (2012/50231-6)

**Palavras-chave:** Oócito; mitocôndria; mitofusina

SBTE 144 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Número de submissão 1567

#### **Rutina pode substituir a utilização de outros antioxidantes no meio de cultivo para folículos secundários ovinos isolados**

Thae Lanne Barbosa Gama Lins; Agnes Yasmin Pitombeira Cavalcante; Jámile Maiara da Silva Santos; Vanuzia Gonçalves Menezes; Vanessa Raquel Pinto de Barros; Ricássio de Sousa Barberino; Maria Éllida Sousa Bezerra; Taís Jobard Silva Macedo; Maria Helena Tavares de Matos

UNIVASF, Petrolina, PE, Brasil.

A rutina atua como antioxidante em diferentes tipos celulares (KAUR e MUTHURAMAN, Life Sciences, 150, 89-94, 2016). Entretanto, ainda não há informações sobre o efeito antioxidante da rutina no cultivo *in vitro* de folículos secundários ovinos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da rutina como único suplemento antioxidante, adicionado ao meio de base, sobre o cultivo *in vitro* de folículos secundários isolados de ovários ovinos. Folículos secundários (n= 55-61) ovinos (n= 90), com diâmetro em torno de 200 µm, foram cultivados individualmente em gotas de 100 µL, durante 12 dias, à 39°C, em  $\alpha$ -Meio Essencial Mínimo ( $\alpha$ -MEM) suplementado com 3,0 mg/mL BSA, 10 ng/mL insulina, 2 mM glutamina e 2 mM hipoxantina (meio livre de antioxidantes, denominado de  $\alpha$ -MEM-) ou neste mesmo meio adicionado ainda de 5,5 µg/mL transferrina, 5,0 ng/mL selênio e 50 µg/mL ácido ascórbico ( $\alpha$ -MEM+). Para avaliar o efeito antioxidante da rutina, aos diferentes meios de base, com ou sem antioxidantes ( $\alpha$ -MEM- ou  $\alpha$ -MEM+), foram adicionadas diferentes concentrações de rutina (0,1; 1 ou 10 µg). Todos os produtos químicos foram adquiridos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA). A cada 6 dias, fez-se avaliação dos folículos normais, formação de antro e diâmetro folicular. Ao final do cultivo, determinou-se a percentagem de oócitos totalmente crescidos (oócitos >110 µm). Nos tratamentos que obtiveram os melhores resultados de morfologia, foram avaliados a viabilidade folicular, através dos marcadores fluorescentes calceína-AM e etídio-homodímero 1, e os níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (EROs), glutatona (GSH) e mitocôndrias ativas. As taxas de folículos normais, formação de antro, viabilidade e oócitos >110 µm foram comparadas pelo Qui-quadrado. Os dados de diâmetro folicular, taxa de crescimento, níveis de ROS, GSH e mitocôndrias ativas foram submetidos ao Shapiro-Wilk seguido do teste de Kruskal-Wallis; os dados de diâmetro e taxa de crescimento foram comparados pelo Student Newman Keuls (P<0,05). Os resultados mostraram que após 12 dias de cultivo, os meios  $\alpha$ -MEM+ sozinho (74,5%) e  $\alpha$ -MEM- acrescido de 0,1 µg de rutina (81,6%) apresentaram maiores porcentagens de folículos normais (p<0,05), quando comparados aos demais tratamentos (56,5%). Não houve diferenças (p>0,05) no diâmetro e na taxa de crescimento. Além disso,  $\alpha$ -MEM+ sozinho e  $\alpha$ -MEM- acrescido de 0,1 µg de rutina apresentaram porcentagem de viabilidade folicular, formação de antro, oócitos totalmente crescidos, níveis de EROs e mitocôndrias ativas semelhantes (p>0,05). No entanto, o tratamento  $\alpha$ -MEM- adicionado de 0,1 µg de rutina (157 pixels/oócito) apresentou níveis superiores de GSH quando comparado ao  $\alpha$ -MEM+ (110 pixels/oócito). Em conclusão, na concentração de 0,1 µg, a rutina pode ser utilizada como o único antioxidante presente no meio de base para o cultivo *in vitro* de folículos secundários ovinos, mantendo a viabilidade folicular e aumentando os níveis de GSH.

**Palavras-chave:** Oócito; antioxidante; GSH

SBTE 145 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Número de submissão 1612

#### **Lípídeos oocitários durante a foliculogênese**

Kelly Annes<sup>1</sup>; Diana Pedroso Caetano<sup>2</sup>; Diego Borba Muller<sup>2</sup>; Roniele Santana Valente<sup>2</sup>; Jorge Abrão P. Vilela<sup>2</sup>; Jeferson Bueno Fripp<sup>2</sup>; Marcella Pecora Milazzotto<sup>1</sup>; Fernando Silveira Mesquita<sup>2</sup>; Mateus José Sudano<sup>2</sup>

1.Universidade Federal do ABC, Santo André, SP, Brasil; 2.Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, RS, Brasil.

A maturação do oócito está correlacionada com o crescimento folicular, em que o tamanho do folículo tem efeito na capacidade de desenvolvimento embrionário. Oócitos de mamíferos possuem quantidades diferentes de lipídeos, o que sugere que essa molécula tem relação direta com a ovulação, podendo contribuir para a competência do desenvolvimento do oócito e consequentemente do embrião. O objetivo desse estudo foi acompanhar a flutuação lipídica ao longo do desenvolvimento folicular e associar com o nível de transcritos de genes relacionados ao metabolismo lipídico. Para isso, ovários de vacas de abatedouro comercial foram utilizados para recuperar oócitos de folículos de  $\leq 2$  mm ( $n=21$ ), 3-5 mm ( $n=34$ ), 6-8 mm ( $n=19$ ) e  $>8$  mm ( $n=13$ ) de diâmetros, para avaliação de conteúdo lipídico por coloração Sudan Black B e do nível de transcritos de genes associados ao metabolismo lipídico (*ACSL3*, *ELOVL5*, *ELOVL6*, *LXR $\alpha$*  e *CYC-A* – controle endógeno) por PCR em tempo real – qPCR ( $n = 4$ , com 60 oócitos por diâmetro folicular). Os diâmetros dos folículos foram determinados cuidadosamente com o auxílio de um paquímetro. Somente oócitos com citoplasma homogêneo e com mais de três camadas de células do cumulus foram selecionados e desnudados com repetidas pipetagens após tratamento com tripsina. Para a coloração de Sudan Black B, os oócitos foram preparados seguindo protocolo previamente estabelecido. O software ImageJ foi usado para converter as imagens em escala de cinza e determinar, em unidades arbitrárias (UA), a média do conteúdo lipídico por oócito. A investigação relativa dos transcritos foi conduzida no Stratagene Mx3005p (GE) utilizando o GoTaq qPCR Master Mix (Promega), os resultados são apresentados com fold change em relação ao grupo  $\leq 2$ mm. Os dados foram submetidos à ANOVA usando o PROC GLIMMIX do SAS. Os oócitos recuperados de folículos  $>8$  mm apresentaram maior conteúdo lipídico citoplasmático quando comparado com os oócitos oriundos de outros diâmetros ( $8.0 \pm 2,7$  UA.  $P < 0.05$ ). Os demais grupos não apresentaram diferenças entre si no conteúdo lipídico ( $\leq 2$  mm:  $4.8 \pm 0.6$  UA; 3-5 mm:  $4.1 \pm 0.8$  UA e 6-8 mm:  $4.2 \pm 0.6$  UA.  $P > 0.05$ ). O gene *ELOVL6* apresentou abundância relativa reduzida ( $P=0.02$ ) nos grupos 6-8 mm (5.3 x) e  $> 8$ mm (5.6 x) quando comparados com o grupo  $\leq 2$ mm; enquanto a abundância relativa do gene *ELOVL5* estava aumentada ( $P=0.02$ ) no grupo 6-8 mm comparada aos grupos  $\leq 2$  mm (1.6 x) e 3-5 mm (1.3 x). Portanto, i) oócitos de folículos maior que 8mm possuem elevado conteúdo lipídico; ii) o nível de transcritos do gene *ACSL3*, e *LXR $\alpha$*  não foram bons marcadores da flutuação lipídica oocitária durante a foliculogênese; e iii) a diminuição da abundância relativa dos transcritos *ELOVL6* oocitário com o aumento do diâmetro folicular é um indicativo da redução do alongamento de ácidos graxos contendo 12 a 16 carbonos durante a foliculogênese. Assim, o aumento do diâmetro folicular favorece o acúmulo lipídico oocitário e sugere-se que a ativação e alongamento de ácidos graxos contendo 12 a 16 carbonos não sejam predominantes durante a foliculogênese. Agradecimentos: CNPq, FAPERGS e CAPES.

**Palavras-chave:** Lipídeos; foliculogênese; oócito

SBTE 146 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Número de submissão 1613

#### **Dinâmica do fluxo sanguíneo folicular em vacas Nelore submetidas a protocolos de IATF**

João Ricardo Scialante<sup>1</sup>; Mauricio Machaim Franco<sup>2</sup>; Amanda de Castro Gusson<sup>3</sup>; Bianca Damiani Marques Silva<sup>4</sup>

1.Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araçatuba, SP, Brasil; 2.EMBRAPA – Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil; 3.Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, SP, Brasil; 4.EMBRAPA - Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil.

O ultrassom Color-Doppler é uma técnica útil na reprodução por permitir a observação em tempo real do fluxo sanguíneo. O objetivo do trabalho foi caracterizar a variação da perfusão sanguínea folicular em vacas Nelore submetidas a três protocolos de IATF. Foram utilizadas 21 vacas cíclicas, divididas aleatoriamente em três protocolos de IATF num modelo crossover, com intervalo de 30 dias de descanso. O protocolo BED9 constituiu na inserção de um dispositivo intravaginal de primeiro uso de P4 (Sincrogest®, Ourofino, Cravinhos-SP) e aplicação IM de 2mg de benzoato de estradiol (BE, Benzoato HC, Hertape Calier, Juatuba-MG) em D0, retirada da P4 e 150µg IM de D-cloprostenol (PGF2 $\alpha$ , Veteglan®, Hertape Calier, Juatuba-MG) em D8, e 1mg de BE IM em D9; o protocolo BED8 constituiu da inserção de um dispositivo de primeiro uso de P4 e 2mg de BE em D0, retirada da P4, 150µg de PGF2 $\alpha$  e 1mg de BE em D8; e o protocolo CED8 de um dispositivo de primeiro uso de P4 e 2mg de BE em D0, retirada da P4, 150µg de PGF2 $\alpha$  e 1mg de CE em D8. As vacas foram avaliadas com ultrassom Color Doppler (MyLab™30GoldVET, Itália) a cada 24 horas a partir do D4 até o D8 dos protocolos, e após a retirada do implante de P4 as avaliações foram feitas em intervalos de 3 horas, nas três primeiras manipulações, e depois de 6 em 6 horas até ocorrer a ovulação ou um prazo máximo de 90 horas após a retirada do dispositivo. Para a avaliação da vascularização folicular foi adotada uma classificação subjetiva de Grau 1 a 5, a qual considerou a porcentagem de circulação na parede do folículo avaliado. Para a comparação estatística do horário de ovulação e tamanho do folículo pré-ovulatório foi utilizado o teste análise de variância (teste de Tukey), para a taxa de ovulação o teste binomial duas proporções, e para a caracterização da vascularização a análise descritiva. Foi observado diferença ( $P<0,05$ ) no horário de ovulação após a retirada da P4, onde o BED8 ( $64,36\pm10,42$ h) antecipou a ovulação em relação aos outros dois tratamentos (BED9  $74,40\pm3,04$ h e CED8  $72,00\pm6,63$ h,  $P>0,05$ ). O tamanho médio do folículo pré-ovulatório (último horário de avaliação antes de ovular) foi igual nos três protocolos (BED9  $12,53\pm1,29$ mm; BED8  $11,77\pm1,54$ mm; CED8  $12,77\pm1,17$ mm;  $p=0,0708$ ). A taxa de ovulação foi menor no protocolo BED8 (52,38%), e igual em BED9 (80,95%) e CED8 (90,47%) ( $p=0,3778$ ). No início da avaliação vascular (D4) dos protocolos, todas as vacas que chegaram à ovulação apresentaram um folículo em grau 1 com tamanho médio de 5,89mm, e estes ovularam em média 12

horas após atingiram o grau 5 com tamanho médio de 12,25mm. No protocolo BED9 os folículos dominantes obtiveram um crescimento de 0,25mm na passagem de grau 4 para grau 5 entre 48 e 66 horas, no protocolo BED8, na mesma passagem de grau, obtiveram um crescimento de 0,52mm entre 36 e 54 horas e no protocolo CED8, os folículos dominantes obtiveram na mesma passagem de grau um crescimento de 0,66mm entre 42 e 66 horas. A ferramenta Color Doppler permite examinar a vascularização na parede de folículos, tal como predizer a proximidade da ovulação.

**Palavras-chave:** Indutor de ovulação; perfusão sanguínea; *doppler*

SBTE 147 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Número de submissão 1617

**Viabilidade folicular e atividade da SOD em FOPA de fêmeas *Bos taurus* submetidos a diferentes meios e tempos de transporte**

Daniele Missio<sup>1</sup>; Maiara Aline Gonçalves<sup>2</sup>; Antônio Carlos Galarça Guimarães<sup>1</sup>; Francielli Weber Santos<sup>1</sup>; Fábio Gallas Leivas<sup>1</sup>; Daniela dos Santos Brum<sup>1</sup>

1.Unipampa - Universidade Federal do Pampa - Campus Uruguaiana, Uruguaiana, RS, Brasil; 2.Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

A manipulação de oócitos incluídos em folículos pré-antrais (MOIFOPA) vem sendo foco de muitos estudos em reprodução assistida, apresentando resultados satisfatórios no cultivo *in vitro* de folículos pré antrais (FOPA), entretanto, a preservação da viabilidade folicular durante o transporte dos ovários até o laboratório é um ponto importante, cujos protocolos não estão completamente estabelecidos. Sabe-se que o acúmulo de espécies reativas ao oxigênio (ROS) geradas durante o transporte e resfriamento do tecido ovariano pode resultar em significativos danos celulares, sendo o papel da enzima Superóxido Dismutase (SOD) fundamental na neutralização destas ROS. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência de diferentes meios e tempos para o transporte de ovários de fêmeas *Bos taurus* destinados a MOIFOPA, através da avaliação da viabilidade folicular e atividade da SOD. Foram utilizados ovários de fêmeas *Bos taurus* (seis pares), sendo a camada cortical fragmentada e submetida a diferentes tratamentos (Fatorial 3x2), conforme o meio ou tempo utilizado para o transporte simulado à 4°C, sendo estes: Controle (processamento imediato), T1 (TCM 199 por 6 h); T2 (TCM 199 por 24 h); T3 (Solução salina a 0,9% por 6 h); T4 (Solução salina a 0,9% por 24 h), T5 (PBS por 6 h) e T6 (PBS por 24 h). Para avaliação histológica os fragmentos foram fixados em Carnoy e corados com PAS-hematoxilina, sendo a seguir os FOPA avaliados sob microscopia óptica quanto a sua morfologia e viabilidade folicular conforme Celestino *et al.* (Celestino JJH, Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.59, 591-599,2007). A determinação da SOD tecidual foi realizada pelo método descrito por Misra e Fridovich (Misra HP, The Journal of Biological Chemistry, v.247, p.3170-3175, 1972), baseado na sua capacidade de inibir a auto-oxidação da adrenalina em adrenocromo. A análise estatística empregada foi utilizada ANOVA de duas vias. A avaliação da viabilidade folicular constatou que folículos do T1 (51,7%) não diferiram do grupo controle (66,7; P<0,05), enquanto os tratamentos T2 (33,3%), T3(20%), T4(16,7%), T5(36,7%) e T6 (21,7%) reduziram a porcentagem de FOPA viáveis (P<0,05). A determinação da SOD revelou uma menor atividade (P<0,05) da enzima no tecido cortical ovariano mantido em T2 (7,59UI/mg) e T4 (6,36UI/mg), quando comparado ao controle (12,87UI/mg), T1 (11,46UI/mg), T3 (11,13UI/mg), T5(10,19UI/mg) e T6 (9,35UI/mg). Assim, sugere-se que FOPA bovinos conservados *in situ* a 4°C em solução salina a 0,9% e PBS não são eficientes na preservação folicular, bem como, a conservação por mais de 6h em meio TCM 199. O meio TCM 199 a 4°C por até 6h, pode ser eficientemente empregado em protocolos de transporte de FOPA *in situ* de fêmeas bovinas *Bos taurus*.

**Palavras-chave:** Folículos pré-antrais; *Bos taurus*; superóxido dismutase

SBTE 148 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Número de submissão 1625

**Varição na resposta à Kisspeptina para avaliação de precocidade em novilhas**

Guilherme Paula Nogueira<sup>1</sup>; Ana Flavia Paiva<sup>1</sup>; Devani Mariano Pinheiro<sup>1</sup>; Tiago Arriero Rodrigues<sup>2</sup>; Marcos Maioli<sup>1</sup>

1.FMVPA - Unesp, Araçatuba, SP, Brasil; 2.Fazenda Santa Encarnação, Bataguçu, MS, Brasil.

O estudo objetivou comparar a concentração de hormônio luteinizante (LH) plasmático, em resposta à kisspeptina exógena, em novilhas Nelore da desmama até o início da estação de monta, para avaliar a maturação sexual do Sistema Nervoso Central. As hipóteses testadas foram de que a secreção de LH das novilhas aumenta com a idade e que em uma mesma idade, novilhas com maior peso a desmama secretam mais LH em resposta à kisspeptina que as desmamadas mais leves. O experimento foi realizado na Fazenda Santa Encarnação, localizada em Bataguassu-MS. À desmama de 184 bezerras Nelore foram segregadas as 25 mais pesadas e as 25 mais leves do grupo (aumentando a variabilidade entre os animais). As 50 novilhas foram desafiadas mensalmente com 10 µg/kg (IM) de kisspeptina recombinante bovina (American Peptides; diluída em solução salina) desde a desmama (oito meses) aos 17 meses, e após 20 minutos da aplicação do fármaco, foi realizada a colheita de sangue. Aos 16 meses as novilhas foram expostas à touros (25:1) e 30 dias após o final da estação de monta (60 dias) a taxa de prenhez será avaliada. A quantificação de LH foi feita por Elisa competitivo, no Laboratório de Endocrinologia da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP-Araçatuba. Por meio de RM-ANOVA foi possível observar que a secreção de LH das novilhas em resposta



à kisspeptina aumentou em função da idade. A idade em meses onde a concentração de LH atingiu o máximo variou entre os grupos sendo aos 14 meses nas pesadas e aos 15 meses nas leves. Neste mês o grupo leve secretou em média 7,7 ng/ml enquanto que a concentração média dos animais pesados foi de 5,1 ng/ml. Foi possível observar que após este aumento aos 14 ou 15 meses a secreção de LH em resposta à kisspeptina diminuiu. Houve efeito do tempo ( $p = 0,0001$ ) e tendência de interação tempo x peso ( $p = 0,0780$ ) mas o peso dos animais ( $p = 0,3853$ ) não interferiu na concentração de LH. Foi possível concluir que houve um aumento em resposta à kisspeptina exógena de acordo com o tempo. A partir dos resultados do diagnóstico de gestação, teremos uma ideia se será possível segregar antecipadamente novilhas com potencial para precocidade a partir da concentração de LH em resposta à kisspeptina. Acreditamos que a diminuição na resposta à kisspeptina possa ser consequência da primeira ovulação, pretendemos quantificar a progesterona nas amostras para testar essa hipótese.

**Palavras-chave:** Puberdade; maturação sexual; Nelore

SBTE 149 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Número de submissão 1629

**Níveis de insulina afeta a sobrevivência e o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos cultivados *in situ* na presença da proteína morfogenética óssea 15 e/ou do fator de crescimento e diferenciação 9**

Deysi Juana Dipaz Berrocal<sup>1</sup>; Johanna Leiva Revilla<sup>1</sup>; Naiza Arcangela Ribeiro de Sá<sup>1</sup>; Maria Helena Tavares de Matos<sup>2</sup>; Juliana Jales de Hollanda Celestino<sup>3</sup>; Benner Geraldo Alves<sup>1</sup>; Kele Amaral Alves<sup>1</sup>; José Ricardo Figueiredo<sup>1</sup>

1.Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil; 2.Núcleo de Biotecnologia Aplicada ao Desenvolvimento de Folículos Ovarianos, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, PE, Brasil; 3.Instituto de Ciências da Saúde, Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Acarape, CE, Brasil.

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da proteína morfogenética óssea 15 (BMP-15) e do fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF-9) sobre a sobrevivência e o desenvolvimento de folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro* por 7 dias, quando a insulina foi adicionada em duas diferentes concentrações (baixa e alta). Para tanto, de cada par ovariano foram obtidos fragmentos, dos quais um foi imediatamente fixado, constituindo o controle-fresco (não cultivado), e os demais fragmentos foram cultivados por 1 ou 7 dias em a-Meio Essencial Mínimo (a-MEM) sozinho (controle cultivado) ou suplementado com 10 ng/mL (baixa) ou 10 µg/mL (alta) de insulina sozinha, ou ainda suplementado com 100 ng/mL de BMP-15 e/ou 200 ng/mL de GDF-9. Os fragmentos de tecido ovariano não cultivado e cultivado foram processados para Histologia Clássica, sendo os folículos classificados quanto à sobrevivência (normais ou degenerados) e quanto ao desenvolvimento (primordiais, transição, primários e secundários) folicular. Os dados foram analisados pelo teste de Qui-quadrado ( $P < 0,05$ ). Os resultados mostraram que após 7 dias de cultivo, todos os tratamentos reduziram significativamente a percentagem de folículos normais quando comparados ao controle-fresco (87,37%). Em relação ao meio suplementado com baixa concentração de insulina (10 ng/mL), a percentagem de folículos normais foi equivalente a ele somente quando também adicionado o GDF-9 sozinho, observando percentagens significativamente inferiores nos demais tratamentos. Já quando comparado ao meio com alta concentração de insulina (10 µg/mL), houve um efeito da adição dos fatores de crescimento de forma isolada e em associação, uma vez que esses tratamentos apresentaram percentuais significativamente superiores de folículos normais em relação ao meio só com insulina alta. Ao comparar os tratamentos na suplementação de insulina baixa com a alta após 7 dias de cultivo, embora o meio de base com insulina baixa tenha apresentado percentuais significativamente superiores de folículos normais do que com a insulina alta, o inverso aconteceu nesse meio quando a BMP-15 foi adicionada sozinha ou em associação com o GDF-9. Após 1 dia de cultivo, em todos tratamentos, exceto no meio com insulina alta sozinha, a proporção de folículos primordiais foi reduzida significativamente em relação ao controle-fresco, junto com um concomitante aumento na proporção de folículos em desenvolvimento. Aumento significativo na percentagem de folículos secundários do dia 1 para o dia 7 foi observado nos tratamentos de insulina baixa sozinha ou associada ao GDF-9, e na insulina alta na presença da BMP-15 sozinha ou em associação ao GDF-9. Diante do exposto, pode-se concluir que a concentração de insulina afeta os efeitos da BMP-15 e do GDF-9 sobre a sobrevivência e o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos, sendo isso especialmente evidente com a BMP-15, a qual apresentou melhores efeitos na presença de alta concentração (10 µg/mL) de insulina.

**Palavras-chave:** Cabra, folículos pré-antrais; cultivo *in vitro*; fatores de crescimento oocitário, insulina

SBTE 150 Foliculogênese, oogênese e ovulação

Número de submissão 1639

**Retenção da meiose e alteração na configuração da cromatina de ovócitos bovinos submetidos à pré-maturação com Cilostamida e Peptídeo Natriurético do tipo C (NPPC)**

Felippe Manoel Costa Caixeta<sup>1</sup>; Venâncio Augusto Oliveira Silva<sup>2</sup>; Ana Luiza Silva Guimarães<sup>1</sup>; Ivo Pivato<sup>3</sup>; Margot Alves Nunes Dode<sup>1</sup>

1.Universidade de Brasília - UNB, Brasília, DF, Brasil; 2.Faculdade ICESP, Brasília, DF, Brasil; 3.EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologias, Brasília, DF, Brasil.

A remoção do ovócito do ambiente folicular induz a retomada imediata e prematura da meiose independente do grau de competência do ovócito. Sistemas de Pré-Maturação (PM) que atrasam ou previnem a maturação espontânea e, simultaneamente promovem mudanças citoplasmáticas, são alternativas para aumentar a competência dos ovócitos. A aquisição da competência tem sido associada às mudanças na configuração da cromatina, as quais podem ser consideradas como marcadores morfológicos de competência. Este trabalho teve por objetivo avaliar a capacidade de dois retentores de meiose, a cilostamida e o peptídeo natriurético do tipo C (NPPC), de reter a meiose e de causar alteração da configuração de cromatina de ovócitos bovinos submetidos à PM por 6 h. Foram utilizados ovócitos grau 1 e 2 aspirados de folículos de 3-8mm oriundos de ovários de abatedouro. No primeiro experimento (n=542), foram comparados ovócitos maturados por 20 h (MIV) e ovócitos PM por 6 h com 5  $\mu$ M de cilostamida e, posteriormente MIV por 20 h. Os mesmos tratamentos foram realizados no segundo experimento (n=545), em que a cilostamida foi substituída pelo NPPC (100nM). Foram realizadas 6 replicas para cada experimento. Todos os ovócitos foram fixados, corados com lacmóide e avaliados quanto ao estágio da meiose antes (0h) e após (6h) a PM e às 0, 6, 14 e 20 h de MIV. Ovócitos em estágio de Vesícula Germinativa (VG) foram classificados em VG0, VG1, VG2 e VG3 (Lodde et al.; Mol Reprod Dev 74:740–749, 2007). Os resultados foram analisados pelo teste de Qui- quadrado ( $P \leq 0,05$ ). Após 6 h de PM com Cilostamida a percentagem de ovócitos em VG (87,3%) foi semelhante ( $P > 0,05$ ) às 0 h (95,2%). Apesar de não haver diferença na taxa de ovócitos em metáfase II às 20 h entre os grupos PM (83,3%) e MIV (88,4%), foi observado uma aceleração na maturação no grupo PM, que às 14 h já apresentava ovócitos em MII (28,8 %). Não foi observada mudança na cromatina durante a PM, sendo a percentagem de ovócitos em VG0, VG1, VG2 e VG3 de 7,4%; 18,5%; 38,3% e 35,8% antes da PM e 9,5%; 15,9%; 25,4% e 49,2% após a PM. Resultados semelhantes foram observados quando a PM foi realizada na presença de NPPC. A maioria dos ovócitos estava retida em VG após a PM (82,9%). A taxa de ovócitos em MII também foi semelhante para o PM (82,5%) e MIV (82,9%) e uma aceleração na maturação também foi observada às 14 horas de MIV, quando os ovócitos retidos foram comparados aos do grupo controle. A retenção com NPPC também não foi capaz de alterar a configuração da cromatina sendo a percentagem de ovócitos em VG0, VG1, VG2 e VG3 antes da PM foi de 2,1%; 29,5%; 40% e 28,4% e após a PM de 1,3%; 21,8%; 37,2% e 39,7%. Conclui-se que a PM com Cilostamida e NPPC por 6 horas foi capaz de inibir a maturação nuclear espontânea, porém não alterou a configuração da cromatina, não promovendo nenhuma melhoria na competência de ovócitos.

**Palavras-chave:** Competência ovocitária; vesícula germinativa; retenção meiótica

SBTE 151 Foliculogênese, Oogênese e Ovulação

Número de submissão 1650

**Desempenho, conforto térmico e fisiologia ovariana de novilhas canchim (*bos indicus* vs *bos taurus*) mantidas em áreas de pastagem com ou sem a presença de arborização – resultados preliminares**

Amanda Prudêncio Lemes<sup>1</sup>; Lindsay Unno Gimenes<sup>1</sup>; Sergio N. Esteves<sup>2</sup>; Andre Faria Pedroso<sup>2</sup>; Jose Ricardo Macedo Pezzopane<sup>2</sup>; Cintia Righetti Marcondes<sup>2</sup>; Jessica Helen Guilhardi<sup>3</sup>; Ana Beatriz Bossois Moura<sup>4</sup>; Messy Hanneer de Andrade Pantoja<sup>5</sup>; Alexandre Rossetto Garcia<sup>2</sup>

1.UNESP, São Carlos, SP, Brasil; 2.EMBRAPA, São Carlos, SP, Brasil; 3.FATEC, Taquaritinga, SP, Brasil; 4.UFF, Rio De Janeiro, RJ, Brasil; 5.UFPA, Belem, PA, Brasil

O objetivo deste estudo foi verificar a influência do sombreamento natural em sistemas de pastagem sobre o conforto térmico e a fisiologia ovariana de novilhas bovinas da raça Canchim. Para isso, foram utilizadas 64 novilhas previamente selecionadas e reconhecidamente pré-púberes, em duas repetições de ano (Ano 1: 32 novilhas com 16,0 meses; 211,0 kg; Ano 2: 32 novilhas com 15,6 meses; 239,4 kg), manejadas em dois sistemas de pastejo rotacionado intensivo: 1) com presença de arborização (PRA; árvores de eucalipto em um espaçamento de 15 x 2m); 2) sem presença de arborização (PR), na estação experimental da Fazenda Canchim, da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP. As avaliações por US foram realizadas em um intervalo de 7 a 10 dias (Ano 1: Janeiro a Maio de 2015; Ano 2: Dezembro de 2015 a Maio de 2016). Em cada avaliação, foram mensurados, o diâmetro do maior folículo (MF) e do segundo maior folículo (SMF) e a presença de corpo lúteo para determinar a idade a primeira ovulação em meses (IPO). Concomitantemente, foram mensuradas a temperatura retal (TR) e a frequência respiratória (FR) de modo a possibilitar o cálculo do índice de conforto de Benezra (ICB). Pesagens para determinação do ganho médio diário (GMD; kg) foram realizadas mensalmente. Para a análise estatística das variáveis contínuas e respectivas correlações utilizou-se o PROC GLIMMIX e PROC CORR do SAS®, foram considerados no modelo o efeito de tratamento, ano e as respectivas interações. Os resultados foram apresentados na forma de média dos quadrados mínimos  $\pm$  EP, sendo significativos valores de  $P < 0,05$ . Considerando que a medida de ICB que representa o conforto térmico animal é aquela que mais se aproxima de 2,0 (Benezra, 1954), novilhas mantidas em PRA estavam em maior conforto térmico ( $2,99 \pm 0,02$ ) que as mantidas em PR ( $3,05 \pm 0,02$ ) ( $P = 0,02$ ). Adicionalmente, houve correlação negativa e significativa entre GMD e a IPO ( $r = -0,36$ ;  $P < 0,015$ ) e interação entre as variáveis ano e peso a primeira ovulação, sendo que novilhas mantidas em PRA, tiveram peso superior ao das que estavam em PR, no momento da primeira ovulação ( $271,4 \pm 7,2$ ;  $249,2 \pm 7,9$  kg;  $P = 0,03$ , respectivamente), no ano 2. Contudo, novilhas em PRA não diferiram em diâmetro do MF ( $9,56 \pm 0,112$ ;  $9,58 \pm 0,109$  mm;  $P = 0,89$ ) e diâmetro do SMF ( $6,57 \pm 0,14$ ;  $6,87 \pm 0,14$  mm;  $P = 0,10$ ), tampouco na IPO ( $18,5 \pm 0,27$ ;  $18,6 \pm 0,29$  mo;  $P = 0,91$ ) daquelas em PR, respectivamente. Nas condições desse estudo, o sombreamento melhorou o conforto térmico animal, determinou aparente melhora no peso à

ovulação, entretanto não impactou diretamente as variáveis ovarianas estudadas, conclui-se portanto que esses benefícios embora evidentes, não foram capazes de alterar a fisiologia ovariana nos animais estudados.

Agradecimentos: Embrapa (Rede Biotec, Rede Pecus, Adapt+), CAPES e CNPq.

**Palavras-chave:** Conforto térmico; desempenho; ovário

SBTE 152 Fisiologia da reprodução do macho e tecnologia do sêmen

Número de submissão 1460

#### **Qualidade do sêmen congelado de garanhões suplementados com nutracêutico**

Mariane Leão Freitas<sup>1</sup>; Cristiano Silva Bouéres<sup>1</sup>; Tatiana Almeida Pignataro<sup>1</sup>; Francisco José Gonçalves de Oliveira<sup>1</sup>; Marco Antônio de Oliveira Viu<sup>2</sup>; Ivo Pivato<sup>1</sup>; Andrielle Mendes Cunha<sup>1</sup>; Rodrigo Arruda de Oliveira<sup>1</sup>

1.Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil; 2.Universidade Federal De Goiás, Jataí, GO, Brasil.

O efeito da suplementação oral dos principais antioxidantes e ácidos graxos envolvidos na espermatogênese (vitamina E, selênio, L-carnitina, ômega-3 e ômega-6) foi avaliado na qualidade do sêmen congelado de garanhões (n=8). Os animais, cuja qualidade seminal foi avaliada previamente, foram divididos em Grupo I (n = 4) e Grupo II (n = 4) para o experimento, com 30 semanas de duração. O Grupo I recebeu o nutracêutico Reproductive® Garanhões JCR (Vetnil, Louveira / SP, Brasil) por 60 dias consecutivos (tratamento) e o Grupo II recebeu uma solução placebo no mesmo período (controle), após esse período foi avaliada a qualidade do sêmen criopreservado. Os animais passaram por um período de 60 dias de repouso sexual, os grupos foram invertidos e novas avaliações do sêmen foram realizadas. Após o congelamento e descongelamento do sêmen, as amostras do sêmen foram avaliadas de acordo com a cinética espermática e a integridade da membrana acrossomal e plasmática. Realizou-se a análise não paramétrica utilizando-se o teste U de Mann & Whitney, através do procedimento NPAR1WAY do Statistical Analysis System (SAS). Os valores estão apresentados em média  $\pm$  desvio padrão. Quando os animais receberam a suplementação foi observado um valor superior ( $P < 0.05$ ) da motilidade progressiva ( $7,28 \pm 4,32$  versus  $5,25 \pm 2,86$ ), integridade de membrana plasmática ( $43,64 \pm 7,53$  versus  $39,19 \pm 5,15$ ) e integridade de membrana acrossomal ( $40,73 \pm 7,78$  versus  $35,73 \pm 4,09$ ). Nossos resultados demonstraram um efeito positivo e possivelmente sinérgico dos antioxidantes L-carnitina e selênio na cinética espermática. Do mesmo modo, o aumento da integridade da membrana plasmática e acrossomal pode ter ocorrido devido as concentrações mais elevadas dos ácidos graxos poliinsaturados, em conjunto com a prevenção do excesso de peroxidação lipídica por antioxidantes. Dessa forma, a suplementação com nutracêutico que contém ácidos graxos e antioxidantes melhorou a qualidade do sêmen congelado de garanhões.

**Palavras-chave:** Espermatogênese; inseminação artificial; antioxidantes

SBTE 153 Fisiologia da reprodução do macho e tecnologia do sêmen

Número de submissão 1461

#### **Imunodeteção da enzima conversora de angiotensina no sêmen de touros nelore**

Ricardo Garcia de Almeida<sup>1</sup>; Fábio José Carvalho Faria<sup>1</sup>; Juliana Correa Borges<sup>2</sup>; Breno Fernandes Barreto Sampaio<sup>1</sup>; Marcelo Diniz dos Santos<sup>3</sup>; Carlos Antônio de Carvalho Fernandes<sup>4</sup>; Deiler Sampaio Costa<sup>1</sup>

1.Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil; 2.EMBRAPA CPAP, Cuabá, MS, Brasil; 3.Unic, Cuiabá, MT, Brasil; 4.UNIFENAS, Alfenas, MG, Brasil.

A forma testicular da enzima conversora de angiotensina (tACE) é uma ectoenzima ancorada à região periacrossomal dos espermatozoides. Esta enzima é capaz de liberar a porção extracelular de proteínas ancoradas por glicosilfosfatidilinositol (GPI) que são essenciais para fertilização do ovócito. Objetivou-se com esta pesquisa caracterizar a tACE antes e após o congelamento do sêmen de touros Nelore. Utilizaram-se amostras de sêmen de 10 touros sexualmente maduros. Após a coleta com eletroejaculador, metade do ejaculado foi congelada e a outra metade foi processada in natura. Imediatamente após a coleta ou descongelamento, o sêmen foi centrifugado duas vezes e o pellet ressuspensionado com TALPH. As amostras foram padronizadas numa concentração de  $100 \times 10^6$  espermatozoides em  $100 \mu\text{L}$  e submetidas a imunoblot SDS-PAGE e imunocitoquímica utilizando-se o anticorpo anti-ACE (Costa e Thundathil, 2012. Anim. Reprod. Sci. 133: 35– 42). O anticorpo monoclonal utilizado foi capaz de reconhecer uma única banda de proteínas com 100 kDa na suspensão de espermatozoides dos dez touros Nelore, bem como no plasma seminal destes mesmos animais. As bandas de proteína foram muito bem identificadas, demonstrando claramente a presença do ACE na célula espermática e no plasma seminal destes animais. A imunodeteção da ACE no espermatozoide foi caracterizada pela coloração intensa observada sobre toda a região periacrossomal, demonstrando a localização desta enzima no espermatozoide dos animais trabalhados. Após o descongelamento, percebeu-se claramente que o processo de criopreservação reduziu a intensidade das bandas de proteínas, sugerindo que houve perda desta enzima durante o protocolo utilizado. Corroborando com os dados do western blot, percebeu-se também que o processo de criopreservação reduziu a intensidade do corante fluorescente na técnica de imunocitoquímica, sugerindo que há perda desta enzima durante o resfriamento/congelamento. Entretanto, não houve alteração na localização da enzima com o protocolo de congelamento utilizado. Conclui-se que o processo de criopreservação reduz a quantidade da tACE nos espermatozoides de touros Nelore.

Agradecimento: CNPq e FUNDECT

**Palavras-chave:** Enzima; sêmen; criopreservação

SBTE 154 Fisiologia da reprodução do macho e tecnologia do sêmen

Número de submissão 1463

**Avaliação da integridade da membrana plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial de espermatozoides de ovinos suplementados com selênio**

Carla Fredrichsen Moya-Araujo<sup>1</sup>; Marcelo Piagentini<sup>2</sup>; Danilo Cunha da Silva<sup>2</sup>; Camila Paula Freitas-Dell'Aqua<sup>2</sup>; Gustavo Henrique Marques Araujo<sup>3</sup>; Eunice Oba<sup>2</sup>

1.Unicentro, Guarapuava, PR, Brasil; 2.FMVZ/UNESP, Botucatu, SP, Brasil; 3.UFG, Jataí, GO, Brasil.

O presente estudo teve por objetivo avaliar os efeitos da suplementação com diferentes concentrações de selênio (Se) sobre a integridade das membranas plasmática e acrossomal, bem como, o potencial mitocondrial de espermatozoides de ovinos. Foram utilizados 30 ovinos, idades variando de 18 a 24 meses, manejados em baias, em sistema intensivo, os quais foram divididos em cinco grupos experimentais, sendo grupo controle (GC; n=5) com suplementação de mistura mineral sem adição de Se, G1 (n=5) mesma mistura mineral contendo 5mg de Se (selenito de sódio)/Kg de mistura, G2 (n=5) contendo 10 mg de Se/Kg, G3 (n=5) contendo 15 mg de Se/Kg de mistura mineral e G4 (n=5) contendo 20 mg de Se/Kg de mistura mineral. Para cada grupo houve um período de adaptação de 14 dias, sendo que os animais foram tratados por 56 dias. As amostras de sêmen foram colhidas por meio de eletroejaculação. As análises foram realizadas por citometria de fluxo, BD LSR II (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) equipado com lasers: azul 488nm, 100mW e vermelho 640nm, 40mW. Os dados foram avaliados por programa do mesmo fabricante BD FACSDiva™ software v6.1. Para a avaliação de integridade de membrana plasmática e acrossomal utilizou-se a associação das sondas iodeto de propídio (IP; P4170, Sigma), FITC-PSA (L0770, Sigma) e Hoescht 3342 (H342; 14533, Sigma). Assim, numa amostra de 200µL de sêmen diluído em TALP na concentração de 10x10<sup>6</sup> espermatozoides/mL foi adicionado 5µL de H342 (7µM), 5µL de IP (1,5µM) e 0,5 µL de FITC-PSA (2ng), homogeneizado e incubado por 15 minutos a 37°C ao abrigo da luz. Para a avaliação do potencial mitocondrial foram utilizadas as sondas JC-1 (T3168, Molecular Probes) e H342. Assim, numa amostra de 200µL de sêmen diluído e mesma concentração foi adicionado 5µL de H342 e 10µL de JC-1 (1,5µM), homogeneizada e incubada por 15 minutos a 37°C ao abrigo da luz. O delineamento experimental foi elaborado através de um quadrado latino 5 x 5, ou seja, cinco tratamentos e cinco períodos experimentais. Os dados foram avaliados utilizando o processo GLM descrito no SAS (2009). As diferenças entre médias foram verificadas com a aplicação do teste de Tukey a 5% de probabilidade. A integridade das membranas plasmática e acrossomal e o potencial mitocondrial não apresentaram diferença significativa em relação ao tratamento. Não foi observada influência do tratamento em relação às variáveis analisadas, apesar de Meseguer et al. (Drug Metab Lett, v.1, p.121–126, 2007) descreverem que o Se possui efeito antioxidante atuando principalmente sobre a atividade das mitocôndrias presentes na peça intermediária dos espermatozoides. Frente aos resultados apresentados nesse estudo, a suplementação de selênio (nas concentrações testadas) não apresentou efeito benéfico sobre a integridade da membrana plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial dos espermatozoides ovinos. Suporte financeiro: FAPESP (no. 2011/51503-7).

**Palavras-chave:** Sêmen; suplementação mineral; pequeno ruminante

SBTE 155 Fisiologia da reprodução do macho e tecnologia do sêmen

Número de submissão 1464

**Influência de diferentes técnicas de mini-percoll na capacitação espermática e integridade de membrana plasmática de sêmen descongelado de carneiros**

Carolina Cerqueira Sarmiento Olivares<sup>1</sup>; Vivian Angélico Pereira Alfradique<sup>1</sup>; Joanna Maria Gonçalves de Souza Fabjan<sup>1</sup>; Jeferson Ferreira da Fonseca<sup>2</sup>; Helena Fabiana Reis de Almeida Saraiva<sup>1</sup>; Luana Rangel Côrtes<sup>1</sup>; Lendel Correia da Costa<sup>1</sup>; Felipe Zandonadi Brandao<sup>1</sup>

1.Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil; 2.EMBRAPA, Coronel Pacheco, MG, Brasil.

O sucesso da FIV e posterior desenvolvimento embrionário são diretamente relacionados com a qualidade seminal e seleção espermática. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes forças e tempo de centrifugação de diferentes técnicas de seleção espermática de mini-Percoll (MP) no status da capacitação espermática e integridade da membrana plasmática (MP) de sêmen descongelado de carneiros. Foram utilizadas 10 palhetas de sêmen comercial congelado de diferentes carneiros da raça Santa Inês, com idade entre 2-5 anos. Na avaliação pós descongelamento (PD), a integridade de MP foi analisada pelo CASA por meio do sistema SCA® (Sperm Class Analyzer – Microptic Automatic Diagnostic Systems, Barcelona, Espanha). A técnica de Percoll (Sigma Chemical, St. Louis, USA) tradicional consistiu em utilizar 2 mL de gradiente (90/45%) e centrifugar a uma força de 700 x g por 10 minutos, seguida de outra centrifugação a 200 x g por 5 minutos. As técnicas de MP consistiram em utilizar um volume de 800 µL de gradiente (90/45%) que foram submetidos aos seguintes tempos e forças de centrifugação: I) duas centrifugações de 5000 x g por 5 minutos; II) duas centrifugações de 2500 x g por 5 minutos; III) duas centrifugações de 1250 x g por 5 minutos; IV) 700 x g por 10 minutos, seguidas de outra centrifugação a 200 x g por 5 minutos. No fim dos tratamentos (pós protocolos = 0 h), alíquotas foram retiradas para avaliação da integridade de MP e status da capacitação espermática pela coloração de clortetraciclina (Sigma

Chemical, St. Louis, USA). Posteriormente, as amostras de todos os tratamentos foram incubadas a 37 °C, 1 h, 2 h e 3 h e os mesmos parâmetros foram avaliados. As variáveis foram submetidas às análises de ANOVA ou teste de Kruskal-Wallis dependendo da normalidade, e testes de Tukey e Fisher-LSD ( $P < 0,05$ ). Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos durante a avaliação do status da capacitação espermática e da integridade de MP. A taxa de capacitação foi maior ( $P < 0,05$ ) em 3 h de incubação ( $28,6 \pm 2,5\%$ ) quando comparado com 0 h ( $23,3 \pm 1,7\%$ ) e 1 h ( $23,8 \pm 1,4\%$ ), independente do tratamento utilizado. Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) em relação à integridade de MP entre os tratamentos a 0 h. Independente do tratamento utilizado, as taxas de MP íntegra e lesada, respectivamente, foram semelhantes ( $P > 0,05$ ) no PD ( $16,4 \pm 2,0\%$  vs.  $84,0 \pm 2,0\%$ ; média de todos os tratamentos) e no momento 0 h ( $19,0 \pm 2,9\%$  vs.  $81,1 \pm 2,9\%$ ; média de todos os tratamentos). Quando foram analisadas somente células íntegras, os valores no PD foram maiores ( $P < 0,05$ ) do que todos os intervalos de incubação, enquanto que todos os intervalos de incubação apresentaram taxas menores que os valores encontrados no momento 0 h ( $P < 0,05$ ). Em conclusão, as técnicas de MP podem ser utilizadas como uma alternativa ideal ao método tradicional de Percoll durante a seleção espermática de sêmen congelado de carneiros, diminuindo custos e tempo de preparação espermática, sem que haja danos aos espermatozoides.

**Palavras-chave:** Mini-percoll; capacitação espermática; ovinos

SBTE 156 Fisiologia da reprodução do macho e tecnologia do sêmen

Número de submissão 1486

#### **Determinação da concentração do sêmen ovino por espermátocrito**

Lucas Dalle Laste Dacampo; Lucio Pereira Rauber; Paulo Mafra de Almeida Costa; João Luis dos Santos; Luana Camillo Basseggio

*Instituto Federal Catarinense - Campus Concórdia, Concórdia, SC, Brasil.*

A avaliação da concentração espermática pelo método de micro centrifugação é descrita em peixes (SHIMODA, Braz. J. vet. Res. anim. Sci., suplemento, p.19-24, 2007; GOO, Dev. Reprod. v.19, p.253-258, 2015), entretanto não há relatos em mamíferos. O sêmen ovino é caracterizado pelo baixo volume e alta concentração celular, possibilitando correlacionarmos a altura de sedimentação com a concentração espermática. O objetivo deste projeto foi avaliar se a técnica de espermátocrito pode ser utilizada para predizer a concentração espermática para a espécie ovina. O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Reprodução Animal do Instituto Federal Catarinense, Campus Concórdia. Foram coletados 16 carneiros de fertilidade comprovada com vagina artificial, totalizando 25 ejaculados. Uma fração do sêmen era diluída em formol citrato (1:400) e submetida à contagem direta em Câmara de Neubauer, em microscópio óptico com aumento de 400 vezes. A outra fração de sêmen in natura era centrifugada em micro capilares (75mm de comprimento e 1 mm Ø) em uma centrífuga de micro hematócrito a 153 x g por 2 minutos. Os capilares foram mensurados com régua de leitura para hematócrito e o resultado foi correlacionado com a contagem da Câmara de Neubauer. Para verificar a relação entre as concentrações espermáticas determinadas na Câmara de Neubauer e no espermátocrito, os dados foram submetidos à análise de regressão linear, a 5% de probabilidade, após a transformação da contagem de espermatozoides em logaritmo e o diagnóstico dos resíduos para a confirmação das pressuposições para a realização da análise de regressão, realizadas com o auxílio do software R. Observou-se relação linear ( $P < 0,05$ ) entre a concentração espermática determinada na Câmara de Neubauer e no espermátocrito, descrita pela equação:  $Y = 8.9892 + 4.0077X$ , onde X é a altura da coluna obtida na leitura do espermátocrito. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi 64,69%, indicando que uma fração significativa da variação na contagem de espermatozoides pode ser explicada pela variável regressora obtida com a leitura do espermátocrito (mm da coluna). Nesse caso, obtivemos uma equação que pode ser utilizada para estimar a concentração espermática com base na leitura do espermátocrito. Este estudo mostrou a viabilidade da equação para predizer a concentração espermática com base na leitura do espermátocrito. Novos conjuntos de dados serão utilizados para refinar o ajuste do modelo, com vistas à obtenção de uma escala de leitura que possa ser utilizada de forma rápida e prática pelo usuário do método em campo.

**Palavras-chave:** Concentração espermática; micro centrifugação; espermatozoide

SBTE 157 Fisiologia da reprodução do macho e tecnologia do sêmen

Número de submissão 1488

#### **Efeito de diferentes concentrações de melatonina na integridade da membrana acrossomal do sêmen suíno criopreservado**

Daniela C Albring<sup>1</sup>; Bruna F. V. Superti<sup>2</sup>; Andressa P. Souza<sup>3</sup>; Eraldo Lourenso Zanella<sup>2</sup>; Ricardo Zanella<sup>2</sup>; Mariana Groke Marques<sup>4</sup>

*1.Universidade do Contestado, Concordia, SC, Brasil; 2.Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brasil; 3.Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, SC, Brasil; 4.EMBRAPA Suínos e Aves, Concordia, SC, Brasil.*

O sêmen suíno é extremamente vulnerável a choques térmicos e à peroxidação lipídica, em decorrência de suas membranas conterem alto teor de ácidos graxos poliinsaturados (BONDAN, C. Am J of Biochm Biotech. in press. 2016). Estas diferenças estruturais na bicamada lipídica e o processo de "criocapacitação" ajudam a explicar a vulnerabilidade do espermatozoide suíno ao processo de criopreservação (BAILEY, J.L. J Androl. v. 21, p. 1-7, 2000). A melatonina é um

antioxidante anfífilo capaz de penetrar em qualquer compartimento celular, protegendo as células de danos oxidativos (REITER, R.J. News Physiol. Sci. v.15, p.246-250, 2000). Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar se diferentes concentrações de melatonina possuem efeito protetor sobre a membrana acrossomal de espermatozoides suínos criopreservados. Para isso, a fração rica de 5 ejaculados de 3 suínos foi diluída em diluente comercial (DCO) na proporção de 1:1. As amostras foram mantidas a 20°C por 120 min, em seguida acondicionadas a 15°C por 180 min. Posteriormente, o ejaculado foi centrifugado (1600xg/5min/15°C) e o sedimento ressuspensionado na proporção de 1:2 em diluidor de resfriamento (DR - 80% de solução de lactose 11% e 20% de gema de ovo), permanecendo a 5°C por 90 minutos, sendo então adicionado mesmo volume de diluidor de congelamento (DC - 89,5% de DR, 1,5% de Orvus Ex Paste e 9% de glicerol) para a concentração final de 5x10<sup>9</sup> spz/ml. A melatonina foi adicionada nos diluidores DR e DC, obtendo-se as concentrações finais de 0; 1,25; 2,5 e 5 mM. O envase foi feito em palhetas de 0,5 mL, submetidas ao vapor de nitrogênio líquido por 20 minutos e, posteriormente, mantidas em nitrogênio líquido. O descongelamento foi realizado a 37°C por 20 segundos, o sêmen foi então diluído em 1:4 em DCO, em seguida centrifugado (800xg/3 min). O sedimento foi ressuspensionado novamente em DCO. As amostras foram avaliadas quanto à motilidade (em microscópio de contraste de fase) e à integridade da membrana acrossomal com FITC-Pisum sativum (FITC - PSA; 11,7 µg/mL), através de citometria de fluxo (Accuri-BD). Os dados foram avaliados utilizando PROC MIXED (SAS® Institute Inc., Cary, NC, EUA). O teste de Tukey foi usado para comparar a média dos quadrados mínimos dos grupos, sendo os dados apresentados na forma de porcentagem média ± DP. A análise de regressão foi realizada no InStat® (Graphpad Instat: GraphPad Software Oberlin, San Diego - CA, USA). Não houve diferença entre as concentrações de melatonina para motilidade pós-descongelamento, sendo 32,66% ± 2,69 (0); 35,00% ± 2,69 (1,25mM); 39,50% ± 2,8 (2,5 mM) e 37,3% ± 2,69 (5 mM). Também não foi verificado efeito na integridade de acrossoma pós-descongelamento, sendo 51,96% ± 3,64 (0); 49,13% ± 3,64 (1,25 mM); 47,48% ± 3,64 (2,5 mM) e 48,80% ± 3,78 (5 mM). Não houve correlação entre as concentrações de melatonina e a motilidade (r = -0,072, p = 0,58) e entre as concentrações de melatonina e a porcentagem de acrossomas íntegros pós-descongelamento (r = 0,1419, p = 0,283). Conclui-se que a adição de melatonina não apresentou efeito protetor à membrana acrossomal durante a criopreservação de sêmen suíno.

**Palavras-chave:** Acrossoma; melatonina; criopreservação

SBTE 158 Fisiologia da reprodução do macho e tecnologia do sêmen

Número de submissão 1495

#### **Efeito de inibidores de serino proteases na criopreservação de espermatozoides bovino**

José Adalmir Torres Souza<sup>1</sup>; Marlon de Araújo Castelo Branco<sup>1</sup>; Yndyra Nayan Teixeira Carvalho<sup>1</sup>; Felipe Jesus Moraes Jr<sup>1</sup>; Filipe Barros Nunes<sup>1</sup>; Felipe Pereira da Silva Barçante<sup>1</sup>; Marcos Antônio Celestino de Sousa Filho<sup>1</sup>; Viviany de Sousa Rodrigues<sup>1</sup>; Icaro O. Torres Sousa<sup>1</sup>; Geraldo Magela Côrtes Carvalho<sup>2</sup>

1.Universidade Federal Do Piauí, Teresina, PI, Brasil; 2.EMBRAPA Meio Norte, Teresina, PI, Brasil.

A criopreservação do sêmen de bovinos é parcialmente prejudicial à fertilidade por induzir mudanças semelhantes à capacitação espermática. O plasma seminal contém enzimas da família das Serino Proteases e inibidores de Serino Proteases que estão diretamente envolvidos na fertilização de mamíferos, sendo que os inibidores de Serino Proteases podem ser utilizados no meio de criopreservação seminal para evitar uma capacitação espermática induzida pelo frio. Analisaram-se os efeitos de diferentes concentrações de dois inibidores de serino protease, inibidor do ativador do plasminogênio 1 - PAI-1 (70 ng, 140 ng e 210 ng) e Antipaina (10 µg, 50 µg e 100 µg) na suplementação ao diluidor de criopreservação de sêmen bovino. Trinta e seis ejaculados de quatro bovinos Curraleiro Pé-Duro foram coletados usando um eletro ejaculador automático e avaliados quanto aos aspectos macroscópicos (volume e aspecto) e microscópicos (turbilhonamento, motilidade, vigor, concentração espermática e patologias), posteriormente o sêmen foi diluído em Tris-Gema de acordo com os tratamentos, envasado em palhetas de 0,5 mL, congelado em máquina automatizada (TK3000) e armazenadas em botijão criogênico (-196 OC). Os efeitos dos inibidores sobre os parâmetros dos espermatozoides (cinética espermática - CASA, integridade acrossomal, integridade da membrana plasmática, potencial de membrana mitocondrial, defeitos espermáticos e taxa de reação acrossomal) foram avaliados no sêmen pós-descongelamento. A criopreservação de espermatozoides em todas as concentrações de Antipaina (10 µg, 50 µg e 100 µg) diminuiu os parâmetros cinéticos pós-descongelamento de motilidade progressiva (MP - µm/s), velocidade em linha reta (VSL - µm/s), linearidade (LIN - %), retilinearidade (SRT - %) e a porcentagem de espermatozoides hiperativados quando comparados ao controle (P<0.05). PAI-1 na concentração de 210 ng diminuiu VSL e LIN quando comparados ao controle (P<0.05). Antipaina e PAI-1, nas concentrações estudadas, não tiveram efeitos nos parâmetros de integridade da membrana plasmática, potencial de membrana mitocondrial e defeitos espermáticos. Espermatozoides criopreservados na presença de Antipaina (10 µg, 50 µg e 100 µg) e PAI-1 (70 e 140 ng) apresentaram valores de integridade acrossomal superiores ao controle, demonstrando a capacidade dos inibidores Antipaina e PAI -1 em preservarem integridade acrossomal (P<0.05). Não houve diferença estatística entre os tratamentos estudados para variável taxa de reação acrossômica, demonstrando que espermatozoides criopreservados com Antipaina e PAI -1 foram capazes de completar a reação acrossômica *in vitro*. Em conclusão, os inibidores de Serino Protease, Antipaina e PAI-1 (70 e 140ng) são capazes de preservar a integridade acrossomal de espermatozoides criopreservados de bovinos.

**Palavras-chave:** Antipaina; PAI-1; sêmen

SBTE 159 Fisiologia da reprodução do macho e tecnologia do sêmen

Número de submissão 1497

**Tempo de estabilização e exposição ao vapor de nitrogênio, altera a viabilidade do sêmen canino criopreservado**

Gabriel Bittencourt Camargo; Larissa G. Silva; Ana K. C. P. Sá; Camila Ceccato Ferreira; Claudio F. Brogni; Lain Uriel Ohlweiler; Joana Claudia Mezzalira; Alceu Mezzalira

*UDESC CAV, Lages, SC, Brasil.*

Com o objetivo de avaliar o efeito de diferentes curvas de resfriamento na viabilidade pós congelamento de sêmen canino previamente transportado (até 2 h), foram obtidos ejaculados de 3 cães doadores (7 repetições). Após a coleta o sêmen era diluído 1:1 (v/v) em meio Tris e transportado ao laboratório a 10°C, sendo então diluído novamente 1:1 (v/v) em meio Tris com 10% de gema de ovo, constituindo a fração A. A fração B era constituída por Tris 10% de gema acrescida de 7,0% de glicerol (Merck). A fração B era adicionada somente após a estabilização do sêmen a 5°C, utilizando-se o mesmo volume da fração A que continha o sêmen, obtendo-se uma concentração final de 3,5% de glicerol. Posteriormente o sêmen foi envasado em palhetas 0,25 mL e alocado em um dos quatro grupos experimentais (de acordo com o período de estabilização a 5°C, seguido do tempo de exposição ao vapor de nitrogênio), conforme descrito a seguir: G-60m/5m; G-60m/20m; G-20m/5m; G-20m/20m. As amostras tratadas com os respectivos protocolos eram a seguir mergulhadas em N2 líquido. Após o armazenamento, as palhetas eram descongeladas a 37°C por 30 segundos e avaliadas quanto a motilidade progressiva (MP) e vigor espermático (VE) durante o teste de longevidade. Foram realizadas 3 avaliações nos tempos 15 min, 1 h e 2 h após o descongelamento. Os dados foram submetidos a ANOVA e quando indicado, aos testes de Tukey e Student ( $P \leq 0,05$ ) para comparação entre os grupos e tempos, respectivamente. Os valores de MP na comparação entre curvas foram semelhantes entre si. Na comparação da longevidade, ao longo do tempo, com 15 min a MP não diferiu entre os grupos avaliados (G-60m/5m  $31,2 \pm 4,1$ ; G-60m/20m  $38,7 \pm 8,3$ ; G-20m/5m  $38,7 \pm 3,6$ ; G-20m/20m  $38,1 \pm 5,3$ ). Porém, o grupo 60m/5m manteve a MP até 1 h após descongelamento ( $24,4 \pm 3,3$ ), reduzindo somente na avaliação 2 h ( $9,4 \pm 3,3$ ). No tempo 1 h, a MP dos grupos G-60m/20m ( $18,7 \pm 5,9$ ), G-20m/5m ( $21,9 \pm 3,4$ ), G-20m/20m ( $21,9 \pm 3,4$ ), foi menor que no tempo 15 min, porém foi semelhante as observadas na avaliação com 2 h (G60m/20m ( $8,7 \pm 3,6$ ), G20m/5m ( $13,1 \pm 4,2$ ), G-20m/20m ( $15,6 \pm 3,6$ ). Os valores de VE na comparação entre curvas também foram semelhantes entre si. Já os valores obtidos do VE ao longo do tempo apresentaram diferenças significativas para todos os grupos no tempo 15 min em comparação ao tempo 2 h, sendo respectivamente G-60m/5m  $2,9 \pm 0,2$  vs  $1,5 \pm 0,5$ ; G-60m/20m  $2,9 \pm 0,2$  vs  $1,3 \pm 0,4$ ; G-20m/5m  $3,1 \pm 0,1$  vs  $1,8 \pm 0,4$ ; G-20m/20m  $3,1 \pm 0,1$  vs  $2,1 \pm 0,4$  ( $P \leq 0,05$ ). Porém, na comparação entre os tempos 1 h e 2 h, os grupos G-60m/20m ( $2 \pm 0,5$  vs  $1,3 \pm 0,4$ ) e G-20m/20m ( $2,4 \pm 0,2$  vs  $2,1 \pm 0,4$ ) foram semelhantes entre si, enquanto os grupos 20m/5m ( $2,6 \pm 0,2$  vs  $1,8 \pm 0,4$ ) e G-60m/5m ( $2,6 \pm 0,2$  vs  $1,5 \pm 0,5$ ) apresentaram queda significativa no vigor. Os dados demonstram que diferentes modulações da curva de congelamento podem alterar os parâmetros de viabilidade espermática, sendo que o tratamento G-60m/5m proporciona maior viabilidade no congelamento de sêmen de cão.

**Palavras-chave:** Sêmen de cão; congelamento; motilidade progressiva

SBTE 160 Fisiologia da reprodução do macho e tecnologia do sêmen

Número de submissão 1510

**Refrigeração de sêmen bubalino (*Bubalus bubalis*) frente a diferentes extensores e avaliação da motilidade espermática no casa**

Jaci De Almeida; Veronica Alexandra Becerra; Beatriz Parzewski Neves; Patricia Alencar Auler; Guilherme Oliveira Andrade; Mayara Ferreira Brito; Marc Roger Jean Marie Henry

*Universidade Federal De Minas Gerais - UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil.*

O objetivo do experimento foi testar *in vitro* a eficácia dos extensores: TES e TRIS (Brito, 2014) com LDL (lipoproteínas de baixa densidade) nas concentrações de 10 e 5%, sobre a longevidade espermática de búfalos no processo de refrigeração a 5°C. Foram utilizados 3 ejaculados de 4 machos bubalinos da raça Murrah, condicionados à coleta por vagina artificial. Após as coletas, cada amostra foi submetida às análises das características físicas e morfológicas do sêmen (CBRA, 2013). Imediatamente pós-coleta, cada ejaculado foi fracionado em 4 alíquotas, sendo cada amostra diluída nos extensores para a obtenção de  $50 \times 10^6$  SPTZ/mL. O envase foi realizado em palhetas de 0,5mL, que foram acondicionadas em um saco plástico (chup-chup), contendo esferas de metal no fundo, presos à borda de um recipiente de vidro e submerso em recipiente com água a 27°C. O frasco foi colocado em ambiente a 5°C obtendo-se uma curva de resfriamento de 0,25°C/minuto. As palhetas foram mantidas em refrigeração ativa (balcão frigorífico) a 5°C e sequencialmente avaliadas, reaquecendo-se o conteúdo a 37°C 30 segundos antes da avaliação da motilidade espermática (total e progressiva), utilizando o sistema computadorizado (CASA), nos tempos de 12, 24, 48, 72 e 96 horas, tendo sido as avaliações do T0 feitas de forma subjetiva. Os valores obtidos foram submetidos à Anova (parcelas subdivididas) e Teste t ( $P < 0,05$ ), usando o software Assistat 7.7 beta, 2016. As médias de motilidade total (%) encontradas pós-refrigeração para os extensores TES 10%, TES 5%, TRIS 10% e TRIS 5% foram 68,0a, 66,6b, 63,9c, 63,7c; e para os tempos 12, 24, 48, 72 e 96 horas 91,3<sup>a</sup>, 81,8b, 70,5c, 55,9d e 28,4e, respectivamente. Já as médias de motilidade progressiva (%) foram 44,2a, 43,2a, 41,5b 41,9b para os extensores anteriormente citados; e para os tempos de 68,4<sup>a</sup>, 53,5b, 42,4c, 30,9d e 18,1e, respectivamente. As

interações entre diluidor e tempo de conservação não foram significativas para as variáveis estudadas. Conclui-se que dos meios testados o TES 10% LDL foi o que melhor preservou *in vitro* os espermatozoides durante o resfriamento. Os resultados obtidos permitem incorporar o uso de sêmen resfriado até 48hs, como opção de manejo na fertilização de búfalas, para reduzir custos e melhorar a eficiência reprodutiva em programas de IATF. Entretanto, as pesquisas deverão ser continuadas a fim de identificar diluidores adequados para uma maior eficiência desta técnica.

**Palavras-chave:** Diluidores; resfriamento; reprodutores

SBTE 161 Fisiologia da reprodução do macho e tecnologia do sêmen

Número de submissão 1527

#### **Comparação entre o sistema automatizado e convencional de criopreservação espermática com relação a qualidade seminal *in vitro***

Fabio Morato Monteiro<sup>1</sup>; Erika Aline Ribeiro Dias<sup>1</sup>; Claudia Cristina Paz<sup>1</sup>; Suzane Peres Campanholi<sup>2</sup>; Mariana Furtado Zorzetto<sup>3</sup>; Frederico Ozanam Papa<sup>3</sup>; José Antonio Junior Dell'Aqua<sup>3</sup>; Camila Paula Freitas-Dell'Aqua<sup>3</sup>; Leticia Zoccolaro Oliveira<sup>4</sup>; Maria Eugenia Zerlotti Mercadante<sup>1</sup>

1.Instituto De Zootecnia, Sertãozinho, SP, Brasil; 2.UNESP-FCAV, Jaboticabal, SP, Brasil; 3.UNESP-FMVZ, Botucatu, SP, Brasil; 4.UNIRP, Rio Preto, SP, Brasil.

Os métodos de congelar sêmen mais utilizados no campo são sistemas que utilizam materiais simples como caixas de isopor com gelo e refrigeradores domésticos para a refrigeração, e caixas de isopor com nitrogênio líquido (N2L) para a criopreservação. Porém, o maior problema desta técnica é a padronização da curva de refrigeração e suas consequências na criopreservação, uma vez que existe uma variação muito grande no tamanho do isopor e nos refrigeradores, o que pode afetar essas duas etapas do processamento de sêmen. Neste contexto, o objetivo do trabalho foi confrontar simultaneamente um sistema de refrigeração e congelamento automatizado com um sistema convencional de refrigeração (refrigerador doméstico) e congelamento (caixa de isopor de 45 litros). Foram utilizados 38 ejaculados pertencentes a 12 touros 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 eletroejaculador. Os ejaculados foram diluídos em BotuBov® (Botupharma®, Botucatu, Brasil) para concentração de 50x106 spz/mL. Após a diluição, foram envasados em palhetas de 0,5 mL e refrigerados e congelados em dois sistemas. No Sistema 1 (automático) foi utilizado máquina de congelar TK 4000® (Tetakon®, Uberaba, Brasil), programada para realizar uma curva de refrigeração de 0,25°C/min. Após 4 h de estabilização a 5°C o sêmen foi congelado no mesmo equipamento (curva -15°C/min, de 5°C até -80°C, depois de -20°C/min até -140°C). No Sistema 2 (convencional) foi utilizado um refrigerador doméstico comum estabilizado a 5°C e, após 4 h de estabilização, o sêmen foi colocado a 3 cm do N2L por 20 min sendo, em seguida, imerso em N2L. A cinética espermática foi avaliada pelo sistema CASA (análise computadorizada de sêmen - IVOS® versão 14) avaliando as variáveis: motilidade total (MT; %), motilidade progressiva (MP; %), células rápidas (RAP; %), velocidade do trajeto (VAP; µm/s), velocidade progressiva (VSL; µm/s), velocidade curvilínea (VCL; µm/s), deslocamento lateral da cabeça (ALH; µm), frequência de batimento (BCF; Hz), retilinearidade (STR; %) e linearidade (LIN; %). A citometria de fluxo foi utilizada para a avaliação de integridade de membrana plasmática e acrossomal utilizando as sondas iodeto de propídio, FITC-PSA e Hoescht 3342. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo proc MIXED do SAS com significância de 5%. O sistema 1 (automático) foi superior ao sistema 2 (convencional) para MT (41,1±2,2 vs 26,3±2,2), MP (31,6±1,7 vs 21,3 ±1,7), RAP (38,7±2,1 vs 23,9 ±2,1), VAP (79,6±1,1 vs 72,9 ±2,1), VCL (134,4±2,3 vs 118,1±2,3), ALH (5,5±0,1 vs 4,9±0,1) e inferior para STR (81,0±0,8 vs 86,5±0,8) e LIN (51,1±0,8 vs 56,9±0,8). Não foi observada diferença entre os sistemas na avaliação da integridade de membrana plasmática e acrossomal. O sistema automatizado com curva de refrigeração mais lenta e congelamento controlado apresentou melhores parâmetros de cinética espermática que o sistema convencional de criopreservação do sêmen bovino. Agradecimentos: Apoio financeiro Fapesp (processo 2014/11304-3).

**Palavras-chave:** Casa; nelore; refrigeração

SBTE 162 Fisiologia da reprodução do macho e tecnologia do sêmen

Número de submissão 1568

#### **Comportamento das temperaturas de superfície escrotal e qualidade seminal de touros compostos durante as estações de inverno e verão**

Narian Romanello<sup>1</sup>; Ana Beatriz Bossois Moura<sup>2</sup>; Messy Hanneer De Andrade Pantoja<sup>1</sup>; Verônica Schinaider do Amaral Pereira<sup>3</sup>; Alessandro Giro<sup>1</sup>; Daniela Botta<sup>1</sup>; Maria Carolina Villani Miguel<sup>4</sup>; Cintia Righetti Marcondes<sup>3</sup>; José de Brito Lourenço Junior<sup>1</sup>; Alexandre Rossetto Garcia<sup>3</sup>

1.UFPA, Descalvado, SP, Brasil; 2.UFF, São Carlos, SP, Brasil; 3.EMBRAPA, São Carlos, SP, Brasil; 4.UNICEP, São Carlos, SP, Brasil.

Visando ampliar conhecimentos de fisiologia reprodutiva de touros de raça composta criados em clima tropical, o objetivo do trabalho foi comparar o comportamento das temperaturas de superfície escrotal durante os extremos climáticos registrados no inverno e verão, e avaliar seu impacto na qualidade do sêmen *in natura*. O ensaio foi conduzido na Embrapa, São Carlos-SP, local de clima tropical de altitude (Cwa, Köppen), com médias de temperaturas do ar mínima de 14,1°C e



máxima de 26.9°C no inverno, e mínima de 19.4°C e máxima de 29.4°C no verão. Foram usados 17 touros Canchim (¾Charolês x ¼Zebu), com idade média de 3 anos e peso médio de 504kg, mantidos em sistema de produção a pasto. Foram realizadas avaliações mensais durante o inverno (julho-setembro) e o verão (dezembro-março). A temperatura de superfície escrotal foi avaliada por termometria infravermelha (ST-600, Incoterm®). Os três pontos anatômicos escolhidos para descrever o perfil termorregulatório foram funículo espermático (FunE, °C), polo testicular dorsal (PTD, °C) e cauda do epidídimo (CEp, °C). O sêmen foi coletado por eletroejaculação, tendo passado por completa avaliação laboratorial quanti-qualitativa (CBRA, 2013). Foram avaliadas a concentração espermática (CE,  $\times 10^9$  spz/mL), motilidade progressiva (MP, %), total de defeitos espermáticos (DT, %), fragmentação de cromatina (FC, %; por técnica de azul de toluidina) e integridade de membrana espermática (IMP, %; por teste hiposmótico). Os dados foram analisados no BioEstat versão 5.0. As variáveis com distribuição anormal passaram por transformação linear e os dados foram submetidos à ANOVA. As médias foram comparadas por teste de Tukey (P prefixado em 5%). As temperaturas de FunE, PTD e CEp foram menores no verão ( $32.57 \pm 0.76$  vs  $33.79 \pm 0.69$ °C;  $31.88 \pm 0.75$  vs  $32.31 \pm 0.58$ °C;  $28.15 \pm 1.65$  vs  $30.01 \pm 1.14$ °C,  $P < 0.05$ ), respectivamente. Logo, os animais foram capazes de ativar de modo muito eficiente seu sistema de termorregulação testicular durante a época mais quente do ano. A CE foi mais alta no verão ( $2.09 \pm 1.51$  vs  $1.23 \pm 0.87 \times 10^9$  spz/mL,  $P < 0.05$ ), enquanto a MP foi maior no inverno ( $69.72 \pm 8.78$  vs  $56.18 \pm 18.43$ %,  $P < 0.05$ ). Não houve diferença significativa nos valores de inverno ou verão para DT ( $21.3 \pm 11.1$  vs  $17.9 \pm 11.4$ %), FC ( $3.2 \pm 3.4$  vs  $2.4 \pm 3.0$ %) e IMP ( $66.2 \pm 23.2$  vs  $67.0 \pm 17.5$ %). Apesar da motilidade progressiva ter sido pouco mais elevada no inverno, a produção quantitativa espermática foi maior no verão. A semelhança entre estações quanto às incidências de defeitos morfológicos, fragmentação de cromatina e integridade de membranas demonstra a potencial capacidade fecundante do sêmen, independentemente da época do ano. Conclui-se que touros compostos apresentaram sistema de termorregulação escrotal funcional, capaz de compensar eficientemente os efeitos bioclimáticos adversos intrínsecos à estação de verão, mantendo sua qualidade seminal durante a época mais quente do ano.

**Palavras-chave:** Bovinos; fertilidade; termorregulação testicular

SBTE 163 Fisiologia da reprodução do macho e tecnologia do sêmen

Número de submissão 11600

#### **Correlações entre temperaturas de superfície testicular mensuradas por termografia de infravermelho e parâmetros seminais de ovinos de grupos genotípicos distintos**

Ana Beatriz Bossois Moura<sup>1</sup>; Messy Hanneer de Andrade Pantoja<sup>2</sup>; Narian Romanello<sup>2</sup>; Amanda Prudêncio Lemes<sup>3</sup>; Mauricio Mello Alencar<sup>4</sup>; Sergio N. Esteves<sup>4</sup>; Jeferson Ferreira da Fonseca<sup>5</sup>; Felipe Zandonadi Brandao<sup>1</sup>; Alexandre Rossetto Garcia<sup>4</sup>

1.Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil; 2.Universidade Federal Do Pará, Castanhal, PA, Brasil; 3.Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, Brasil; 4.EMBRAPA Pecuária Sudeste, São Carlos, SP, Brasil; 5.EMBRAPA Caprinos e Ovinos, Coronel Pacheco, MG, Brasil.

O objetivo do estudo foi correlacionar a temperatura de superfície testicular com a temperatura retal e a qualidade seminal em ovinos de diferentes grupos genotípicos. O experimento foi realizado na Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos-SP, onde o clima predominante é caracterizado por Köppen como tipo Cwa. O experimento foi conduzido de outubro/2015 a fevereiro/2016. Vinte ovinos machos adultos (20,1 meses; 67,6 kg) foram usados como doadores de sêmen, sendo quatro genótipos: Morada Nova (n=5), Santa Inês (n=5), Dorper (n=5) e Texel (n=5). Os animais foram mantidos em confinamento, em galpão telado de 570 m<sup>2</sup> parcialmente coberto por telhado de 196 m<sup>2</sup>. A cada trinta dias, foram realizadas pela manhã termografias por infravermelho da região escrotal (T300, FLIR® Systems, Wilsonville, EUA). Concomitantemente, foi aferida a temperatura retal (TR, °C). Os termogramas foram analisados com uso do software FLIR® Tools Plus 3.1 e foram determinados a temperatura testicular média (TTM, °C) e as temperaturas do polo dorsal (TPD, °C) e polo ventral (TPV, °C) dos testículos. Com base na diferença entre TPD e TPV foi calculado o gradiente de temperatura testicular (GTT, °C). As amostras de sêmen foram colhidas mensalmente por vagina artificial. Foram avaliados a motilidade progressiva (%), movimento de massa (0-5), concentração espermática ( $\times 10^9$  spz/mL), defeitos maiores (%), defeitos menores (%), defeitos totais (%) e o índice de fragmentação de DNA (%). Os dados foram analisados quanto à normalidade pelo Teste de Lilliefors. As correlações foram calculadas pelo Teste de Pearson, com base no conjunto geral de dados e, na sequência, considerando os dados por genótipo. Os dados foram avaliados no programa BioEstat 5.0 com nível de significância de 5%. A TTM apresentou correlação positiva e significativa com defeitos menores (0,68;  $P < 0,05$ ) e defeitos totais (0,57;  $P < 0,05$ ) nos animais da raça Dorper. O GTT apresentou correlação positiva com a temperatura retal (0,36;  $P < 0,05$ ), sendo mais marcante nos animais da raça Santa Inês (0,69;  $P < 0,05$ ). Para os animais da raça Morada Nova, o GTT apresentou correlação positiva com movimento de massa (0,76;  $P < 0,05$ ). Nos ovinos da raça Texel, o GTT foi correlacionado com a concentração espermática (0,65;  $P < 0,05$ ). Esses resultados demonstram a individualidade termorregulatória testicular de cada grupo genotípico e sua resposta quanto à qualidade seminal, com menor grau de acometimento dos animais considerados naturalizados. Isso fortalece a hipótese de que a temperatura testicular anormal pode interferir negativamente na qualidade do sêmen, principalmente em animais de raças exóticas. O aumento do gradiente, que representa maior diferença de temperatura entre polos testiculares, apresentou resultados positivos sobre o

sêmen, o que evidencia a importância do seu uso dentro da avaliação andrológica complementar. Além disso, este estudo reforça a contribuição do uso da termografia infravermelha na avaliação reprodutiva de machos.

**Palavras-chave:** *Ovis aries*; temperatura testicular; sêmen

SBTE 164 Fisiologia da reprodução do macho e tecnologia do sêmen

Número de submissão 1618

#### **Estresse oxidativo como indicador de fertilidade de touros**

Karine de Mattos; Cecília Isabel Inês Urquiza Falcão Machado; Francielli Weber Santos; Mateus José Sudano; André Luiz Dal Maso; Fábio Gallas Leivas; Daniela dos Santos Brum

*UNIPAMPA-Universidade Federal Do Pampa-Campus Uruguiana, Uruguiana, RS, Brasil.*

A fertilidade de um touro pode ser obtida através da taxa de prenhez gerada em matrizes com adequada capacidade reprodutiva. Diversas análises são realizadas *in vitro* na tentativa de prever a fertilidade dos touros, entretanto, os resultados são variáveis e controversos. Avaliações bioquímicas vêm sendo sugeridas como uma ferramenta eficaz de análise, porém, diluentes, crioprotetores e plasma seminal podem interferir nos resultados. Este estudo teve como objetivo realizar análises bioquímicas em espermatozoides previamente selecionados e correlacionar com os dados de fertilidade a campo. Foram realizadas 3 repetições utilizando o sêmen congelado de touros de diferentes categorias: Alta Fertilidade (57,98%) e Baixa Fertilidade (38,42%), conforme Índice de Fertilidade na IATF – IFERTTM, sendo cada grupo composto por 3 touros. Para as avaliações, três partidas de cada reprodutor foram descongeladas e homogeneizadas, formando um pool, que foi analisado pós-descongelamento e pós-seleção espermática pelo método de gradientes descontínuos de Percoll® (Guimarães, A. G., Anim. Reprod. Sci., v. 146, p. 103-10, 2014). Os testes bioquímicos realizados a fim de avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio e a atividade antioxidante foram: Superóxido Dismutase (SOD; Misra, H., J. Biol. Chem., v. 247, p. 3170–3175, 1972), Potencial Antioxidante Redutor de Ferro (FRAP; Benzie, I. F., Anal Biochem., v. 239, n. 1, p. 70-6, 1996), Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS; Ohkawa, H., Anal. Biochem., v. 95, p. 351–358, 1979) e Espécies Reativas de Oxigênio (EROS; Loetichinat, C., Radiat. Phys. Chem. v. 72, p. 323–331, 2005). Os resultados foram submetidos à análise estatística pelo teste t, com nível de significância de 5%. Os níveis de TBARS logo após o descongelamento foram superiores no grupo de Alta Fertilidade ( $403,9 \pm 43,2$  nmol/ml) quando comparado ao grupo de Baixa Fertilidade ( $205,2 \pm 184,4$  nmol/ml). Após o Percoll®, os níveis de TBARS e EROS apresentaram maiores concentrações nos grupos de Baixa Fertilidade (TBARS =  $12,09 \pm 2$  nmol/ml; EROS =  $10,3 \pm 3,3$  UF) em relação ao grupo de Alta Fertilidade (TBARS  $17,2 \pm 4,9$  nmol/ml e EROS  $15,4 \pm 4,9$  UF). Esta diferença de valores provavelmente foi decorrente do diluente utilizado para o congelamento do sêmen, que era distinto entre os touros, e quando removido, após a seleção, o efeito diluente foi eliminado. Nas demais avaliações, SOD e FRAP, não houve diferença significativa entre os tratamentos. Touros de baixa fertilidade apresentam maiores níveis de EROS e peroxidação lipídica, indicando um quadro de estresse oxidativo. Estes dados sugerem que a avaliação de EROS e TBARS em espermatozoides previamente selecionados pode ser utilizada como indicador de fertilidade de touros.

**Palavras-chave:** EROS; antioxidantes; sêmen

SBTE 165 Fisiologia da reprodução do macho e tecnologia do sêmen

Número de submissão 1632

#### **Eficiência de software para contagem de células espermáticas bovinas: resultados preliminares**

Matheus Henrique Alves Sousa<sup>1</sup>; Luciano Carlos Ribeiro Da Silva<sup>1</sup>; Vitor Lemes Silva<sup>1</sup>; Andrea Francisca Araujo<sup>1</sup>; Yamê Fabres Robaina Sancler-Silva<sup>2</sup>; Frederico Ozanam Papa<sup>2</sup>; Eunice Oba<sup>2</sup>; Aline Sousa Camargos<sup>1</sup>

*1.IF Goiano Campus Morrinhos, Morrinhos, GO, Brasil; 2.DRARV FMVZ UNESP, Botucatu, SP, Brasil.*

A avaliação da motilidade e concentração espermática são essenciais na análise da qualidade do sêmen. Com o intuito de aumentar a confiabilidade dos resultados, sistemas automáticos de análise seminal (Computer-assisted Sperm Analysis - CASA) foram desenvolvidos. O CASA pode ser encontrado como hardware ou software, possibilitando visualizar, digitalizar e analisar imagens sucessivas, fornecendo informações acuradas, precisas e significativas do movimento individual de cada célula bem como de subpopulações de células espermáticas (Amann, Journal of Andrology, 25, 317, 2004; Matos, Revista Brasileira de Reprodução Animal, 32, 225, 2008). Este trabalho teve por objetivo desenvolver um software para contagem de células espermáticas bovinas, a partir de imagens obtidas em microscópio. Este programa deve ser compatível com notebooks e PCs de uso doméstico, de fácil utilização, na língua portuguesa e gratuito. Pretende-se, com este software, padronizar as avaliações de concentração espermática realizadas por médicos veterinários, durante exames andrológicos a campo, barateando os custos com aquisição de equipamentos específicos. Foram feitas 10 imagens de sêmen bovino a partir de doses de sêmen congelado sob microscopia. As palhetas de 0,5 mL foram descongeladas por 30 segundos em banho maria a 37° C. Gotas de sêmen foram depositadas sobre lâminas e cobertas por lamínula. As imagens foram obtidas a partir de câmera digital doméstica de 14 MP (Samsung, Manaus, Brasil) apoiada em um suporte improvisado de papel cartão que impedia a interferência de luz externa. O software foi desenvolvido a partir de recursos já disponíveis em uma solução open source denominada ImageJ. A contagem aproximada dos espermatozoides contidos na imagem foi possível através dos recursos de análise de partículas. Inicialmente, as imagens de vídeo foram convertidas em

frames e submetidas a alguns tratamentos, utilizando apenas 8 bits de cores e segmentando em escalas de cinza, para que o software conseguisse fazer a análise das partículas da imagem. As 10 imagens foram analisadas pelo software e por técnico para contagem de espermatozoides. Para as análises estatísticas, os resultados das contagens foram submetidos à análise de variância e as médias de cada grupo foram submetidas ao teste de Tukey (SAS, 2012) ao nível de significância de 5%. Os valores médios das contagens de células espermáticas foram  $184,2 \pm 8,42$  e  $179,6 \pm 8,04$  pelo software e pelo técnico, respectivamente ( $p > 0,05$ ). O software mostrou-se altamente eficiente para a contagem de células espermáticas, sendo uma solução prática e de fácil utilização. Os diferentes instrumentos CASA têm demonstrado altos níveis de precisão e confiança usando diferentes metodologias de classificação que fornecem uma grande ferramenta para melhorar nosso conhecimento e habilidade para analisar espermatozoides (Verstegenet, Theriogenology, 57, 149, 2002), tornando-se essencial à pesquisa, ao treinamento de pessoal e à padronização entre laboratórios (Amann, Biology of Reproduction, 23, 6478, 1980). Nosso diferencial é a gratuidade e facilidade de uso, visto que trata-se de software específico para análise de espermatozoides e na língua portuguesa. O software desenvolvido mostrou a mesma eficiência que a contagem realizada por técnico da área.

Agradecimento ao CNPq pelo auxílio financeiro e bolsas ITI e PIBIC.

Palavras-chave: Java; open source; sêmen

SBTE 166 Fisiologia da reprodução do macho e tecnologia do sêmen

Número de submissão 1643

Avaliação do potencial reprodutivo de touros de uma nova raça blonel: análise espermática

Ana Paula Balduino Rabelo; Eduarda Gonçalves Damacena; Vitor Lemes Silva; Amanda De Ávila Pires; Andrea Francisca Araujo; Wallacy Barbacena Rosa Dos Santos; Jeferson Corrêa Ribeiro; Andréia Santos Cezário; Aline Sousa Camargos  
*IF Goiano Campus Morrinhos, Morrinhos, GO, Brasil.*

Existem muitas raças de bovinos registradas que tem sido utilizadas para a produção de carne. A mais nova raça de corte, o Blonel, foi criada e reconhecida pelo ministério da agricultura e do abastecimento (MAPA) a partir do cruzamento das raças Blonde e Nellore. A raça Blonde, da França, é oriunda de um dos programas de seleção genética mais importantes do mundo. Sua seleção genética presta atenção especial para a precocidade sexual, fertilidade, habilidade materna e qualidade da produção de carne. Por outro lado, Nellore é uma raça tradicional de produção de carne no Brasil que traz rusticidade e adaptação às condições geográficas e climáticas. Este relato visou avaliar a performance reprodutiva ao exame andrológico de touros da raça Blonel. Uma coleta de dados reprodutivos do ano de 2012 foi realizada no plantel de Blonel na fazenda Três Furnas em Buriti Alegre - GO. Para esta pesquisa, estudamos nove touros que foram submetidos ao exame andrológico entre 21 e 26 meses de idade naquele ano. O exame andrológico (de acordo com o Manual Andrológico do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal- CBRA, Terceira edição, 2013) foi conduzido pelo mesmo veterinário, durante os meses de Agosto e Setembro. Imediatamente após a coleta, foi realizada a análise do semen para motilidade geral, motilidade, vigor e concentração espermática (de acordo com o Manual Andrológico do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal- CBRA, Terceira edição, 2013). A partir de uma gota de semen foi confeccionado um esfregaço para análise microscópica. Subsequentemente, no laboratório, a lamina foi corada (por Gram) para condução da análise imediata das células espermáticas (morfologia) sob o microscópio, quando todos os tipos de defeitos e suas frequências foram avaliadas. Os resultados destas avaliações mencionadas acima são uma parte do relato do exame. Os dados dos relatos foram coletados e digitados, submetidos à análise de média e desvio padrão. Como não há tratamento nem outra raça para comparação, a análise estatística não é requerida. Vale lembrar que esta é uma nova raça e que não existem dados registrados na literatura. Os resultados foram:  $2,67 \pm 0,50$  de motilidade geral,  $54,44 \pm 5,83\%$  de motilidade,  $3,33 \pm 0,87$  de vigor e  $666,67 \times 10^6 \pm 100,00 \times 10^6/\text{ml}$  de concentração espermática. Os valores recomendados pelo CBRA para motilidade é  $\geq 60\%$ , vigor  $\geq 3$  e concentração espermática  $\sim 350 \times 10^6/\text{ml}$ . Motilidade e vigor observados neste relato são maiores dos que os reportados por Dias (Vet Notícia, 13, 31, 2007) que foram de 45,9 a 51,0% e 2,6 a 2,9 respectivamente em um estudo que utilizou touros de 22 meses de idade criados a pasto. Taxas de defeitos maiores ( $7,78 \pm 1,20\%$ ) e menores ( $5,00 \pm 2,65\%$ ) foram observadas, dentro do recomendado pelo CBRA. Dentre os defeitos maiores foram observados: defeitos acrossomais, gota citoplasmática proximal, espermatozoides subdesenvolvidos, cauda dobrada em direção à cabeça, tamanho e coloração anormais, formas teratológicas e patologias da peça intermediária. Ainda dentre os maiores:  $2,00 \pm 1,50\%$  de cabeças isoladas,  $0,67 \pm 0,50\%$  estreitamento da base,  $0,33 \pm 0,71\%$  de piriformes,  $0,89 \pm 1,05\%$  de contorno anormal,  $0,44 \pm 0,88\%$  de formação,  $3,44 \pm 2,24\%$  de cauda fortemente dobrada/enrolada. Os seguintes defeitos menores foram observados:  $2,67 \pm 2,00\%$  de cabeças isoladas normais,  $0,33 \pm 0,50\%$  de abaxial, retroaxial, oblíquo,  $1,67 \pm 2,12\%$  de cauda dobrada ou enrolada e  $0,33 \pm 0,50\%$  de gotas citoplasmáticas distais. Os resultados deste estudos foram satisfatórios, porem o potencial reprodutivo de touros Blonel deverá ser melhor estudado.

Palavras-chave: Exame andrológico, espermatozoide, bovino

SBTE 167 Fisiologia da reprodução do macho e tecnologia do sêmen

Número de submissão 1697

### **Características seminais de touros da raça nelore suplementados com fonte de ácidos graxos poliinsaturados em regime de pastagem**

Guilherme Fazan Rossi<sup>1</sup>; Fabio Morato Monteiro<sup>2</sup>; Erika Aline Ribeiro Dias<sup>2</sup>; Flávia Fernanda Simili<sup>2</sup>; Dayane Priscila Vrisman<sup>1</sup>; Aderson Mauricio Ifran<sup>1</sup>; Roberta Vantini<sup>1</sup>; Henrique Moreira Lopes<sup>2</sup>; Joaquim Mansano Garcia<sup>1</sup>; Gisele Zoccal Mingoti<sup>3</sup>

1.FCAV-UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil; 2.Instituto de Zootecnia, Sertãozinho, SP, Brasil; 3.FMVA-UNESP, Araçatuba, SP, Brasil.

A puberdade de touros é um importante indicador para o melhoramento reprodutivo dos bovinos. A produção e qualidade do sêmen são influenciadas por vários fatores, principalmente a nutrição. Assim, as dietas com ácidos graxos poliinsaturados (AGPs) apresentam efeito no desempenho reprodutivo dos machos. Dentro do contexto, o objetivo do presente trabalho é estudar os efeitos do uso de suplementação com fonte de ácidos graxos poliinsaturados (AGPs) nas características seminais de touros da raça Nelore em pastagem. Foram utilizados 24 bovinos jovens com média de 14 meses de idade do rebanho Tradicional do Instituto de Zootecnia (IZ) de Sertãozinho, SP. Os animais foram divididos em 2 grupos com (n=12) e sem suplementação com AGPs (n=12). As dietas experimentais foram isoproteicas e isoenergéticas. Os animais foram mantidos em pastagem de capim-marandu, em lotação contínua e taxa de lotação fixa, durante todo o período experimental. Os touros foram submetidos a cada 28 dias até completarem 24 meses de idade (totalizando 12 repetições) à mensuração do perímetro escrotal e à coleta de sêmen para averiguar as características seminais: motilidade subjetiva e por CASA (HAMILTON THORNE RESEARCH, Ivos-14, EUA), vigor, concentração e morfologia espermática. As análises estatísticas foram feitas no procedimento MIXED (SAS Inst., Inc., Cary, NC) usando o comando REPEATED para modelar a estrutura de covariância residual dentro de animal. Não foi observado efeito de tratamento de suplementação sobre o perímetro escrotal, motilidade, vigor, concentração, defeitos maiores, menores e totais. A motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %) e rápidos (RAP, %) analisadas por computador também não sofreu efeito entre os tratamentos. Porém, notou-se efeito da idade, os animais apresentaram melhora na qualidade espermática a partir de 16 meses ( $p < 0,0001$ ). São necessários mais estudos com maior número de animais e diferentes fontes de gordura para testar a real influência dos AGPs na reprodução de touros.

**Palavras-chave:** AGPs; tourinhos; sêmen

SBTE 168 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Número de submissão 1452

### **Fatores de transcrição ativados pelo 17 $\beta$ -estradiol no corpo lúteo de cadelas não prenhes**

Ana Paula Matoso Miskulin Cardoso<sup>1</sup>; Renata dos Santos Silva<sup>1</sup>; Ines Cristina Giometti<sup>2</sup>; Paula de Carvalho Papa<sup>1</sup>

1.USP, São Paulo, SP, Brasil; 2.UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil.

O corpo lúteo (CL) canino é responsável pela síntese de E2 durante o diestro. O E2 atua de forma autócrina e/ou parácrina sobre essa glândula. O mecanismo de atuação do E2 depende da razão entre receptor alfa (ESR1) e receptor beta (ESR2). A ligação ao ESR1 tem efeito proliferativo e ao ESR2 antiproliferativo. O objetivo deste trabalho é entender a sinalização mediada pelo ESR1 e ESR2 no processo de formação e regressão do CL. Os CLs foram obtidos de cadelas não prenhes (n=30) nos dias 10, 20, 30, 40, 50 e 60 (n=5/grupo) após a ovulação (po). No dia da ovariectomia foi colhido sangue para mensuração das concentrações de P4 e E2. Dezoito CLs (n=3/grupo) foram submetidos ao sequenciamento de RNA (RNAseq). Os genes diferencialmente expressos (DE) identificados pelo RNAseq foram submetidos ao software oPOSSUM3 (<http://opossum.cisreg.ca>) para identificação regiões de ligação mais representadas nos fatores de transcrição. Doze genes DE foram selecionados para validação dos resultados de RNAseq através do qPCR; usando o GAPDH como gene de referência. Desses genes, quatro apresentaram regiões em comum com ESR2 (lymphoid enhancer-binding factor 1 - LEF-1; pregnancy-associated plasma protein A - PAPPA; ; N-myc downstream-regulated gene 2 - NDGR2; ATPase Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> - ATP1A1) e um com ESR1 (caveolin 1 - CAV1) e os demais controlam proliferação celular (beta-catenin - CTNNB1; ciclin D1 - CCND1; Axin 2; insulin binding proteins - IGFBP 3, 4 e 5; platelet derived growth factor subunit B - PDGFB). A expressão gênica relativa foi calculada pelo método Pfaffl (Nucleic Acids Research, 29: 2004-2007, 2001). A análise estatística foi realizada por ANOVA one-way, seguida do teste de Bonferroni ( $p < 0,05$ ). A correlação entre os parâmetros foi verificada pela correlação de Pearson ( $p < 0,05$ ). Houve correlação positiva, com valores r variando de 0,3775 (para CCND1) até um máximo de 0,9984 (para PAPPA), valor médio de 0,735. Nenhuma diferença estatística foi observada para a expressão gênica de CTNNB1, LEF-1, CCND1, Axin2, IGFBP5, NDGR2, ATP1A1 e PDGFB. As expressões gênicas de PAPPA, IGFBP3 e IGFBP4 diminuíram significativamente ao longo do diestro, apresentando o maior valor no dia 10 ( $p < 0,05$ ). A expressão gênica de CAV-1 não variou nas fases de desenvolvimento e manutenção do CL (dia 10 a 40 p.o.), mas diminuiu significativamente durante a sua regressão, apresentando o menor valor no dia 60. O valor mais alto de P4 foi encontrado no dia 20 comparado aos demais dias e o dia 30 foi maior que os dias 50 e 60 ( $p < 0,05$ ). O E2 apresentou valores crescentes até o dia 50 (início da regressão estrutural do CL) e depois diminuiu ( $p < 0,05$ ). Conclui-se que o RNAseq é uma metodologia efetiva para detecção dos genes DE, especialmente os de baixa expressão e que E2, possivelmente, participa da regulação da vida útil do CL através de mecanismos de interação envolvendo o sistema IGF e a caveolina1.

**Palavras-chave:** Estradiol; corpo lúteo; RNAseq

SBTE 169 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Número de submissão 1452

### **Análise da expressão diferencial de componentes da cascata de sinalização da insulina no corpo lúteo canino após sequenciamento de RNA**

Renata dos Santos Silva<sup>1</sup>; Ana Paula Matoso Miskulin Cardoso<sup>1</sup>; Suraj Unniappan<sup>2</sup>; Ines Cristina Giometti<sup>3</sup>; Paula de Carvalho Papa<sup>1</sup>

1.University of São Paulo / Depart. of Surgery, School of Veterinary Medicine And Animal Science, São Paulo, SP, Brasil;

2.University of Saskatchewan, Saskatoon, Canadá; 3.UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil.

O presente estudo visa caracterizar a expressão de genes regulados pela insulina no CL canino ao longo do diestro. Hipotetizamos que a insulina desempenhe um papel na regulação da esteroidogênese, e consequentemente nas funções das células luteínicas. Cadelas não gestantes foram submetidas à ovarioparingohisterectomia a cada 10 dias entre os dias 10 e 60 (n=4/ grupo) após a ovulação (po). Os CL coletados foram utilizados para sequenciamento de RNA (RNA-seq) além de validação por PCR em tempo real, e protéica por western blotting e imunofluorescência. A análise de bioinformática detectou a presença de 34.408 genes nas amostras analisadas, dos quais 29.011 genes apresentaram algum nível de expressão gênica no diestro. A expressão gênica temporal revelou a presença de 5.116 genes diferencialmente expressos em pelo menos uma comparação entre grupos, e deste total, 1106 genes ainda não foram anotados no genoma canino. Foram selecionados sete relacionados à sinalização insulínica: o IRS1 (insulin receptor substrate 1), envolvido com o início da sinalização insulínica, o PI3KR3 (phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 3 (gamma) e PI3KCG (phosphoinositide-3-kinase, catalytic, gamma polypeptide), que são isoformas da PI3K envolvidas na fosforilação de AKT, as MAPK9 (mitogen-activated protein kinase 9), MAPK13 (mitogen-activated protein kinase 13) e MAPK14 (mitogen-activated protein kinase 14) envolvidas na proliferação celular e o SOCS1 (suppressor of cytokine signaling 1), conhecido como um regulador positivo da iniciação da sinalização insulínica. A expressão de IRS1, MAPK13 e MAP14 foi maior na segunda metade do diestro, concomitante à diminuição da expressão das enzimas esteroidogênicas HSD3B e CYP7B, o que sugere uma regulação negativa desempenhada por estes genes. Ao contrário, PI3KCG, PI3KR3, MAPK9 e SOCS1 apresentam valores máximos de expressão no início do diestro, semelhante à expressão de CYP19A1, sugerindo uma regulação positiva. Os resultados corroboram estudos nos quais os diferentes componentes envolvidos com a sinalização insulínica estabelecem uma interação direta com a expressão de enzimas esteroidogênicas, a partir de mediadores de baixo peso molecular como o inositolifosfoglicano: após a associação da insulina com o seu receptor, os mediadores desta classe são gerados, internalizados e alteram as atividades de algumas enzimas esteroidogênicas e do metabolismo celular, além de atuar na clivagem da cadeia lateral do colesterol resultando em maior produção de hormônios. Estes dados nos permitem um aprofundamento da compreensão da regulação da fisiologia luteínica de forma geral e mais especificamente sobre a regulação da esteroidogênese através da sinalização insulínica.

**Palavras-chave:** Corpo lúteo; insulina; RNA-seq

SBTE 170 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Número de submissão 1458

### **Efeito das infusões intramamárias de LPS sobre os parâmetros inflamatórios e reprodutivos de vacas leiteiras Holandesas**

Carla Cristian Campos<sup>1</sup>; Ricarda Maria Santos<sup>1</sup>; Ronaldo Luis Aoki Cerri<sup>2</sup>

1.Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil; 2.University of British Columbia, Vancouver, Canadá.

Objetivou-se avaliar os efeitos da mastite induzida pelo LPS sobre a resposta inflamatória sistêmica e o desenvolvimento embrionário inicial em vacas leiteiras Holandesas. Vacas aos 35 ± 7 DEL (n = 20) foram submetidas ao programa Double-Ovsynch modificado (Souza, Theriogenology, v.70, p.208-2015, 2008) (10 dias de intervalo entre os protocolos com uso de CIDR® e duas aplicações de PGF<sub>2α</sub> no segundo protocolo) e inseminação em tempo fixo (D0). As vacas foram aleatoriamente distribuídas em dois tratamentos: 1) grupo LPS - vacas receberam, nas ordenhas da manhã, infusões intramamárias (D5 e D10) de 25 µg de LPS (cepa 0111:B4, Sigma Aldrich®, St. Louis, MO) diluídas em 10 ml de solução salina estéril e 2) grupo controle - vacas foram infundidas apenas com salina. Amostras de sangue foram coletadas em diferentes períodos durante o período experimental para determinar as concentrações plasmáticas de haptoglobina (Hp), fator de necrose tumoral α (TNF-α) e progesterona (P<sub>4</sub>). Amostras de leite foram coletadas para contagem de células somáticas (CCS) na ordenha referente à infusão e nas três ordenhas subsequentes (0, 10, 24 e 34 horas), bem como a produção leiteira foi avaliada. A temperatura corporal das vacas foi gravada por um sistema de bólus rumino-reticular que transmitia via online os dados a cada hora durante o período. No 15º dia após a inseminação (D15) foi feita a lavagem uterina para recuperação dos embriões e para dosagem de Interferon-tau (IFN-τ). Os dados foram analisados utilizando o procedimento MIXED do SAS (P < 0,05). Hp foi detectada em maior concentração no grupo LPS comparado ao controle (0,80 ± 0,06 vs 0,45 ± 0,07; P < 0,01), porém a concentração do TNF-α foi similar (P = 0,72) entre os tratamentos. A produção leiteira entre os dias 0 e 15 foi maior para as vacas controle (37,5 ± 1,5 vs 33,5 ± 1,3 kg/dia; P < 0,01), enquanto que a CCS foi maior para as vacas tratadas com LPS nas primeiras 34 horas após cada infusão (P < 0,01). Da mesma forma,

a temperatura reticular das vacas do grupo LPS permaneceu elevada por 12 horas ( $P < 0,01$ ) após cada infusão. A concentração plasmática de progesterona não diferiu entre os tratamentos durante os períodos de coleta analisados ( $P = 0,72$ ), porém as vacas gestantes apresentaram maior concentração nos dias 6, 9 e 10 após a IA ( $P < 0,01$ ). A taxa de recuperação de embriões foi de 55%. O comprimento dos embriões recuperados ( $3,6 \pm 0,9$  vs  $2,4 \pm 0,7$  cm;  $P = 0,56$ ) e a concentração de IFN- $\tau$  do fluido uterino luminal ( $P = 0,44$ ) foram semelhantes entre os tratamentos. Conclui-se que as infusões intramamárias de LPS foram capazes de desencadear uma resposta inflamatória sistêmica durante o período pós-IA, mas incapazes de afetar tanto a recuperação quanto o comprimento dos embriões, e a concentração intra-luminal uterina de IFN- $\tau$ .

**Palavras-chave:** Desenvolvimento embrionário; LPS; mastite

SBTE 171 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução  
Número de submissão 1465

**Resistência embrionária ao estresse subletal induzida por alta pressão gasosa**

Bruno Silveira Becker<sup>1</sup>; Favorino José de Freitas Collares<sup>1</sup>; Denise Dornelas Mendonça<sup>2</sup>; Marcelo Bertolini<sup>1</sup>; José Luis Rigo Rodrigues<sup>1</sup>

1.UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil; 2.PUCRS, Porto Alegre, RS, Brasil.

Muitos estudos têm relatado a alta pressão como um agente estressor que pode ser usado para induzir resposta ao estresse subletal em embriões, conferindo-lhe proteção celular a estresses subsequentes, como a criopreservação (Pribenszky *et al.*, Biol Reprod (83) 690-697, 2010; Rodrigues *et al.*, Reprod Fertil Dev (25) 282-283, 2012). O objetivo deste estudo foi investigar o uso da alta pressão gasosa (*high gaseous pressure*, HGP) como uma alternativa à alta pressão hidrostática na indução de resistência em blastocistos murinos. Um total de 47 (69,1 %) de 68 fêmeas de *Mus musculus domesticus* superovuladas produziram 518 blastocistos que foram segregados em três grupos experimentais: (a) 20,7 MPa por 2 h (P20.T2); (b) 20,7 MPa por 4 h (P20.T4); e (c) 34,5 MPa por 2 h (P34.T2). Todos os grupos foram pareados com blastocistos controles não expostos à HGP. Os embriões foram expostos à HGP e, após, cultivados *in vitro* em meio de cultura mKSOM + 0,4% BSA por 72 h à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub> em umidade saturada. As taxas de eclosão foram comparadas entre os grupos experimentais e controles pelo teste do Chi quadrado ( $P < 0,05$ ). Não foram observadas diferenças estatísticas entre as taxas de eclosão dos grupos controles e experimentais: (a) P20.T2 84,5% (60/71) vs. controle 86,2% (81/94); (b) P20.T4 93,5% (131/140) vs. controle 88,2% (75/85); e (c) P34.T2 74/78 (94,9%) vs. controle 92,0% (46/50). Concluiu-se que a HGP pode ser usada com agente estressor subletal sem comprometer a viabilidade embrionária *in vitro*. Análises no padrão de expressão gênica estão em andamento para identificar modificações moleculares embrionárias ou marcadores induzidos pela HGP.

**Palavras-chave:** Alta pressão gasosa; estresse subletal; embrião murino

SBTE 172 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução  
Número de submissão 1473

**Recuperação da atividade reprodutiva e fertilidade de cabras Saanen acometidas por hidrometra após tratamento com cloprostenol e indução de estro durante a estação de anestro (dados preliminares)**

Jeferson Ferreira da Fonseca<sup>1</sup>; Ana Lucia Rosa e Silva Maia<sup>2</sup>; Felipe Zandonadi Brandao<sup>2</sup>; Mário Felipe Alvarez Balaro<sup>2</sup>; Gustavo Bervian Santos<sup>2</sup>; Joanna Maria Gonçalves de Souza Fabjan<sup>2</sup>; Ribrio Ivan Tavares Pereira Batista<sup>2</sup>; Olivardo Facó<sup>1</sup>

1.EMBRAPA Caprinos e Ovinos, Coronel Pacheco, MG, Brasil; 2.Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil.

A hidrometra é uma das mais importantes causas de subfertilidade ou infertilidade em cabras leiteiras. A pseudogestação costuma ser notada em torno de cinco meses após o acasalamento devido a não ocorrência do parto. Com a utilização da ultrassonografia (US) a hidrometra pode ser facilmente diagnosticada tanto de forma precoce quanto tardia. Em alguns casos as cabras afetadas podem apresentar cistos ovarianos concomitantes que só serão notados após a primeira administração de cloprostenol e drenagem do conteúdo uterino. Este estudo teve como objetivos avaliar o esvaziamento do útero e a fertilidade em cabras com hidrometra, após o tratamento com d-cloprostenol associado ou não ao GnRH, seguido de indução de estro. O estudo ocorreu em 2015 na estação de anestro em Minas Gerais, Brasil. Foram diagnosticadas com hidrometra 10 de 18 cabras da raça Saanen (55,6%), com idades entre 18 e 102 meses, e escore de condição corporal (ECC) entre 2,75 e 4,25 (escala 1-5). As cabras receberam três aplicações de 37,5 µg de d-cloprostenol (Prolise®, Tecnopec LTDA, São Paulo, Brasil) laterovulvar com intervalos de 10 dias (D0, D10 e D20). No D5 as cabras foram separadas aleatoriamente em dois grupos e receberam 1 mL (25 µg) i.m. de GnRH (Gonadorelina, Gestran Plus®, Tecnopec LTDA, São Paulo, Brasil) e 1 mL de soro fisiológico 0,9%, respectivamente. No D25, as cabras foram submetidas à indução de estro por meio de aplicação de esponjas intravaginais por seis dias, contendo 60mg de MAP (Progespon®, Shering-Plough Saúde Animal, São Paulo, Brasil), associadas à administração de 37,5 µg de d-cloprostenol laterovulvar e 200 UI de eCG (Novormon 5000®, Shering-Plough Saúde Animal, São Paulo, Brasil) i.m., 24 horas antes da retirada da esponja. A US transretal (Mindray® DP330-Vet, Shenzhen, China) para verificação de gestação foi feita 60 dias após o acasalamento. Os dados estão apresentados de forma descritiva. Todas as cabras apresentaram estro após a indução de estro. Com o uso da US verificou-se uma taxa de recuperação em 50% (5/10) das fêmeas, sendo 80% do grupo

GnRH (4/5) e 20% do grupo Controle (1/5). Nas cabras que não estavam gestantes, uma teve perda fetal (grupo Controle) e outra apresentou novamente hidrometra (grupo GnRH). As fêmeas restantes tiveram uma completa drenagem uterina (Grau 0). A utilização de três aplicações de d-cloprostenol com intervalo de 10 dias, seguido de indução de estro foram eficientes para o esvaziamento do útero resultando em uma taxa de gestação relativamente boa.

Suporte financeiro: CNPq – Projeto 479826/2013-7 e Fapemig - Projeto CVZ-PPM 00042-14.

**Palavras-chave:** Eficiência reprodutiva; hidrometra; caprino

SBTE 173 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Número de submissão 1476

**Uma técnica simples para quantificar a apoptose de oócitos maturados *in vitro* em vacas**

Alejandra Velasquez; Edwin Mellisho-Salas; Joel Cabezas; Maria Jose Nuñez; Lleretny Rodriguez-Alvarez

*Laboratory of Animal Biotechnology, Department of Animal Science, Faculty of Veterinary Science, Uni, Chillán, Region Bio Bio, Chile, Chile.*

A apoptose é caracterizada pela fragmentação nuclear e citoplasmática, condensação de cromatina e fragmentação do DNA. Atualmente os métodos disponíveis para a quantificação de apoptose têm várias limitações: (a) diferentes métodos de coloração envolvendo várias etapas, (b) dificuldade para a quantificação de fluorescência celular e (c) detecção de não-específica. O objetivo deste estudo foi quantificar a apoptose de oócitos maturados *in vitro* de bovinos de carne e leite, utilizando laranja de acridina / iodeto de propídio (LA / IP) e contagem de fluorescência total em uma célula usando o software de imagem J. Ovários de vacas leiteiras e de corte foram coletados em um abatedouro e transportados dentro de 2 horas para o laboratório. Complexo cumulus oophorus (CCOs) foram recuperados por punção folicular com uma agulha de 20 G e uma seringa. Os oócitos recuperado (qualidade 1 e 2) foram maturados individualmente durante 23 h a 39° C sob 5% de CO<sub>2</sub>. A fim de quantificar a expansão do cumulus, a área de cumulus foi medida individualmente antes e depois da maturação *in vitro*. Os oócitos maturados foram incubadas a 37° C em 10 µL de PBS suplementado com solução de coloração de dupla fluorescência (LA / IP, Logos Biosystems), durante 5 minutos antes de visualização. A morfologia de células apoptóticas foi analisada dentro de 10 minutos, utilizando microscópio de fluorescência invertida (EVOS TL, Thermo Fisher Scientific Inc) e processados com software de imagem J v 1.43u (<https://imagej.nih.gov/ij>). Imagem J está disponível no domínio público (ou seja, grátis). As imagens de sobreposição foram capturadas no formato de arquivo TIFF com microscópio de fluorescência invertido com GFP e canal de RFP. As imagens foram convertidas em tons de cinza de 8 bits e diferentes canais foram selecionados para medir a fluorescência. As células de interesse foram selecionadas usando qualquer uma das ferramentas de desenho / seleção e analisados por área de medição, valor médio de cinza e densidade integrada. A região próxima à célula que não tem nenhuma fluorescência, foi considerada como background. Análises de comparação entre os grupos foram realizadas por análise de variância (ANOVA) utilizando o programa Infostat (Buenos Aires, Argentina). As diferenças foram consideradas significativas para  $P < 0,05$ . A área do CCOs de vacas leiteiras (71 150 µm<sup>2</sup>) e vacas de corte (11 745 µm<sup>2</sup>), antes da maturação *in vitro* não apresentaram diferenças significativas ( $P = 0,074$ ). Índice de apoptose de células do cumulus de oócitos maturados *in vitro* de vacas de leite (26,3%) e vacas de corte (30,6%) não apresentaram diferença estatística ( $P = 0,65$ ). No entanto, CCOs maturados *in vitro* por 23 h em vacas de corte (781 382 µm<sup>2</sup>) tiveram maior expansão (7,05 versus 4,7 vezes) que os CCOs de vacas leiteiras (337 832 µm<sup>2</sup>) ( $P = 0,045$ ). Em conclusão, o protocolo utilizando laranja de acridina / iodeto de propídio (LA / IP), é o método simples e rápido para medir a apoptose em células do cumulus dos oócitos. A imagem do programa J complementa o trabalho de fluorescência de coloração e torna possível a medição da fluorescência de uma célula de uma forma objetiva.

**Palavras-chave:** Apoptose; oócitos; vacas

SBTE 174 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Número de submissão 1478

**Ocorrência de prenhez em uma novilha após ovariectomia bilateral**

Camila Bizarro da Silva; Katia Cristina Silva-Santos; Gustavo Martins Gomes Santos; Antônio Cesar de Oliveira Dearo; Marcelo Marcondes Seneda

*Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.*

Uma novilha Nelore de 24 meses de idade tornou-se naturalmente prenha após ser submetida a um processo de ovariectomia bilateral. Este evento inesperado ocorreu após um experimento realizado para estimar a população de folículos pré-antrais em ovários de bezerras. Quatorze bezerras com idade de oito meses foram ovariectomizadas bilateralmente por laparotomia. Os procedimentos foram realizados em um centro cirúrgico, sob sedação e bloqueio local paravertebral, sendo ambos os ovários de cada animal cuidadosamente retirados, identificados, medidos, pesados, fotografados e processados para histologia clássica para contagem folicular. Durante estas etapas, foi possível verificar a integridade de todos os ovários, tanto macro quanto microscopicamente. Após tal procedimento, as bezerras foram destinadas a uma fazenda experimental, sendo alojadas em lotes contendo touros. Após 16 meses, estas fêmeas ovariectomizadas foram inseridas em um experimento com dispositivos intravaginais de progesterona e mensurações hormonais. Surpreendentemente, antes da inserção de dispositivo intravaginal, uma novilha mostrou nível de progesterona

plasmática de 6,11 ng/mL, mensurado por radio-imunoensaio com o kit Coat-a-Count. Um exame de ultrassonografia transretal revelou a presença de uma estrutura semelhante a um ovário e a prenhez foi confirmada. A gestação evoluiu normalmente e a novilha pariu um bezerro macho saudável. Após o desmame, a novilha foi abatida, o trato reprodutivo foi recolhido, fotografado e analisado macroscopicamente. O suposto ovário foi avaliado histologicamente. Identificou-se um padrão incomum de parênquima tecidual, com predominância de tecido conjuntivo e quantidade bastante reduzida de estruturas semelhantes a folículos, em diversos estágios de desenvolvimento, além de um corpo lúteo. A descrição deste inusitado evento pode ser útil para se debater as possíveis explicações para tal.

**Palavras-chave:** Ovariectomia; gestação; nelore

SBTE 175 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Número de submissão 1489

#### **Ultrassonografia doppler no diagnóstico precoce da gestação em ovinos**

Gláucia Mota Bragança<sup>1</sup>; Mário Felipe Alvarez Balaro<sup>1</sup>; Jeferson Ferreira da Fonseca<sup>2</sup>; Pedro Henrique Nicolau Pinto<sup>1</sup>; Rômulo Mendonça da Rosa<sup>1</sup>; Lilian Santos Ribeiro<sup>1</sup>; Marcielli Silva Almeida<sup>1</sup>; Joanna Maria Gonçalves de Souza Fabjan<sup>1</sup>; Alexandre Rossetto Garcia<sup>3</sup>; Felipe Zandonadi Brandão<sup>1</sup>

1.Universidade Federal Fluminense, Rio De Janeiro, RJ, Brasil; 2.EMBRAPA Caprinos e Ovinos, Sobral, CE, Brasil;

3.EMBRAPA Pecuária Sudeste, São Carlos, SP, Brasil.

O diagnóstico precoce de gestação incrementa a eficiência reprodutiva, pois as fêmeas não gestantes podem ser submetidas a um novo protocolo reprodutivo o mais rápido possível, concentrando assim os nascimentos e facilitando o manejo. O objetivo deste estudo foi determinar a eficiência no diagnóstico precoce da gestação no 17º dia após cobertura em ovelhas. O estudo foi desenvolvido em uma propriedade de ovinos de corte no município de Cachoeiras de Macacu – RJ. Cinquenta e oito ovelhas mestiças Dorper x Santa Inês tiveram o estro sincronizado por meio de duas doses contendo 0,12 mg de clorprostenol (Estron<sup>®</sup>, Agener União Saúde Animal, São Paulo, Brasil) intervaladas em sete dias. Após 36 horas da segunda aplicação hormonal, foi realizada a detecção do estro e monta controlada. No 12º (pré-luteólise), 17º (pós-luteólise) e 30º dia após o término das coberturas foram realizadas as ultrassonografias modo Doppler Colorido (Sonoscape S6<sup>®</sup>, SonoScape, Yizhe Building, Yuquan Road, Shenzhen, China) acoplado a um transdutor linear de 7,5 MHz (via transretal) a fim de se avaliar a quantidade e qualidade dos CL. A qualidade dos CL foi avaliada subjetivamente por meio dos graus de vascularização: 1 (0-25%), 2 (25-50%), 3 (50-75) e 4 (75-100%) de acordo com Figueira et al. (2015). No 30º dia, foi considerado como o dia confirmatório da gestação por meio da constatação de líquido no útero e concepto. Para o cálculo da sensibilidade, especificidade e acurácia do diagnóstico de gestação a partir do D12 e D17 (diagnóstico preditivo) comparado ao D30 (diagnóstico confirmatório), considerou-se como fêmea “não gestante” ovelhas com grau de vascularização luteal 1. No D17, além da avaliação luteal, também foi observado a presença ou não de líquido uterino na categorização da gestação. O grau de vascularização sobre a gestação (positivo x negativo) foi avaliado pelo teste de Wilcoxon (signed-rank test) a 5% de significância. Foi verificado efeito de grau de vascularização luteal sobre o diagnóstico de gestação ( $P < 0,05$ ). No D12, obteve-se 84,1% de sensibilidade, 42,7% de especificidade e 74,1% de acurácia na adoção do grau de vascularização sobre a predição da gestação. No D17, obteve-se 70,5% de sensibilidade, 85,71% de especificidade e 74,2% de acurácia na adoção do grau de vascularização sobre a predição da gestação. Ao associar a presença ou não de líquido no útero ao grau de vascularização luteal sobre a predição da gestação, no D17, obteve-se 100% de sensibilidade, especificidade e acurácia. O diagnóstico da gestação realizado no 12º dia pós-cobertura foi capaz de prever cerca de 85% das ovelhas que ficaram gestantes. Todavia, no 17º dia ao associar o grau de vascularização a presença de líquido intrauterino obteve 100% de acurácia no diagnóstico da gestação. A avaliação ultrassonográfica modo Doppler no 17º dia pós-cobertura em ovelhas mestiças é eficiente na detecção da gestação precoce.

Suporte financeiro: CNPq, Faperj e Embrapa (Projeto 02.13.06.026.00.00).

**Palavras-chave:** Ultrassonografia; prenhez; vascularização luteal

SBTE 176 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Número de submissão 1508

#### **Blastulação precoce de embriões bovinos melhora o desenvolvimento pos eclosao *in vitro***

Edwin Mellisho-Salas; Alejandra Velasquez; Lleretny Rodriguez-Alvarez

Laboratório de Biotecnologia Animal, Departamento de Ciência Animal, Faculdade de Veterinária da Uni, Chillán, Region Bio Bio, Chile, Chile.

A formação de blastocistos é um evento essencial no desenvolvimento pré-implantação. O sistema de pós-eclosão de desenvolvimento é uma ferramenta muito útil para a avaliação da viabilidade de embriões bovinos. O objetivo deste estudo foi avaliar o tempo da blastulação como preditor da competência de embriões bovinos. Ovários bovinos foram coletados em um abatedouro e transportados dentro de 2 horas para o laboratório. Complexos-cumulus-oócitos (CCOs) foram recuperados por punção folicular com uma agulha de 20G e uma seringa. Os CCOs recuperados (qualidade 1 e 2) foram maturados em placas de quatro poços (30 CCOs por 500 µl poço) durante 22-23 h. Oócitos foram fertilizados com sêmen descongelado, o qual foi testado em experimentos anteriores com boa produção de blastocisto (controle de touro). Após a



FIV os zigotos foram cultivados *in vitro* (CIV) em placas de 4 poços (30 zigotos 500 ul por poço) utilizando meio de cultura SOFaa a 39C sob 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub> até a fase de mórula (dia 5 pós FIV). Após este período, as mórulas foram cultivadas individualmente em placas de 96 pocos a 39C sob mistura de gases (CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>) até a formação da blastocele (dia de cultivo - 6,5 e 7,5), as quais foram monitoradas individualmente para a análise de desenvolvimento pós eclosão (dia 11). Primeiramente foi determinada a taxa de eclosão dos blastocistos obtidos nos dias 6,5 e 7,5. O desenvolvimento pós eclosão foi avaliado considerando duas variáveis: tamanho (> 250 um) e contagem total de células (> 350 blastômeros). A análise de comparação entre os grupos foram realizadas pelo teste de duas proporções independentes, enquanto que a análise de correlação foram realizadas pelo teste de Pearson utilizando o programa InfoStat (Buenos Aires, Argentina). As diferenças foram consideradas significativas para  $p < 0,05$ . No dia 5 após a FIV, a taxa de mórula foi de 35,7% (278/778). A taxa de blastulação precoce (dia-6,5) foi de 40,3% (112/278), enquanto que a taxa blastulação tardia (dia 7,5) foi de 20,5% (57/278), mostrando uma diferença significativa ( $p < 0,0001$ ). Os embriões derivados de blastulação precoce (dia 6,5) têm maior probabilidade de desenvolvimento pós eclosão (39,3%: 44/112) observado no dia 11 do CIV comparada com a blastulação tardia (dia-a 7,5; 10,5% (6/57);  $p = 0,0001$ ). Além disso, a blastulação precoce mostram uma correlação mediano ( $r = -0,30$ ;  $p = 0,0001$ ) com o desenvolvimento pós eclosão (dia 11). O diâmetro do blastocisto ( $158,3 \pm 17,9$  mm; blastulação precoce e  $166,8 \pm 24,5$ µm; blastulação tardia) tiveram uma baixa correlação com o desenvolvimento pós eclosão ( $r = 0,16$ ;  $p = 0,04$ ). No Dia-11, embriões derivados de blastocistos iniciais têm um diâmetro superior e número total de células (425µm; 654 células) comparados com os blastocistos derivados mais tarde (367µm; 595 células) ( $p < 0,05$  para ambos os parâmetros). Concluímos que o tempo de blastulação afeta o futuro desenvolvimento do embrião bovino e que a blastulação precoce pode ser uma ferramenta simples para melhorar a seleção de embriões produzidos *in vitro*.

**Palavras-chave:** Blastulação; embriões; bovinos

SBTE 177 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Número de submissão 1512

**Caracterização e comparação do perfil de miRNAs em vesículas extracelulares no oviduto ao longo do ciclo estral**

Carmen Alminana Brines

*INRA, Nouzilly, França.*

Vesículas extracelulares (EVs), exossomos e microvesículas foram indicadas como novos veículos regulatórios que medeiam as interações gameta/embrião/tuba uterina por meio da transferência de RNAs e proteínas contidas em sua carga molecular. Uma vez que o epitélio da tuba uterina é regulado por estrógenos e progesterona ao longo do ciclo estral, afetando a expressão de RNAs e a secreção de proteínas no fluido tubárico, hipotetizamos que estes possam também ter um impacto no conteúdo de EVs e sua secreção na tuba uterina. Portanto, o objetivo de nosso estudo foi decifrar as assinaturas de miRNAs da tuba uterina ao longo do ciclo estral e sua possível ação nos gametas e embriões. Pares de tubas uterinas com seus ovários foram coletados de vacas cíclicas (contendo corpo lúteo, CL) em abatedouro local. O estágio do ciclo estral foi assessorado pela morfologia do CL e da população folicular: Estágio 1: folículo recém-ovulado; Estágio 2: desenvolvimento inicial do CL; Estágio 3: CL amarelo ou laranja e Estágio 4: CL em regressão e um grande folículo ovulatório presente. Subsequentemente as tubas uterinas foram lavadas e seu fluido coletado. EVs foram isoladas por ultracentrifugação. O RNA foi isolado das amostras de EVs (n=20 amostras, 4 estágios, 5 réplicas) utilizando-se o Mini kit miRNeasy (QIAGEN). Foram preparadas bibliotecas de miRNAs por meio do NEXTflex™ Small RNA-Seq Kit (Bioo Scientific) e subsequente sequenciamento em aparelho Illumina HiSeq 2500. Os dados de sequenciamento obtidos foram processados utilizando-se um fluxograma integrado na plataforma Galaxy local. Aproximadamente 250 diferentes miRNAs e genes de RNA ribossomal foram identificados. Entre eles encontramos 150 microRNAs (miRNA), 22 RNAs de transferência (tRNA) e 45 pequenos RNAs nucleolares (SNORD, SNORA). Adicionalmente, RNAs envolvidos na tradução para proteína (7SL), regulação da transcrição (7SK), e replicação do DNA (Y RNA) foram identificados. A análise de miRNAs nas EVs tubáricas revelou perfis de expressão diferentes ao longo do ciclo estral bovino (normalização e análise estatística, pacote Bioconductor R, EdgeR). Doze miRNAs foram considerados diferencialmente expressos entre os estágios (ANOVA; FDR 5%). Entre eles, miR-10b envolvido na ativação da proliferação celular e miR24-na regulação dos genes relacionados às vias de sobrevivência foram identificados e associados ao desenvolvimento inicial do embrião. MiR-449a, associado à infertilidade masculina e feminina também foi encontrado. Nosso estudo representa o primeiro screening para miRNAs nas EVs de tuba uterina. A caracterização das EVs derivadas da tuba uterina sob diferentes condições hormonais extenderá nossa compreensão do processo regulatório das EVs nas interações gameta/embrio-maternal e as possíveis ações na regulação da expressão gênica do embrião em desenvolvimento.

Financiado por EU-AgreenSkills267196, INRA-PHASE, EU-FECUND312097 e COST Action-EPICONCEPT FA1201.

**Palavras-chave:** vesículas extracelulares, oviduto, gametas/embrião comunicação materna

SBTE 178 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Número de submissão 1513

**Regulação da resposta ao estresse oxidativo por miRNAs em blastocistos bovinos produzidos *in vitro***

Monalisa Medrado Bomfim; Juliano Coelho da Silveira; Flavio Vieira Meirelles; Felipe Perecin

*Universidade de São Paulo, Pirassununga, Sp, Brasil.*

O cultivo *in vitro* (CIV) de embriões bovinos expõe o conceito a condições diferentes do ambiente intra-tubárico-uterino. A alta tensão de oxigênio durante a CIV induz o agravamento do estresse oxidativo mediante aumento da concentração das espécies reativas de oxigênio (EROs). RNAs não codificadores entre 18-26 nucleotídeos, conhecidos como microRNAs, são responsáveis pela regulação pós-transcricional, e apontados como importantes mediadores da resposta ao estresse celular. A compreensão dos mecanismos moleculares atuantes na resposta celular ao estresse através de moduladores como microRNAs pode auxiliar no esclarecimento dos efeitos da CIV em bovinos. Nossa hipótese é que o estresse oxidativo altera os níveis de miRNAs envolvidos na regulação de vias relacionadas à defesa aos danos causados pelas EROS. Este estudo visa determinar quais os principais miRNAs envolvidos em vias de resposta ao estresse oxidativo em dois modelos de ambiente de cultivo distintos, alta (20%) e baixa (5%) tensão de O<sub>2</sub>. Grupos de 10 blastocistos bovinos produzidos por FIV e cultivados em diferentes tensões de O<sub>2</sub> tiveram o RNA extraído através do mini kit miRNeasy. A transcrição reversa foi realizada com miScriptII RT permitindo a quantificação de miRNAs maduros e imaturos. As amostras foram analisadas quanto ao perfil de expressão por RT-PCR de 348 miRNAs candidatos e 3 endógenos (RNU43 snoRNA, Hm/MS/Rt T1 snRNA e bta-miR-99b). As possíveis funções dos miRNAs foram exploradas com uso da base de dados mirBase e do software DIANA TOOLS. Resultados indicaram a expressão de 324 miRNAs, sendo 7 exclusivos do ambiente de alta tensão de O<sub>2</sub> e 5 exclusivos para baixa tensão de O<sub>2</sub>. Entre os miRNAs expressos em ambos os sistemas de cultivo foram estudadas as possíveis funções daqueles com diferença de expressão maior ou igual a 2 Cts, resultando em 20 miRNAs candidatos mais expressos em blastocistos cultivados em alta tensão de O<sub>2</sub> em comparação com os blastocistos cultivados em baixa tensão de O<sub>2</sub>. O estudo das possíveis vias reguladas, sugerem que os miRNAs encontrados regulam a via de sinalização FOXO (subclasse O da família forkhead de fatores de transcrição) e a via de processamento de proteínas no

retículo endoplasmático, que condicionam à resistência ao estresse oxidativo e reparo do DNA. As alterações na regulação da via FOXO foram observadas, principalmente, no sistema de cultivo em alta tensão, com potenciais repercussões em resposta celular de proliferação e apoptose. O cultivo em alta tensão O<sub>2</sub> também induziu aumento da regulação da via de processamento proteico no retículo endoplasmático, o que pode estar relacionado a respostas de estresse associada a falhas de dobramento proteico. Em conclusão, as diferentes atmosferas de cultivo induzem expressão diferencial de miRNAs potencialmente associados à regulação de processos fundamentais para a resposta ao estresse oxidativo.

Suporte financeiro FAPESP (processos 2014/21034-3 e 2014/21042-6).

**Palavras-chave:** MicroRNA; EROs; desenvolvimento embrionário

SBTE 179 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Número de submissão 1514

**Análise bacteriológica, citológica e histopatológica do trato reprodutivo de vacas de abate**

Julia Brum Spreckelsen Casarin<sup>1</sup>; Janislene Mach Trentin<sup>2</sup>; Mariani Farias Fiorenza<sup>2</sup>; Mara Iolanda Batistella Rubin<sup>1</sup>; Ana Paula Martini<sup>1</sup>; Taison Souza Balestrin<sup>1</sup>; Gilson Antonio Pessoa<sup>1</sup>; Severo Sales de Barros<sup>1</sup>; Luiz Augusto Machado Centeno<sup>1</sup>; Guilherme Machado Zanatta<sup>1</sup>

1.Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil; 2.Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

Problemas reprodutivos ocasionam severas perdas econômicas em rebanhos de leite e corte (HUSZENICZA, *Reproduction in Domestic Animals*, v.34, p.237–245, 1999; MOSCUZZA, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, v.39, p.34-41, 2015). Este estudo avaliou a eficiência dos métodos de diagnóstico aplicados ao trato reprodutivo da fêmea. A presença de bactérias (cultura), presença de polimorfonucleares (PMN) (citologia-Citobrush), de secreção e lesão (macroscopia) na vagina, cérvix e útero; e lesão microscópica no endométrio (histopatologia uterina) foram mensurados em 23 tratamentos reprodutivos obtidos após o abate em frigorífico. Para análise estatística usou-se o Teste de Qui quadrado. Na porção vaginal 8,69% (2/23) das amostras apresentaram secreção muco turva e 30,43% (7/23) muco cristalino. À citologia 34,78% (8/23) apresentaram presença de PMN  $\geq$  a 10%. A cultura apresentou 13,04% (3/23) de crescimento bacteriano, sendo *Trueperella pyogenes* 4,35% (1/23) e *Escherichia coli* 8,69% (2/23). Na porção vaginal houve concordância entre os exames bacteriológico vs citologia ( $P = 0,0019$ ); e bacteriológico vs avaliação macroscópica da secreção ( $P = 0,000008$ ). Na porção cervical em 8,69% (2/23) das amostras detectou-se muco turvo e 8,69% (2/23) muco cristalino. A citologia revelou 13,04% (3/23) das amostras com PMN  $\geq$  10%. A cultura bacteriana revelou crescimento de *Enterococcus faecalis* em 4,35% (1/23) e gram negativo oxidase positiva em 4,35% (1/23) das amostras. No útero, 8,69% (2/23) apresentaram muco cristalino, 4,35% (1/23) muco sanguinolento, 4,35% (1/23) muco purulento e em 4,35% (1/23) o útero apresentou-se hemorrágico e edematoso. Na citologia, apenas uma (1/23) amostra positiva para o exame bacteriológico (*Staphylococcus epidermidis*) e PMN. Esta mesma amostra apresentou lesão endometrial grave. A análise histopatológica revelou 21,73% (5/23) com lesão moderada no endométrio e 17,39% (4/23) lesão grave. Houve concordância dos exames bacteriológico vs histológico ( $P = 0,0006$ ), histológico vs avaliação macroscópica da secreção ( $P = 0,0103$ ) e histológico vs PMN ( $P = 0,0001$ ). Não houve concordância do exame bacteriológico vs PMN ( $P = 0,3$ ). No entanto, houve tendência entre o macroscópico vs PMN ( $P = 0,06$ ). Verificou-se que a associação de cultura, característica da secreção, citologia e histopatologia são necessários para o diagnóstico preciso da saúde do trato reprodutivo. A detecção de sinais de inflamação, tais como secreção sanguinolenta/purulenta e infiltrados inflamatórios não correspondeu a presença de cultura bacteriana positiva, indicando que houve uma eficiente resposta imunológica às contaminações do trato reprodutivo.

**Palavras-chave:** Endometrite; polimorfonucleares; saúde uterina

SBTE 180 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Número de submissão 1517

**Suplementação com melatonina durante a maturação *in vitro* na ausência de gonadotrofinas recupera o desenvolvimento embrionário e reduz o estresse oxidativo em embriões bovinos produzidos *in vitro***

Priscila Chediek Dall Acqua<sup>1</sup>; Marcela Ambroggi<sup>1</sup>; Nathália Alves de Souza Rocha-Frigoni<sup>2</sup>; Beatriz Caetano da Silva Leão<sup>2</sup>; Luana Teixeira Rodrigues<sup>2</sup>; Gisele Zoccal Mingoti<sup>3</sup>

1.Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, FCAV - UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil; 2.Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium - Unisalesiano, Araçatuba, SP, Brasil; 3.Laboratório de Fisiologia da Reprodução, Faculdade de Medicina Veterinária, FMVA - UNESP, Araçatuba, SP, Brasil.

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da melatonina (MT) na promoção da maturação nuclear e na aquisição da competência para o desenvolvimento embrionário em oócitos bovinos maturados *in vitro* na ausência de gonadotrofinas. Adicionalmente, foi avaliada a proteção contra espécies reativas do oxigênio (ROS) em oócitos e embriões. Para tanto, oócitos (n=807) foram maturados por 22h à 38,5°C e 5% CO<sub>2</sub> em ar em 500 µL de B199 (TCM-199 com bicarbonato) com 10% SFB (Controle sem gonadotrofinas – CS), suplementado com 10<sup>-5</sup>M (MT5), 10<sup>-7</sup>M (MT7) ou 10<sup>-9</sup>M (MT9) de MT; o grupo controle (C) foi maturado em B199 com 10% SFB, 0,5 mg/mL FSH e 100 UI/mL hCG. Após a MIV, uma amostra de oócitos foi corada com 1 µg/mL Hoechst 33342 para avaliação da maturação nuclear. Para determinar o conteúdo

intracelular de ROS, os oócitos maduros foram corados com 5  $\mu$ M CellROX®Green (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) e avaliados imediatamente em microscópio equipado com epifluorescência. As imagens obtidas foram analisadas pelo software ImageJ. O grupo C foi escolhido como calibrador e a média do valor mensurado de cada grupo foi dividida pela média do calibrador para calcular a fluorescência relativa, expressa em unidades arbitrárias de fluorescência. Os demais oócitos foram fecundados (Dia=0) e os prováveis zigotos cultivados em SOF à 38,5°C e 5% CO<sub>2</sub> em ar por 7 dias. As taxas de clivagem e de desenvolvimento embrionário foram avaliadas nos dias 3 e 7 do CIV, respectivamente. Os blastocistos foram corados para avaliação do conteúdo intracelular de ROS. Os dados foram analisados por ANOVA, seguida do teste de Tukey ( $P<0,05$ ) e estão apresentados como média $\pm$ EPM. A ausência de gonadotrofinas associada à presença de diferentes concentrações de MT não influenciou a maturação nuclear, visto que não houve diferença ( $P>0,05$ ) na taxa de metáfase II (MII) comparado ao grupo C (65,7 $\pm$ 8,0% a 73,6 $\pm$ 4,2%). O conteúdo de ROS em oócitos não diferiu ( $P>0,05$ ) entre os grupos (0,8 $\pm$ 0,0 a 1,0 $\pm$ 0,0). As taxas de clivagem foram menores ( $P<0,05$ ) em todos os grupos maturados sem gonadotrofinas (56,6 $\pm$ 7,4% a 59,8 $\pm$ 2,2%) em comparação com C (80,6 $\pm$ 2,6). A produção de blastocistos foi maior ( $P<0,05$ ) no grupo C (43,8 $\pm$ 2,6%) comparado com MT5 (15,9 $\pm$ 3,7%) e CS (28,5 $\pm$ 3,3%), mas não diferiu ( $P>0,05$ ) de MT7 (32,0 $\pm$ 2,9%) e MT9 (37,4 $\pm$ 2,2%). No entanto, o conteúdo de ROS nos blastocistos do grupo C (1,0 $\pm$ 0,1) foi maior ( $P<0,05$ ) do que MT9 (0,8 $\pm$ 0,1) e CS (0,6 $\pm$ 0,0), mas não diferiu ( $P>0,05$ ) de MT5 (0,9 $\pm$ 0,1) e MT7 (0,8 $\pm$ 0,1). Em conclusão, a ausência de gonadotrofinas durante a MIV, na presença de SFB e associada à diferentes concentrações de MT, não alterou as taxas de MII. Embora a MT não tenha promovido proteção antioxidante na redução de ROS em oócitos, a adição de 10<sup>-9</sup> M de MT resultou em taxas de blastocistos semelhantes às obtidas com oócitos maturados na presença de gonadotrofinas, além de reduzir o conteúdo de ROS nos blastocistos.

Agradecimentos: FAPESP (#2013/07382-6) e CAPES.

**Palavras-chave:** Antioxidante; oócito; espécies reativas do oxigênio

SBTE 181 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Número de submissão 1519

#### **Efeitos da modulação do estresse oxidativo e do teor de lipídios sobre o potencial de desenvolvimento, qualidade e criotolerância de embriões bovinos produzidos *in vitro***

Giovana Barros Nunes<sup>1</sup>; Priscila Chediek Dall Acqua<sup>1</sup>; Marcela Ambrogi<sup>1</sup>; Beatriz Caetano da Silva Leão<sup>2</sup>; Nathália Alves de Souza Rocha-Frigoni<sup>2</sup>; Gisele Zoccal Mingoti<sup>1</sup>

1.Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, FCAV - UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil; 2.Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium, UNISALESIANO, Araçatuba, SP, Brasil.

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da suplementação com antioxidantes durante a MIV e com estimulador da lipólise (Forskolina: Fsk) e/ou inibidor da lipogênese (Ácido Linoleico Conjugado: CLA) durante o CIV, sobre o desenvolvimento, qualidade (determinada pela quantificação do teor lipídico e conteúdo intracelular de espécies reativas de oxigênio: ROS) e criotolerância embrionária. Oócitos (n=1025) foram maturados em 500  $\mu$ L de meio TCM-199 com bicarbonato, hormônios e 10% SFB (MIV controle), suplementado com mistura de antioxidantes (100  $\mu$ M cisteamina, 0,6 mM cisteína e 100 UI catalase; MIV Atx) por 24h a 38,5°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após a FIV, os prováveis zigotos foram cultivados em meio SOF com 0,5% BSA e 2,5% SFB (CIV controle), acrescido de 100  $\mu$ M CLA durante todo o período do CIV (7 dias; CIV CLA) e/ou com 5  $\mu$ M Fsk a partir do dia 6 do CIV (CIV Fsk). Assim, os tratamentos foram: MIV e CIV controle (C); MIV Atx e CIV controle (A); MIV Atx e CIV CLA (A+CLA); MIV Atx e CIV Fsk (A+Fsk); e MIV Atx e CIV CLA+Fsk (A+CLA+Fsk). A clivagem e desenvolvimento embrionário foram avaliados nos dias 3 e 7 do CIV, respectivamente. Blastocistos iniciais (Bi) e blastocistos (Bl) foram corados com 5  $\mu$ M de H2DCFDA (Molecular Probes, Invitrogen) para avaliação do conteúdo intracelular de ROS e com Sudan Black B 1% para avaliação do conteúdo lipídico, sendo avaliados imediatamente em microscópio invertido equipado com epifluorescência e em microscopia de luz, respectivamente. As imagens obtidas foram analisadas por Q-Capture Pro Image Software e os resultados estão expressos em unidades arbitrárias de intensidade de pixels. Blastocistos expandidos (Bx) foram vitrificados (Vitri-Ingá®, IngáMed®), aquecidos e cultivados por 24h em SOF com 20% SFB para determinação das taxas de re-expansão. Os dados foram analisados por ANOVA seguido por teste de Tukey, e as taxas de re-expansão por  $\chi^2$  ( $P<0,05$ ). As taxas de clivagem (73,9 $\pm$ 6,1% a 83,5 $\pm$ 4,9%) e produção de blastocistos (40,2 $\pm$ 3,1% a 49,6 $\pm$ 3,6%) não diferiram entre os grupos ( $P>0,05$ ), assim como o conteúdo intracelular de ROS nos embriões (1,00 $\pm$ 0,06 a 1,26 $\pm$ 0,09;  $P>0,05$ ). O conteúdo lipídico foi maior ( $P<0,05$ ) nos grupos C (1,02 $\pm$ 0,07) e A (1,02 $\pm$ 0,07) comparados com A+CLA (0,64 $\pm$ 0,04), A+Fsk (0,79 $\pm$ 0,02) e A+CLA+Fsk (0,73 $\pm$ 0,66). A taxa de re-expansão pós-aquecimento e cultivo por 24h foi maior ( $P<0,05$ ) nos grupos A+CLA (58,14%) e A+CLA+Fsk (67,65%) em comparação com A+Fsk (35,42%), entretanto, todos estes tratamentos foram semelhantes ( $P>0,05$ ) a C (55,88%) e A (45,45%). Em conclusão, não houve redução no conteúdo intracitoplasmático de ROS de embriões produzidos a partir de oócitos maturados na presença de antioxidantes, porém a suplementação do meio de cultivo com CLA e Fsk, isoladamente ou associados, reduziu o teor lipídico intracelular destes embriões. O tratamento com CLA isolado ou em associação com Fsk melhorou a criotolerância em comparação com o tratamento com Fsk.

Agradecimentos: CAPES e FAPESP (#14/10288-4).

**Palavras-chave:** Antioxidantes; lipólise; criopreservação

SBTE 182 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Número de submissão 1521

**Efeitos da suplementação com semente de girassol em fêmeas bovinas na produção de oócitos e embriões *in vitro***

Angélica Leão Baltazar<sup>1</sup>; Sheila Merlo Garcia<sup>2</sup>; Gabriel Molinari de Mattos<sup>2</sup>; Beatriz de Moraes Ropelli<sup>2</sup>; Calilê Castilho<sup>2</sup>; José Otavio Folino<sup>3</sup>; Gelci Carlos Lupatini<sup>1</sup>; Guilherme Pugliesi<sup>4</sup>; Mario Binelli<sup>4</sup>; Claudia Maria Bertan Membrive<sup>1</sup>

1.UNESP, Araçatuba, SP, Brasil; 2.UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil; 3.Quali's *in vitro*, Presidente Prudente, SP, Brasil; 4.USP, Pirassununga, SP, Brasil.

A suplementação com compostos ricos em ácido linoleico, dentre os quais inclui-se a semente de girassol, promove aumento na taxa de concepção em fêmeas bovinas. Hipotetizou-se que a suplementação com semente de girassol em doadoras de oócitos aumenta o número e a qualidade de oócitos, incrementa as taxas de clivagem e determina um aumento no número e qualidade dos blastocistos produzidos *in vitro*. Assim, objetivou-se investigar o efeito de tal suplementação, no número e qualidade de oócitos cultivados *in vitro*, na taxa de clivagem e no número e qualidade de blastocistos produzidos *in vitro*. Para tanto, cinco vacas e vinte e cinco novilhas (n=30) Nelore foram divididas em dois grupos para receberem um dos seguintes tratamentos: 1,7 kg/dia de suplemento contendo 53% de farelo de soja com 44% de PB e 47% de milho (Grupo Controle - Grupo C; n= 15) ou 1,7 kg/dia de suplemento contendo 40% de farelo de soja com 44% de proteína bruta (PB) e 60% de semente de girassol (Grupo Girassol - Grupo G; n= 15), durante 57 dias. As fêmeas foram submetidas à aspiração folicular nos dias D0, D13, D29, D43, D56 e D77 (D0= início da suplementação; D56= término da suplementação). Os oócitos foram submetidos ao processo de produção de embriões *in vitro*. Os dados foram analisados pelo programa Mixed procedure (SAS) versão 9.2, pelo teste ANOVA modelo misto. Não se observou diferença entre os Grupos C e G no número de folículos visualizados ( $16,85 \pm 1,32$  vs.  $16,12 \pm 1,48$ ); número de oócitos aspirados ( $13,80 \pm 1,27$  vs.  $13,05 \pm 1,25$ ); taxa de recuperação ( $82 \pm 1\%$  vs.  $80 \pm 2\%$ ); taxa de clivagem ( $76,32 \pm 1,58\%$  vs.  $76,78 \pm 2,11\%$ ); número de embriões ( $10,79 \pm 0,94$  vs.  $10,08 \pm 1,01$ ); número de blastocistos ( $5,89 \pm 0,66$  vs.  $4,48 \pm 0,6$ ); número de embriões Grau I e II ( $5,49 \pm 0,64$  vs.  $4,17 \pm 0,57$ ); concentrações plasmáticas de colesterol total ( $85,76 \pm 1,20$  vs.  $87,11 \pm 1,18$  mg/dL), triglicerídeos ( $14,98 \pm 0,29$  vs.  $14,26 \pm 0,27$  mg/dL); HDL ( $35,12 \pm 1,10$  vs.  $35,40 \pm 1,0$  mg/dL) e LDL ( $47,92 \pm 1,58$  vs.  $48,85 \pm 1,51$  mg/dL), para os respectivos grupos. Conclui-se que a suplementação com semente de girassol em doadoras de oócitos não incrementou o número e a qualidade de oócitos, as taxas de clivagem e o número e qualidade dos blastocistos produzidos *in vitro*.

Agradecimentos: CAPES, FUNDUNESP, Laboratório Quali's *in vitro*, PROGEST e Fazenda Experimental da UNOESTE.

**Palavras-chave:** Acido linoleico; omega 3; bovino

SBTE 183 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Número de submissão 1522

**Pré-maturação de oócitos bovinos com moduladores de AMPC e antioxidantes durante o transporte: efeitos sobre o desenvolvimento embrionário e criotolerância**

Marcela Ambrogi<sup>1</sup>; Priscila Chediek Dall Acqua<sup>1</sup>; Beatriz Caetano da Silva Leão<sup>2</sup>; Nathália Alves de Souza Rocha-Frigoni<sup>2</sup>; Giovana Barros Nunes<sup>1</sup>; Luana Teixeira Rodrigues<sup>2</sup>; Gisele Zoccal Mingoti<sup>1</sup>

1.Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, FCAV - UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil; 2.Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium, UNISALESIANO, Araçatuba, SP, Brasil.

O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da suplementação com inibidores da meiose e antioxidantes durante o transporte de oócitos bovinos por 6 horas sobre o subsequente desenvolvimento e criotolerância embrionária. Oócitos (n=1.115) foram transportados em incubadora portátil (Minitub<sup>®</sup>) durante 6 horas, em 400 mL de meio base de transporte (MBT: TCM-199 com 0,3% BSA e antibiótico), de acordo com os tratamentos: 1) grupo Transp Contr: transporte em MBT; 2) grupo Transp Contr+Atx: transporte em MBT suplementado com mistura de antioxidantes (100 µM cisteamina, 0,6 mM cisteína e 100 UI catalase); 3) grupo Transp Pré-MIV: transporte em MBT suplementado com inibidores da meiose (100 µM forscolina e 500 µM IBMX); e 4) grupo Transp Pré-MIV+Atx: transporte em MBT suplementado com inibidores da meiose e mistura de antioxidantes. Após o transporte, os oócitos foram maturados por 18 horas (total do cultivo = 24h) em 100 mL de meio MIV (TCM-199 suplementado com bicarbonato, hormônios e 10% SFB), em incubadora a 38,5°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Um grupo controle adicional foi incluído no experimento (grupo Contr), cujos oócitos foram maturados em meio MIV, em incubadora por 24h. Após a fertilização, os prováveis zigotos foram cultivados *in vitro* em meio SOFaa com 5 mg/mL BSA e 2,5% SFB por 7 dias. As taxas de clivagem e de blastocistos foram avaliadas no dia 3 e 7, respectivamente (FIV= Dia 0). No dia 7, os blastocistos foram vitrificados (Ingamed<sup>®</sup>, Maringá – PR, Brasil) e, após o aquecimento, foram cultivados por 24h para avaliação da taxa de re-expansão. O modelo estatístico foi um fatorial 2x2 (efeito dos inibidores no meio de transporte, antioxidantes e interações). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, incluindo uma testemunha adicional (Contr). Como não houveram interações significativas (P>0,05) apenas os efeitos principais estão apresentados. Os dados da re-expansão embrionário foram avaliados pelo teste do Qui-quadrado (P<0,05). As taxas de clivagem e de produção de blastocistos não foram afetadas (P>0,05) pelos inibidores da meiose (com inibidor:  $76,3 \pm 1,6\%$  e  $38,3 \pm 2,7\%$ ; sem inibidor:  $81,0 \pm 2,1\%$  e  $37,6 \pm 2,8\%$ ; respectivamente) e não diferiram do grupo Contr ( $83,4 \pm 2,7\%$  e  $39,8 \pm 4,5\%$ , respectivamente). Da mesma forma, as taxas de clivagem e blastocisto não foram afetadas

( $P>0,05$ ) pelos antioxidantes (com atx:  $76,8\pm2,0\%$  e  $36,0\pm2,6\%$ ; sem atx:  $80,6\pm1,6\%$  e  $39,9\pm2,7\%$ ; respectivamente) e não diferiram do grupo Contr ( $83,4\pm2,7\%$  e  $39,8\pm4,5\%$ , respectivamente). A re-expansão embrionária pós-aquecimento foi semelhante ( $P>0,05$ ) entre os tratamentos (50,0% a 71,4%). Em conclusão, o transporte de oócitos bovinos em meio suplementado com bloqueadores da meiose e/ou antioxidantes, pelo período de 6 horas, não afetou a produção de embriões *in vitro*, assim como a criotolerância dos mesmos. Estudos adicionais deverão ser conduzidos para avaliar a manutenção da qualidade dos oócitos durante o transporte por períodos de tempo mais prolongados.

**Palavras-chave:** Inibidores da meiose; antioxidantes; transporte oócito bovino

SBTE 184 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Número de submissão 1523

**Efeito da L-carnitina e o isômero *trans-10, cis-12* do CLA durante o cultivo no desenvolvimento embrionário e conteúdo lipídico de embriões bovinos produzidos *in vitro***

Luzia Renata Oliveira Dias<sup>1</sup>; Ligiane Oliveira Leme<sup>1</sup>; José Felipe Warmling Sprícigo<sup>2</sup>; Margot Alves Nunes Dode<sup>3</sup>; Ivo Pivato<sup>1</sup>

1.Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil; 2.Instituto Federal Catarinense, Concórdia, SC, Brasil; 3.EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil.

A criopreservação de embriões PIV é afetada pelas altas concentrações de gotículas lipídicas que se acumulam no interior dos blastômeros. Portanto, a remoção parcial de lipídios intracitoplasmáticos, por estímulo da lipólise química no citoplasma celular ou pela diminuição da captação e síntese de ácidos graxos pelas células, pode ser uma alternativa para melhorar a criopreservação desses embriões. Neste sentido, objetivou-se estimar o efeito de agentes delipidantes, L-carnitina e o isômero *trans-10, cis-12* do CLA, durante o cultivo na quantidade, qualidade e conteúdo de lipídios de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Foram utilizados 2.448 ovócitos de grau 1 e 2 obtidos de ovários de abatedouro, que foram maturados *in vitro* por 24h a  $38,5^{\circ}\text{C}$ , 5% de  $\text{CO}_2$ . Após a co-incubação dos COC com os espermatozoides (16-18 horas), os possíveis zigotos foram distribuídos em quatro tratamentos: T1) Controle (n=616): meio SOF, suplementado com 5% de SFB (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA); T2) L-carnitina (n=648): meio SOF suplementado com 5% de SFB, acrescido de 0,6 mg mL<sup>-1</sup> de L-carnitina (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA); T3) CLA (ácido linoleico conjugado) (n=627): meio SOF suplementado com 5% de SFB, acrescido de 100  $\mu\text{M}$  de *trans-10 cis-12* CLA (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA); e T4) L-carnitina+CLA (n=597): meio SOF suplementado com 5% de SFB, acrescido de 0,6 mg mL<sup>-1</sup> de L-carnitina e 100  $\mu\text{M}$  de *trans-10 cis-12* CLA. As taxas de clivagem e blastocisto foram avaliadas no D2 e D7 de cultivo e, os blastocistos expandidos (Bx) foram armazenados para quantificação de lipídios utilizando o corante Sudan Black B (Sudano et al. 2012. Biology of Reproduction, v.87, p.1-11). Os dados de produção de embriões foram analisados pelo teste Chi-quadrado ( $P<0,05$ ) e os de quantificação de lipídios por análise de variância (ANOVA) ( $P<0,05$ ). A taxa de clivagem foi semelhante ( $P>0,05$ ) entre todos os tratamentos (T1= $95\pm4,3$ ; T2= $95\pm3,5$ ; T3= $95\pm3,7$  e T4= $95\pm3,1$ ). A taxa de blastocisto foi superior ( $P<0,05$ ) no grupo controle do que nos demais tratamentos que não diferiram ( $P>0,05$ ) entre si tanto no D6 (T1= $19\pm2,7$ ; T2= $13\pm2,4$ ; T3= $14\pm2,6$  e T4= $13\pm2,6$ ) e quanto no D7 de cultivo (T1= $49\pm3,5$ ; T2= $39\pm3,0$ ; T3= $42\pm3,9$  e T4= $39\pm3,9$ ). Não foi observada diferença entre os tratamentos ( $P>0,05$ ) quanto à velocidade de desenvolvimento, sendo que em todos os grupos a maioria dos embriões de D7 encontravam-se no estágio de blastocisto expandido. Os embriões do T2 apresentaram menor quantidade de lipídios no citoplasma do que os de T1 ( $P=0,0138$ ) e de T3 ( $P=0,0261$ ), sendo que os do T4 semelhante ( $P>0,05$ ) aos demais tratamentos. Os resultados obtidos indicaram que a suplementação com agentes delipidantes não afeta a qualidade mas afeta negativamente a produção de embriões. Entretanto, a presença de L-carnitina durante o CIV diminuiu a quantidade de lipídios sugerindo que sua utilização pode resultar em embriões com maior resistência a criopreservação.

**Palavras-chave:** Bovino; criopreservação; embrião

SBTE 185 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Número de submissão 1530

**Comparação entre atmosferas com baixo ou elevado nível de oxigênio no cultivo de embriões bovinos partenogenéticos**

Carla Fabiana Gomes de Jesus; Lina Castelo Branco Motta; Dárcio Ítalo Alves Teixeira; Luciana Magalhães Melo; Maajid Hassan Bhat; Vicente José de Figueirêdo Freitas

UECE, Fortaleza, CE, Brasil.

Durante o cultivo de embriões, a tradicional atmosfera com 5% de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) no ar (aproximadamente 20% oxigênio [ $\text{O}_2$ ]) tem um nível mais elevado de  $\text{O}_2$  que o fisiologicamente encontrado na tuba uterina e útero. Esta condição pode causar a formação de radicais reativos ao oxigênio altamente citotóxicos e prejudiciais ao embrião. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi comparar o cultivo de embriões bovinos produzidos por partenogênese e cultivados em 5%  $\text{CO}_2$  no ar (dois gases) com 5%  $\text{CO}_2$ , 5%  $\text{O}_2$  e 90%  $\text{N}_2$  (três gases). Os ovários usados para obtenção dos complexos cumulus-oócito (CCOs) foram originários de abatedouros locais. Os COCs foram selecionados e maturados *in vitro* em TCM-199 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), sob óleo mineral, e colocado em estufa com 5%  $\text{CO}_2$  e  $38,5^{\circ}\text{C}$  por 26

h. Após a maturação, os CCOs foram desnudados em TCM-199 com hialuronidase por 3 min no vortex. Um total de 472 oócitos foram ativados quimicamente com uso de 5  $\mu$ M ionomicina, por 5 min, e 2 mM 6-DMAP, por 6 h. Posteriormente, os presumíveis embriões foram aleatoriamente divididos em dois grupos: cultivo em dois (2G) ou três gases (3G). Os embriões em 2G (n=237) foram cultivados em estufa (Thermo 3110, Thermo Fisher Sci., Marietta, EUA) com 5% CO<sub>2</sub> e 38.5°C, enquanto aqueles em 3G (n=235) foram cultivados em uma mini-estufa (Eve, WTA Tec. Apl., Cravinhos, Brasil) com 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> e 90% N<sub>2</sub> a 38.5°C. O cultivo foi realizado por nove dias em meio SOF com 5% SFB. Em ambos os grupos, no terceiro dia de cultivo, foi adicionado 2% de B-27 ao meio de cultivo. A produção de embriões foi observada aos três, sete e nove dias de cultivo para verificar as taxas de clivagem, blastocisto e eclosão. Os percentuais foram comparados utilizando o teste exato de Fisher, considerando diferenças significativas quando  $P < 0.05$ . A taxa de clivagem foi mais elevada ( $P < 0.05$ ) em 2G (92,8%) que no grupo 3G (86,0%). A taxa de blastocisto foi similar entre grupos: 28,7% (2G) e 31,1% (3G). No que se refere à taxa de eclosão, os valores mais elevados ( $P < 0.05$ ) foram observados em 3G (14,9%) quando comparados ao grupo 2G (5,1%). Em conclusão, o desenvolvimento final de embriões bovinos partenogênicos teve um efeito positivo quando cultivados em uma atmosfera de baixo nível de oxigênio.

**Palavras-chave:** Bovino; partenogênese; cultivo embrionário

SBTE 186 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Número de submissão 1539

**A adição do soro de vacas no pós- parto recente influencia o desenvolvimento embrionário inicial?**

Letícia Franco Collares<sup>1</sup>; Joao Alveiro Alvarado Rincón<sup>1</sup>; Bruna Mion<sup>1</sup>; Patricia Carvalho Gindri<sup>2</sup>; Morgana Alves Borges<sup>1</sup>; Janaina Fadrique da Silva<sup>1</sup>; Jorgea Pradié<sup>1</sup>; Ligia Margareth Cantarelli Pegoraro<sup>3</sup>; Augusto Schneider<sup>1</sup>; Marcio Nunes Correa<sup>1</sup>

1.Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil; 2.Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, Ijuí, RS, Brasil; 3.EMBRAPA Clima Temperado, Pelotas, RS, Brasil.

O período de transição de vacas leiteiras ocorre entre as últimas três semanas de gestação e as três primeiras semanas de lactação e caracteriza-se por várias alterações metabólicas. Com o aumento da demanda nutricional nesse período, a ingestão alimentar não é suficiente para suprir as necessidades individuais, levando ao balanço energético negativo (BEN). Sabe-se que o BEN tem influência direta sob a fertilidade, afetando de forma negativa a maturação oocitária, a expansão das células do cumulus e o desenvolvimento embrionário inicial. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da adição de soro sanguíneo de vacas leiteiras no pós-parto recente e no final da lactação no meio de maturação sobre o desenvolvimento embrionário inicial. Foram coletados e aspirados ovários de fêmeas bovinas provenientes de abatedouros locais. Os complexos cumulus oophoros (COCs) foram divididos aleatoriamente em três tratamentos contendo 50 COCs cada: T0: soro ovino usado como controle endógeno, T1: soro de vacas com 10,8  $\pm$  4,8 dias pp; T2: soro de vacas com 354  $\pm$  3,8 dias pp. Posteriormente, os COCs foram incubados em estufa à 39 °C com 5% de CO<sub>2</sub> durante 24h no meio de maturação (TCM 199 Gibco®, LH/FSH, piruvato e antibióticos) enriquecido com soro (10%) conforme os tratamentos. A inseminação foi procedida com uma concentração de 1x10<sup>6</sup> espermatozoides/mL utilizando gradiente Mini-Percoll® para seleção espermática. Após a inseminação, os COCs foram incubados por 18h. Os zigotos permaneceram no meio de cultivo SOFaa suplementado com soro ovino (5%) e piruvato (0,033mmol) nas mesmas condições da MIV durante 7 dias. O momento da inseminação foi considerado como dia 0, a taxa de clivagem foi avaliada no dia 3 e a taxa de desenvolvimento embrionário global (blastocistos/número de inseminados) no dia 7. Segundo resultados preliminares de três rotinas, a taxa de clivagem foi menor no T1 do que no T0 e no T2 ( $P < 0.001$ ), sendo a percentagem de clivagem do T0 de 81,6  $\pm$  14,0%, no T1: 44  $\pm$  12,1% e no T2: 70  $\pm$  9,8%. No entanto, as taxas de desenvolvimento embrionário foram semelhantes entre si, sendo no T0 de 16,0  $\pm$  5,5%, T1: 21,0  $\pm$  2,9% e T2: 16,0  $\pm$  13,0%. Estes resultados preliminares demonstram que a adição de soro de vacas no pós-parto recente ao meio de maturação apresenta uma menor taxa de clivagem e semelhante desenvolvimento embrionário em comparação aos de mais tratamentos. Contudo, estão sendo realizadas outras repetições e análises complementares para maior esclarecimento do efeito da suplementação com soro de vacas no pós-parto recente sobre a maturação *in vitro* de oócitos bovinos e posterior desenvolvimento embrionário inicial.

**Palavras-chave:** Lactação; maturação; produção *in vitro*

SBTE 187 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Número de submissão 1547

**Desenvolvimento embrionário após transferência para a tuba uterina ipsi ou contralateral ao corpo lúteo em ovinos**  
Victoria De De Brun<sup>1</sup>; Ana Meikle<sup>1</sup>; Federico Cuadro<sup>2</sup>; Natalibeth Barrera<sup>2</sup>; Pedro Claudino dos Santos-Neto<sup>2</sup>; Diego Bosolasco<sup>2</sup>; Martina Crispo<sup>3</sup>; Alejo Menchaca<sup>2</sup>

1.Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay; 2.Instituto de Reproducción Animal Uruguay, Montevideo, Uruguay; 3.Instituto Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay.

O objetivo deste estudo foi investigar a sobrevivência e desenvolvimento embrionário através da transferência de embriões no Dia 1 após a fertilização ao tuba uterina ipsi ou contralateral ao corpo lúteo (CL). Vinte ovelhas multíparas Corriedale foram submetidas a um protocolo de sincronização do estro, que consistiu na inserção de uma esponja intravaginal com

progestagênio (medroxiprogesterona 60 mg, Progespon, Syntex, Argentina) durante 7 dias associados com 200 UI de eCG (Novormon, Syntex) e 125 mg de um análogo de prostaglandina F<sub>2</sub>α (cloprostenol, ciclase DL, Syntex) no momento da retirada dos dispositivos. A ocorrência de estro foi verificada usando carneiros vasectomizados de 24 a 48 horas após a retirada da esponja. Este protocolo sincroniza a ovulação em torno de 60h após a retirada da esponja (Menchaca e Rubianes, 2004). Quatrocentos e noventa e nove (n = 499) zigotos produzidos *in vitro* foram transferidos para o tuba uterina de 13 ovelhas receptoras (17-20 embriões por tuba uterina ipsi e contralateral ao CL; 35-40 embriões por ovelha) no Dia 1 após a fertilização *in vitro* (FIV)/ovulação (Dia 0: FIV para os embriões, e 60 h após a retirada da esponja para as receptoras). Apenas aquelas receptoras que apresentaram cio e ovulação de apenas um ovário (determinado por laparoscopia prévio a transferência de embriões) foram utilizadas. A transferência de embriões foi realizada através da fímbria em cada tuba uterina com os zigotos carregados em um tomcat com 20 µg de meio de manutenção. No Dia 6 os embriões foram coletados através de lavagem de cada corno uterino sendo avaliados quanto ao estágio e qualidade embrionária de acordo com as recomendações da IETS. A análise estatística foi realizada por meio do teste Qui-quadrado. A taxa de recuperação (embriões coletados/embriões transferidos) foi maior no corno uterino ipsi comparado ao contralateral ao CL (43,6% 109/250 vs. 30,1% 75/249, P<0,05), e a proporção de embriões viáveis (Grau 1 a 3) também foi maior no lado ipsilateral (23,6% vs 15,3% 59/250 38/249, respectivamente; P<0,05). Além disso, menor porcentagem de embriões degenerados/estruturas coletadas foram obtidos quando os embriões foram transferidos para o tuba uterina ipsi vs. contralateral (22,9% vs 42,7% 25/109 32/75, respectivamente, P<0,05). Diferenças de desenvolvimento do embrião (blastocistos/estruturas coletadas) não atingiu significância (23,9% vs. 14,7% 26/109 11/75, respectivamente, P= 0,15). Em conclusão, a maior taxa de recuperação, melhor desenvolvimento embrionário, e menor porcentagem de embriões degenerados foram obtidos quando a transferência de zigotos foi realizada no tuba uterina ipsi comparado ao contralateral no Dia 1 após a fertilização/ovulação. Sugerimos um efeito local do CL sobre o meio ambiente oviductal ipsilateral afetando o desenvolvimento embrionário precoce.

**Palavras-chave:** Transferência; tuba uterina; CL

SBTE 188 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Número de submissão 1550

**Efeitos de SNAP e/ou cilostamida durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos sobre a cinética de maturação e na produção de embriões**

Ramon Cesar Botigelli<sup>1</sup>; Katia Lancellotti Schwarz<sup>2</sup>; Maite Del Collado<sup>2</sup>; Fernanda Cavallari Castro<sup>2</sup>; Hugo Fernandes<sup>2</sup>; Cláudia Lima Verde Leal<sup>2</sup>

1.IB-UNESP Botucatu / Farmacologia, Botucatu, SP, Brasil; 2.Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - FZEA/USP, Pirassununga, SP, Brasil.

O óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso envolvido em muitos processos fisiológicos em mamíferos, que têm sido detectado em ovários, oócitos e embriões. NO atua sobre a guanilato ciclase solúvel (sGC), resultando na produção de monofosfato de guanosina cíclico (cGMP). Este nucleotídeo está envolvido na maturação do oócito e, consequentemente, no sucesso da fertilização. Além de cGMP, outro nucleotídeo cíclico, a adenosina monofosfato cíclico (cAMP), também está relacionada com a maturação. Os níveis destes nucleotídeos são balanceados por suas sínteses e a degradações, que são feitas por fosfodiesterases (PDEs). O objetivo deste estudo foi analisar o efeito do doador de NO (SNAP) e o inibidor de PDE3 (cilostamida) durante a FIV na cinética de maturação em oócitos bovinos e na produção *in vitro* de embriões. Experimento I, complexos cumulus-oócito (CCOs) foram cultivados em meio de maturação com um doador de NO (0,1 µM S-nitroso-N-acetylpenicillamine - SNAP), associada ou não com um inibidor de PDE3 (20 µM cilostamida) por até 28h, depois deste período a cinética de maturação foi avaliada. No Experimento II, CCOs foram cultivados durante 28 h em meio de maturação com doador (0,1 µM SNAP) ou inibidor de PDE3 (20 µM cilostamida), ou ambos, após este período, os CCOs foram submetidos à FIV e CIV e as taxas de desenvolvimento foram avaliadas. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o sistema SAS. Os dados foram testados para a distribuição normal e foram transformados em arco seno. Os percentuais de taxa de maturação e produção de embriões foram analisados por ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. No experimento I, SNAP+cilostamida tiveram taxas de MII inferiores a 24 h IVM (50,0±2,0%, P < 0,05), mas os grupos controle e SNAP tiveram proporções semelhantes de oócitos maturados (69,8±5,5 e 67,1±7,4%, P > 0,05), mas em 28 horas de MIV todos os grupos foram semelhantes (66,6 - 71,4%, P > 0,05). No experimento II, as taxas de clivagem foram menores na associação SNAP+cilostamida (55,1±7,6%, P < 0,05) em comparação com todos os outros tratamentos, que foram semelhantes (72-74%, P < 0,05). Taxas de blastocisto em D7 foram semelhantes para o controle, SNAP e cilostamida (38,7±5,8, 37,9±6,2 e 40,5±5,8%, respectivamente, P > 0,05), mas inferior para SNAP+cilostamida (25,7±6,9%, P < 0,05). Tendência semelhante foi observada para as taxas de blastocistos eclodidos no D8, onde SNAP+cilostamida tiveram taxas mais baixas para ambos os parâmetros (P < 0,05). Em conclusão, o atraso da meiose com a combinação de SNAP e cilostamida diminuiu a produção de embriões.

**Palavras-chave:** óxido nítrico; fosfodiesterases; PIVE

SBTE 189 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução



Número de submissão 1552

**Alterações da nutrição materna no início da gestação de vacas Nelore modifica o transcriptoma ovariano fetal**

Henri Falcão da Costa<sup>1</sup>; Maria Carolina Villani Miguel<sup>2</sup>; Alexandre Mendonça Pedrosa<sup>3</sup>; Flavia Lombardi Lopes<sup>2</sup>; Juliana Regina Peiró<sup>2</sup>; Guilherme Paula Nogueira<sup>2</sup>

1.Laboratório Biovet, Vargem Grande Paulista, SP, Brasil; 2.FMVA-UNESP, Araçatuba, SP, Brasil; 3.Cargil Nutrição Animal, Piracicaba, SP, Brasil.

Influências ambientais como a restrição nutricional durante o início da gestação de vacas podem impactar no desenvolvimento fetal e comprometer funções na vida adulta. Durante o primeiro trimestre da gestação ocorre a formação das gônadas, sendo este um período crítico no desenvolvimento ovariano, como a diferenciação de oócitos, que precisam escapar de processos degenerativos para permanecerem nos ovários. Hipotetizamos que a restrição ou o excesso de nutrientes ingeridos por vacas durante os primeiros dias de gestação interfere no peso corporal, ovariano e transcriptoma dos fetos. Vinte e uma vacas Nelore (PC = 488±24 kg, ECC = 3,1±0,1) foram submetidas à IATF com sêmen sexado (fêmea) de um único touro e individualmente alocadas em diferentes dietas. A dieta do grupo controle (C) atendeu aos requerimentos de manutenção, e os grupos de alta (A) e baixa (B) a 180% ou 60% da manutenção, respectivamente. O peso corporal e o ECC foram mensurados semanalmente, a fim de ajustar a dieta dos animais individualmente. Aos 60 dias de gestação, oito fetos foram removidos por colpotomia (acesso via vaginal), pesados, tiveram seus ovários dissecados e pesados. Um ovário fetal (de cada par) foi sequenciado (pair-end reads – TrueSeq RNA Sample PrepGuide, HiScan 500 – Illumina, Inc., San Diego, CA, EUA). As amostras foram mapeadas contra o genoma *Bos taurus* (UMD3.1, masked version). O efeito do tratamento no peso ovariano e corporal fetal foi comparado por ANOVA (SAS 9.3, proc GLM). O peso ovariano fetal (média dos dois) foi menor no grupo B ( $p<0,04$ ,  $0,007\pm0,001$ g) que em ambos os grupos A ( $0,02\pm0,04$ g) e C ( $0,013\pm0,007$ g) que não diferiram entre si ( $p>0,08$ ). O peso fetal no grupo B foi menor ( $p<0,006$ ;  $12,8\pm1,14$ g) que nos grupos A ( $20,56\pm2,2$ g) e C ( $20,03\pm0,8$ g). O status de nutrição materna durante os primeiros 60 dias de gestação modificou o transcriptoma ovariano fetal. Houve diferença no padrão de expressão gênica entre os grupos controle, alta e baixa ingestão. Um total de 79 genes de 20.657 foram diferencialmente expressos entre os tratamentos (FDR 0,05), sendo alguns relacionados ao desenvolvimento embrionário e ovariano. Assim, concluímos que alterações da nutrição materna durante os primeiros 60 dias de gestação poderão modificar o perfil transcriptômico ovariano fetal. A subnutrição materna pode prejudicar o peso e transcriptoma ovariano, sugerindo impacto na população folicular ovariana. Logo, o comprometimento do desenvolvimento no início da meiose pode reduzir o número de oócitos nas fêmeas.

Agradecimentos: FAPESP 2011/50839-1; CNPq 487036/2013-3, CAPES.

**Palavras-chave:** Nutrição; ovário; oócito

SBTE 190 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Número de submissão 1557

**Efeitos do uso de moduladores de AMPC durante a pré-maturação *in vitro* de oócitos bovinos sobre as junções comunicantes e o potencial de desenvolvimento embrionário**

Naiara Zoccal Saraiva<sup>1</sup>; Clara Slade Oliveira<sup>2</sup>; Maite Del Collado<sup>3</sup>; Marina Ragagnin Lima<sup>4</sup>; Simone Cristina Méo<sup>5</sup>; Marivaldo Rodrigues Figueiró<sup>1</sup>; Roberta Vantini<sup>4</sup>; Joaquim Mansano Garcia<sup>4</sup>

1.EMBRAPA Amazônia Oriental, Belém, PA, Brasil; 2.EMBRAPA Gado de Leite, Valença, RJ, Brasil; 3.FZEA – USP, Pirassununga, SP, Brasil; 4.FCAV - UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil; 5.EMBRAPA Pecuária Sudeste, São Carlos, SP, Brasil.

A maturação *in vitro* oocitária é fundamentalmente limitada pela qualidade do oócito, ou seja, pela competência de desenvolvimento intrínseca dessa estrutura. O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos provocados pela adição de moduladores de AMPc durante a MIV de oócitos bovinos no chamado sistema SPOM (*simulated physiological oocyte maturation*), verificando o “status” de comunicação entre os oócitos e células do *cumulus* por meio das junções comunicantes tipo “gap” (JCG), e o desenvolvimento embrionário inicial a partir de estruturas submetidas a esses moduladores, buscando reflexos positivos desse sistema sobre a competência oocitária. Oócitos foram maturados *in vitro* em meio TCM 199 suplementado com 10% de SFB, sendo submetidos nos grupos tratados a 100  $\mu$ M ou 150  $\mu$ M de forskolina e 750  $\mu$ M de IBMX nas primeiras 2 h de cultivo. Posteriormente, os oócitos foram transferidos para meio base suplementado com 20  $\mu$ M de cilostamide. Para avaliar o nível de conexão entre o oócito e as células do *cumulus*, foi medida a transferência do corante calceína AM pelas JCG, de acordo com protocolo descrito por Thomas et al. (Biol. Reprod., 70, 548-556). A emissão de fluorescência intra-oocitária foi medida com auxílio de microscópio de fluorescência, sendo as imagens capturadas por câmera fotográfica e analisadas no programa ImageJ. Oócitos advindos dos mesmos tratamentos também foram submetidos aos procedimentos de FIV em meio TALP e de CIV em meio SOFaa com 6 mg/mL de BSA e 2,5% de SFB, avaliando-se o desenvolvimento embrionário inicial. As análises foram realizadas no programa GraphPad Instat 6.01, sendo os resultados de fluorescência submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey, e as proporções de embriões clivados e de blastocistos avaliadas pelo teste Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ). O processo de MIV provocou aumento significativo ( $p<0,05$ ) na intensidade de fluorescência das JCG em todos os grupos, sendo as médias superiores nos grupos tratados com moduladores de AMPc. Não houve diferença entre os grupos 100/750 e 150/750. Quanto ao desenvolvimento pré-implantacional, constatamos que os tratamentos influenciaram negativamente nas taxas de clivagem

(controle - 585/677 (86,4)<sup>a</sup>; 100/750 - 542/663 (81,7)<sup>b</sup>; 150/750 - 558/688 (81,1)<sup>b</sup>). Quando a proporção de blastocistos (D8) foi calculada pelo número total de oócitos, não verificamos diferenças significativas entre os grupos (35,2 a 37,9%). Porém, quando as proporções foram calculadas a partir dos embriões clivados, verificamos superioridade dos grupos 100/750 (53,3)<sup>a</sup> e 150/750 (48,8%)<sup>a</sup> em comparação ao grupo controle (38,9%)<sup>b</sup>. Assim, concluímos que o uso de moduladores de AMPc durante a MIV provoca efeitos inibitórios ou retardantes sobre as primeiras clivagens, porém, estimulatórios nas estruturas que conseguem ultrapassar a fase de bloqueio inicial. Ainda, os moduladores de AMPc provocaram aumento considerável das JCG durante a MIV.

Apoio financeiro: FAPESP 2010/20744-6 e 2011/12983-3

**Palavras-chave:** Pré-maturação; moduladores de AMPc; competência oocitária

SBTE 191 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Número de submissão 1560

### **Histologia e morfometria de cornos uterinos de cadelas nulíparas e múltiparas**

Mariana Paganini Lourencini<sup>1</sup>; Jose Leonardo Gualberto Ramos<sup>2</sup>; Jacymara Dutra Santos<sup>1</sup>; Larissa Marchiori Sena<sup>1</sup>; Leticia Leal Oliveira<sup>1</sup>; Carla Braga Martins<sup>1</sup>

1.Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, Brasil; 2.Universidade Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos, RJ, Brasil.

Diversos são os estudos sobre as características histológicas encontradas nas diferentes fases do ciclo estral na espécie canina, entretanto, existem poucas publicações sobre as mudanças no sistema reprodutor feminino relacionadas à involução uterina pós gestacional, seus mecanismos e se há uma resposta eficiente, principalmente uterina, quanto ao seu formato, tamanho, volume e reepitelização. Sabe-se que o útero é composto por três camadas principais: o endométrio, miométrio e perimétrio e todas essas camadas sofrem alterações durante a gestação para permitir o crescimento e desenvolvimento fetal. Devido a sucessivas gestações, muitas patologias uterinas ocorrem principalmente por mudanças nessas camadas, como relaxamento miometrial, hiperplasia glandular, endométrio irregular e esclerose de vasos uterinos (AUGSBURGER; KURZI, 2004; MONTEIRO et al., 2009). Com base na escassez de informações e pesquisas sobre as possíveis alterações encontradas em cornos uterinos de cadelas nulíparas e múltiparas, o presente estudo objetivou avaliar a presença de variações histológicas e morfométricas que podem ocorrer nesse órgão entre os grupos citados. Avaliou-se os cornos uterinos direito e esquerdo de 13 cadelas, de raças e idades variadas, sendo 7 nulíparas e 6 múltiparas. Após ovariectomia (OSH), foram colhidos fragmentos individualizados na porção cranial, medial e caudal em relação ao ovário de cada corno uterino com, aproximadamente, 0,5 cm de comprimento para avaliação histológica e histomorfométrica da espessura total da parede uterina (µm), endométrio total (µm), diâmetro das glândulas endometriais (µm) e altura do epitélio glandular (µm), espessura total do miométrio (µm), miométrio interno, externo e estrato vascular (µm). De acordo com a avaliação dos cortes histológicos de ovários e úteros, foi possível estimar a fase do ciclo reprodutivo em que os animais se encontravam por meio da visualização das estruturas presentes nos ovários, espessura e características dos cornos uterinos, em adição ao histórico reprodutivo descrito pelos proprietários. Dessa forma, observou-se que nove animais estavam em diestro, dois em estro e dois em proestro. As médias entre os dois grupos foram comparadas pelo teste t de Student a nível de 5% significância. As estruturas mensuradas não apresentaram diferenças significativas, exceto em miométrio interno nos segmentos medial esquerdo e caudal direito. Essa diferença pode ser explicada pela interferência dos hormônios reprodutivos do ciclo estral sobre o miométrio, o qual se altera de acordo com cada fase. Diante dos resultados obtidos no presente trabalho pode-se concluir que os cornos uterinos de cadelas nulíparas e múltiparas são similares histologicamente e histomorfometricamente. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética para Uso de Animais em Experimentação (CEUA), da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), campus Alegre, protocolo número 052/2014.

**Palavras-chave:** Caninos; histomorfometria; útero

SBTE 192 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Número de submissão 1566

### **Efeito de diferentes doses de ácido fólico no cultivo *in vitro* de embriões bovinos**

Ana Luiza Silva Guimarães<sup>1</sup>; Margot Alves Nunes Dode<sup>2</sup>

1.Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil; 2.EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil.

Espécies reativas de oxigênio (ROS) são acumuladas durante o desenvolvimento embrionário em resposta ao estresse oxidativo que ocorre durante o cultivo *in vitro*. A presença de ROS intracelular pode induzir o mecanismo de apoptose e, como consequência, comprometer o desenvolvimento do embrião. Estudos tem demonstrado que a suplementação de antioxidantes no meio de cultivo pode diminuir o processo de estresse ao qual o embrião é submetido (Kim et al., Mol. Rep. Dev. 76: 120-125. 2009; Koyama et al., Rep.Dom.Anim. 47:921-927. 2012). Considerando que o ácido fólico está presente no ambiente folicular e uterino em mamíferos e possui propriedades que protegem a célula contra o estresse oxidativo, levantou-se a hipótese de que o mesmo tem efeito positivo no embrião e pode melhorar os resultados da PIV. O presente estudo objetivou avaliar a suplementação de diferentes doses de ácido fólico no cultivo *in vitro* de embriões bovinos e seu

efeito na velocidade de desenvolvimento. Para isso, CCOs foram aspirados de ovários de abatedouro e, após a seleção, foram maturados por 24 h e, posteriormente co-incubados com os espermatozoides por 18 h. Após esse período, os possíveis zigotos foram distribuídos em 5 grupos: T1 (Controle), meio SOF (N=257); T2 (10µM), SOF com 10µM de ácido fólico (N=239); T3 (20 µM), SOF com 20 µM de ácido fólico (N=242); T4 (50 µM), SOF com 50 µM de ácido fólico (N=253) e T5 (500 µM), SOF com 500 µM de ácido fólico (N=243). Em todos os grupos o meio SOF foi suplementado com 0,4% de BSA. O desenvolvimento embrionário foi avaliado em D2 para taxa de clivagem e em D6 e D7 para a taxa de blastocisto, os quais foram categorizados em Bi, Bl, Bx e BE. Os dados de taxa de blastocisto e velocidade de desenvolvimento foram avaliados pelo teste do Qui-quadrado ( $P < 0,05$ ). A taxa de clivagem em D2 foi menor no grupo 500 µM (74,9%) do que nos demais grupos (T1: 82,9%; 10 µM: 79,1%; 20 µM: 83,1%; 50 µM: 79,1%). Da mesma forma, o grupo 500 µM apresentou menor taxa ( $P < 0,05$ ) de blastocisto em D6 quando comparado aos outros grupos (T1: 11,3%; 10 µM: 14,7%; 20 µM: 14,4%; 50 µM: 13%; 500 µM: 7,8%). Entretanto, não houve diferença entre os tratamentos na taxa de blastocistos em D7 (T1: 35,4%; 10 µM: 33,5%; 20 µM: 36%; 50 µM: 30,4%; 500 µM: 29,6%). Em D6 a percentagem de embriões que estavam em estágio de BX foi maior ( $P < 0,05$ ) nos grupos 10 µM (25,7%) e 20 µM (23,5%) do que os grupos T1 (6,8%) e 500 µM (0%), sendo o 50 µM (12,2%) semelhante a todos os tratamentos. Entretanto, no D7 a taxa de BX foi não diferiu ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos (T1: 44,0%; 10 µM: 47,5%; 20 µM: 42,5%; 50 µM: 37,6%; 500 µM: 36,1%). Os resultados sugerem que a suplementação de 10 µM a 20 µM de ácido fólico durante o cultivo *in vitro* não afetou a produção de embriões, mas acelerou a velocidade de desenvolvimento em D6. Para confirmar o efeito benéfico do ácido fólico na qualidade dos embriões avaliações adicionais são necessárias.

Apoio Financeiro: CNPq/FAP-DF e CAPES

**Palavras-chave:** Blastocisto; antioxidantes; desenvolvimento embrionário

SBTE 193 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Número de submissão 1571

**Modulação de embriões bovinos *in vitro* por t2iGöLIF aumenta o número de células que expressam Nanog na MCI, mas não impede a ativação de Sox17**

Jesica Romina Canizo<sup>1</sup>; Amada Eugenia Ynsaurralde Rivolta<sup>2</sup>; Patricia Fisher<sup>3</sup>; Mariana Suvá<sup>4</sup>; Alejandra Sonia Guberman<sup>5</sup>; Juan Florencio Aller Atucha<sup>6</sup>; Daniel Salamone<sup>4</sup>; Ricardo Horacio Alberio<sup>7</sup>; Ramiro Alberio<sup>3</sup>

1.Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.- INTA EEA Balcarce, Buenos Aires, Argentina; 2.Facultad de Agronomía. Universidad de Buenos Aires.-INTA EEA Mercedes Corrientes, Buenos Aires, Argentina; 3.School Of Biosciences. University of Nottingham, Nottingham, Reino Unido; 4.Facultad de Agronomía. Universidad de Buenos Aires., Buenos Aires, Argentina; 5.Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires., Buenos Aires, Argentina; 6.INTA EEA Balcarce, Balcarce, Argentina; 7.INTA EEA Balcarce-Universidad de Mar del Plata, Balcarce, Argentina.

A combinação de inibidores conhecidos como 2i (inibidores de MAPK e GSK3b) + LIF é usada para cultivar células-tronco embrionárias (CTEs) naïve de camundongo, o único tipo de células capaz de colonizar a linha germinal de forma eficiente. Em CTEs humanas, 2i+LIF não é suficiente para conferir propriedades naïve, mas com a adição de um inibidor de PKC (Gö6983) e uma concentração modificada do inibidor GSK3B (conhecido como t2iGöLIF), é possível captar pluripotência naïve em linhagens celulares recém-derivadas. Neste estudo analisamos o efeito do tratamento com t2iGöLIF durante a embriogênese precoce bovina. Embriões bovinos foram produzidos por FIV e cultivados *in vitro* em meio BBH7 livre de soro até dia 5 e depois em meio N2B27 com 20 ng/ml de h-LIF ou t2iGö, t2iGöLIF e DMSO (controle). Embriões fixados no dia 8 foram analisados por imunocitoquímica para Nanog e Sox17, marcadores de epiblasto e hipoblasto, respectivamente. A comparação do desenvolvimento dos blastocistos não apresentou diferença significativa entre o meio controle com DMSO ( $0,24 \pm 0,05$ ) vs. LIF ( $0,22 \pm 0,04$ ) e t2iGöLIF ( $0,32 \pm 0,03$ ), no entanto, t2iGö resultou em uma reduzida produção de embriões ( $0,15 \pm 0,03$ ). Após imunocoloração descobrimos que todos os tratamentos produziram um aumento na proporção massa celular interna (MCI) e trofotoderma (TE), MCI:TE foram  $0,25 \pm 0,05$  vs.  $0,39 \pm 0,08$ ,  $0,50 \pm 0,08$  e  $0,38 \pm 0,08$  (controle vs. t2iGö, LIF e t2iGöLIF, respectivamente). Em todos os tratamentos foram detectados mais células positivas para Nanog do que o controle ( $25 \pm 4$ ) vs. t2iGö ( $40 \pm 7$ ), LIF ( $44 \pm 7$ ) e t2iGöLIF ( $45 \pm 8$ ). O número de células positivas para Sox17 foi reduzida em t2iGöLIF ( $19 \pm 3$ ) e manteve-se inalterada em t2iGö ( $38 \pm 5$ ) comparados com controle ( $34 \pm 5$ ). Surpreendentemente, mais células positivas para Sox17 foram encontrados no tratamento com LIF ( $61 \pm 8$ ) indicando que não apenas Nanog, mas também Sox17 aumenta com LIF. Além disso, o número de células que co-expressaram ambos marcadores foi maior em grupos tratados com LIF ( $13 \pm 4$  vs.  $4 \pm 1$  no controle). Em conclusão, os resultados indicam que t2iGöLIF é o único tratamento que reduz o número de células da endoderme primitivas (hipoblasto). Estes resultados sugerem que vias adicionais de sinalização podem precisar ser bloqueadas para impedir a diferenciação do epiblasto precoce em bovinos.

**Palavras-chave:** Pluripotência; embriogênese bovina precoce; modulação

SBTE 194 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Número de submissão 1573

**Melhoria das taxas de blastocisto e padrão de expressão gênica de embriões bovinos de ICSI pela MIV com alta concentração de cisteamina e o uso de espermatozoides previamente incubados com COCs**

Natalia Gabriela Canel<sup>1</sup>; Romina Jimena Bevacqua<sup>1</sup>; Mariana Suvá<sup>1</sup>; María Elena Arias<sup>2</sup>; Ricardo Felmer<sup>2</sup>; Daniel Salamone<sup>1</sup>

1.Laboratorio de Biotecnología Animal, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma De Buenos Aires, Argentina; 2.Laboratorio de Reproducción, Centro de Biotecnología de la Reproducción (Cebior-Bioren), Universidad, Temuco, Chile.

Em bovinos, ICSI é ainda ineficaz em parte devido aos baixos níveis de descondensação do espermatozoide. A adição de cisteamina (Cis) ao meio de maturação aumenta a glutatona reduzida (GSH) em oócitos maduros, que atua de forma sinérgica com a heparina (Hep) para promover a descondensação do espermatozoide após a fertilização (Romanato et al. Hum Reprod, 18:1868-73, 2003). Também, as células do cumulus induzem a capacitação espermática no camundongo (Shimada et al Am J Reprod Immunol. 69:168-79, 2013). Objetivo: avaliar o uso de alta concentração de Cis durante a maturação *in vitro*, a incubação de espermatozoides com COCs, e suplementação com Hep no meio de cultura para melhorar a ICSI em bovinos. Métodos: COCs de ovários de vacas abatidas foram maturados por 21 hs com Cis 1 (grupos 1 mM) ou 0,1 mM (0,1 mM; condição padrão). Os COCs foram incubados durante  $\geq 3$  hs com  $16 \times 10^6$  espermatozoides/ml em meio definido de Brackett. Os espermatozoides ligados as células do cumulus foram usados para ICSI (grupos Inc). Os grupos controles foram partenogênicos diploides (PA) e Sham (injetado sem espermatozoide e ativado). Os oócitos foram ativados com 5  $\mu$ M de ionomicina (4 min), TCM-199 durante 3 hs, e DMAP 2 mM por mais 3 hs. O grupo PA foi tratado com DMAP imediatamente após ionomicina. Os embriões foram cultivados em meio SOF. Um grupo de ICSI foi cultivado em SOF com 1 mg/ml de Hep durante as primeiras 48 hs (1 mM+Hep). As taxas de clivagem e blastocistos foram avaliadas nos dias 2 e 7 de cultura *in vitro*, respectivamente. Para a análise de qualidade dos blastocistos, a abundância relativa de mRNA que codifica para 8 genes foi comparada entre os grupos ICSI 0,1 mM; 1 mM e 1 mM-Inc por qPCR. Um controle de FIV foi realizado seguindo o protocolo de Brackett e Oliphant. Diferenças entre os tratamentos foram determinadas pelo teste de Fisher para as taxas de clivagem e blastocisto; ou ANOVA de uma via + teste de LSD para a quantificação relativa dos mRNAs ( $p \leq 0,05$ ). Resultados: As taxas de clivagem de 0,1 mM-Inc (n=117, 92%) não diferiram do Sham (n=106, 89%) e de PA (n=144, 96%) e foram maiores do que 1 mM-Inc (n=116, 79%). As taxas de clivagem mais baixas foram observadas para 0,1 mM (n=132, 60%), 1 mM (n=108, 52%) e 1 mM-Hep (n=114, 65%). No entanto, 1 mM-Inc apresentaram maiores taxas de blastocisto do que os outros grupos de ICSI (23 vs. 11, 18, 11 e 14% para 1 mM-Hep; 1 mM; 0,1 mM-Inc e 0,1 mM, respectivamente). Enquanto PA mostrou as taxas de blastocisto mais elevadas (61%), as do controle Sham não diferem de qualquer um dos grupos de ICSI (21%). Não foram encontradas diferenças para a abundância relativa de mRNAs que codificam para INF $\tau$ , CAT, DNMT1, OCT4, e HDAC3 entre todos os grupos. A expressão de SOD2, HADC1 e HADC2 foi maior para 0,1 mM do que para embriões de FIV. ICSI 1 mM não diferem do grupo de FIV para esses 3 genes, nem 1 mM-Inc, exceto para HDAC1. Em conclusão, enquanto que a utilização de Hep durante a cultura *in vitro* não tem um efeito benéfico sobre o desenvolvimento embrionário, o uso de Cis 1 mM durante a maturação, e dos espermatozoides incubados com COCs pode ser uma boa estratégia para melhorar os resultados de ICSI em bovinos.

**Palavras-chave:** ICSI; bovinos; expressão gênica

SBTE 195 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Número de submissão 1581

**Desenvolvimento morfológico e funcional do corpo lúteo de vacas da raça Holandês tratadas com ECG antes ou após a ovulação**

Bruno Moura Monteiro<sup>1</sup>; Pedro Leopoldo Jerônimo Monteiro Jr<sup>2</sup>; Louise Helen de Oliveira<sup>2</sup>; Alexandre Barbieri Prata<sup>2</sup>; Jessica Nora Drum<sup>2</sup>; Camila Spies<sup>2</sup>; Mario Binelli<sup>1</sup>; Roberto Sartori<sup>2</sup>; Paula de Carvalho Papa<sup>3</sup>

1.VRA-FMVZ/USP, Pirassununga, SP, Brasil; 2.DZ-ESALQ/USP, Piracicaba, SP, Brasil; 3.VCI-FMVZ/USP, São Paulo, SP, Brasil.

Esta pesquisa teve como objetivo comparar as alterações morfológicas e funcionais do corpo lúteo (CL) de vacas tratadas com eCG antes ou após a ovulação. Foram utilizadas 18 vacas da raça Holandês adultas e secas. Em dias aleatórios do ciclo estral (D-10), foram utilizados 2 dispositivos intravaginais de 1,9 g de P4 (iP4, CIDR®, Zoetis, São Paulo, SP, Brasil) e uma injeção intramuscular (i.m.) de 2 mg de benzoato de estradiol (BE, Gonadiol®). No D-3, foram administrados 25 mg de PGF2 $\alpha$  (Lutalyse®). Nesse momento os animais foram divididos entre os 3 grupos: 6 vacas que não receberam nenhum tratamento (Grupo Controle); 6 vacas que receberam 400 UI de eCG (Novormon®) i.m. (D-3; Grupo eCG-pré); ou 6 vacas que receberam 400 UI de eCG i.m. 3 dias após o estro (D+3; Grupo eCG-pós). No D-2, os iP4 foram removidos e os animais receberam 1,0 mg de cipionato de estradiol i.m. (CE, E.C.P.®). O dia do estro foi considerado o D0. Ultrassonografia diária (transdutor linear trans-retal de 7,5 MHz, Mindray DP 2200 vet, Mindray, China) foi realizada entre D-3 e D0 para mensuração do diâmetro do folículo dominante (ØFD) e entre D+3 e D+26 para mensurar o volume do CL. Foi determinada a concentração de P4 sérica entre D+3 e D+17, sendo considerada luteólise completa quando P4 < 0,10 ng/mL. A pesquisa foi realizada em três períodos experimentais, sendo que cada animal foi submetido a todos os tratamentos (n=54). No entanto, foram mantidos na pesquisa somente os animais de ovulação simples (n=25). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM e os dados foram analisados por meio dos procedimentos Glimmix (dados gerais) e

Mixed (medidas repetidas) no programa SAS 9.3. O nível de significância adotado foi 5%. Os resultados dos grupos Controle (n=8), eCG-pré (n=6) e eCG-pós (n=11) foram, respectivamente: ØFD entre D-3 e D0 - 10,79±0,36, 10,57±0,61 e 11,16±0,33 mm (P trat = 0,83, P tempo < 0,01, P trat\*tempo = 0,55); volume do CL entre D+3 e D+17 - 5.926,0±226,0, 5.968,4±287,7 e 6.561,8±229,6 mm<sup>3</sup> (P trat = 0,52, P tempo < 0,01, P trat\*tempo = 0,04), com CL menor para eCG-pré no D+9 e CL menor para o Controle no D+13; P4 - 1,89±0,12, 2,21±0,15 e 2,27±0,12 ng/mL (P trat = 0,40, P tempo < 0,01, P trat\*tempo = 0,96), com P4 menor para o Controle no D+14; taxa de luteólise até D+26 - 87,5 (7/8), 83,3 (5/6) e 81,8% (9/11) (P = 0,84); intervalo ovulação-luteólise - 21,1±0,8, 20,8±0,5 e 19,3±0,6 dias (P = 0,16); e intervalo entre duas ovulações - 22,8±1,0, 22,8±0,5 e 22,0±0,5 (P = 0,68). Apesar do semelhante intervalo ovulação-luteólise, observou-se que no D+20 a taxa de luteólise era 12,5 (1/8), 0,0 (0/6) e, 54,5% (6/11), respectivamente. Conclui-se que o tratamento com 400UI de eCG após a ovulação aumenta o volume do CL, e que o mesmo tratamento, antes ou após a ovulação, aumenta a P4 circulante 14 dias após o estro. No entanto, os efeitos destes tratamentos sobre a longevidade do CL precisam ser esclarecidos.

Agradecimentos: FAPESP (processos 2014/00739-9 e 2015/02551-0).

**Palavras-chave:** Gonadotrofinas; luteinização; progesterona

SBTE 196 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Número de submissão 1586

### **Efeitos de diferentes métodos de ativação do ovócito bovino sobre o desenvolvimento embrionário partenogênético e por injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)**

Carlos Frederico Martins<sup>1</sup>; Heidi Christina Bessler<sup>1</sup>; Margot Alves Nunes Dode<sup>2</sup>; Carolina Gonzales da Silva<sup>3</sup>

1.EMBRAPA Cerrados, Brasília, DF, Brasil; 2.EMBRAPA Recursos Genéticos E Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil; 3.EMBRAPA Cerrados/ Universidade De Brasília, Brasília, DF, Brasil.

Em bovinos, a injeção intracitoplasmática de espermatozoides deve de ser acompanhada por métodos artificiais de ativação dos ovócitos, para que os eventos normais de fecundação ocorram. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de diferentes tratamentos de ativação dos ovócitos, no desenvolvimento de embriões bovinos produzidos por partenogênese e injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI). Cinco tratamentos de ativação (T1: etanol 7%; T2: etanol 7% associado a ionomicina 5µM; T3: etanol 7% associado a ionomicina 5 µM e 6- (Dimetilamino) purina (6DMAP); T4: Duas incubações em etanol 7% com intervalo de 3 horas entre o primeira e segunda ativação; T5: etanol 7% associado com ionomicina 5 µM, cultura em meio SOF por 3 h e nova incubação em etanol 7%) foram utilizados para avaliação da produção de embriões partenogênicos. Os melhores tratamentos neste experimento foram utilizados no estudo da ICSI. Para o procedimento de ICSI, os espermatozoides foram pré-estimulados por incubação com um grupo de ovócitos durante 1,5 h e, em seguida, foram utilizados para microinjeção. Os testes Anova e de Tukey foram utilizados para comparar os efeitos da ativação ovocitária. A taxa de clivagem e blastocistos partenogênicos utilizando ativação com etanol 7% associada a ionomicina 5 µM e 6DMAP (T3), e duas incubações em etanol 7% (T4) foram significativamente (p < 0,05) superiores que outros tratamentos. O tratamento T3 produziu significativamente (p < 0,05) mais embriões que o T4 (31,34% vs 7,69%, respectivamente para T3 e T4). Quando estes tratamentos foram utilizados para a ativação dos embriões de ICSI, observou-se uma taxa semelhante de blastocistos de 31,81% e 27,27%, respectivamente para T3 e T4. Com isso levantou-se a hipótese que a dupla incubação em etanol 7% (T4) produziu mais embriões de ICSI do que embriões partenogênicos (p < 0,05), porque houve uma participação dos espermatozoides injetados, auxiliando no processo de ativação. Em conclusão, o uso de etanol 7% em associação com ionomicina 5 µM e 6DMAP ou a dupla exposição em etanol 7%, são duas boas opções de tratamentos de ativação para ovócitos bovinos durante o procedimento de ICSI.

**Palavras-chave:** Ativação; bovinos; ICSI

SBTE 197 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Número de submissão 1588

### **Levantamento epidemiológico de *Leptospira borgpetersenii hardjo bovis* nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul no período entre maio e dezembro de 2015**

Bruno Sivieri Lima<sup>1</sup>; Manoel Renato Teles Badke<sup>2</sup>; Giovani Pastre<sup>1</sup>; Marcia Cristina Alves Teixeira<sup>1</sup>

1.VIRBAC do Brasil, Sao Paulo, SP, Brasil; 2.Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

A eficiência reprodutiva pode ser influenciada por diversos fatores, dentre esses as doenças infecciosas são potencialmente capazes de afetar a reprodução dos bovinos. As leptospiroses são consideradas uma das principais enfermidades que afetam o sistema reprodutivo das vacas causando, abortamentos, infertilidade, ocorrência de natimortos e retenção placentária. O desafio para o controle das leptospiroses está identificação dos sorovares causadores de surtos em cada fazenda. A maioria dos laboratórios de diagnóstico de leptospirose no Brasil não possui em sua rotina o sorovar hardjo bovis, dificultando assim a publicação de dados de incidência e prevalência de *Leptospira borgpetersenii hardjo bovis* no rebanho bovino brasileiro. A *Leptospira borgpetersenii hardjo bovis* afeta a reprodução, causando repetições de cio, morte embrionária e abortos. O objetivo deste trabalho foi a realização de uma pesquisa da prevalência de *Leptospira borgpetersenii hardjo bovis* em soro bovino de fazendas com histórico de problemas reprodutivos dos estados de Santa Catarina e Rio Grande

do Sul. Foram analisados os dados de amostras enviadas ao Laboratório de Diagnóstico de Leptospirose da Universidade Federal de Santa Maria - UFSM localizado na cidade de Santa Maria/RS entre os meses de maio e dezembro de 2015. Ao todo foram analisadas 1068 amostras de soro bovino provenientes de 30 municípios do estado de Santa Catarina (n=638) e 29 municípios do estado de Rio Grande do Sul (n=430). Todas as amostras foram testadas pelo método de sorotaglutinação microscópica (SAM) para detecção de aglutininas antileptospiras. Os resultados obtidos foram descritos em porcentagem, e revelaram que das 1068 amostras analisadas 45% (483) apresentaram-se positivas, considerando o total de amostras analisada nos dois estados. Em Santa Catarina, 234 (37%) das 638 amostras foram positivas, e no Rio Grande do Sul 249 (58%) 430 amostras analisadas foram positivas. Pelo exposto, verifica-se a alta incidência da *Leptospira borgpetersenii hardjo bovis* na região estudada, sugerindo a presença enzoótica na região. A alta prevalência de *Leptospira borgpetersenii hardjo bovis* nos rebanhos analisados mostra a importância de um programa estratégico integrado para seu controle a fim de prevenir problemas reprodutivos e garantir o sucesso dos programas reprodutivos. Sendo assim, a correta vacinação dos animais, com vacinas que contenham o sorovar hardjo bovis em sua formulação é a melhor ferramenta para o controle da *Leptospira borgpetersenii hardjo bovis* em bovinos, pois diminui a ocorrência da infecção, reduzindo os casos de aborto, natimortos nas propriedades e outros problemas que possam comprometer os resultados dos programas reprodutivos.

**Palavras-chave:** Leptospirose; hardjobovis; reprodução

SBTE 198 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Número de submissão 1589

**Diagnóstico gestacional e acompanhamento do desenvolvimento fetal em cadela através da ultrassonografia**

Haroldo Francisco Lobato Ribeiro; Elenara Botelho Araujo; Anelise Sarges Ramos; Sebastião Tavares Rolim Filho; Tarcísio Rodrigo Lopes Mesquita; Victor da Costa Mileo; Raphael Castro Conde  
UFRA, Belém, PA, Brasil.

O objetivo deste trabalho foi definir com precisão as estruturas fetais que se formam durante a gestação de uma cadela submetida à inseminação artificial (IA) através da ultrassonografia gestacional. O experimento foi realizado a partir do 19º dia após IA, uma vez por semana, através do aparelho de ultrassonografia GE Logiq P3 Expert (6.0 - 13.0 MHz). No primeiro exame foi observada presença de vesícula gestacional medindo 1,3 x 0,9 cm (longitudinal x transversal) no corno uterino esquerdo, com características fetais ultrassonografias de desenvolvimento sugerindo gestação de cerca de 15 dias. No 25º dias de prenhez, observou-se vesícula gestacional medindo 4,8 x 2,3 cm, batimentos cardíacos com frequência de 234 bpm e medidas fetais equivalendo a 0,5 cm de diâmetro biparietal, 0,5 cm de diâmetro torácico, 0,6 cm de diâmetro abdominal, 1,7 cm de comprimento embrionário, notando-se discretamente o sistema ósseo articular (mandíbula, maxila e coluna vertebral). O exame ultrassonográfico realizado com 36 dias de prenhez constatou sistema ósseo articular discretamente visibilizado com pouca sombra acústica, frequência cardíaca de 225 bpm, medidas fetais aproximadas equivalendo a 1,2 de diâmetro biparietal, 1,2 de diâmetro torácico, 1,2 cm de diâmetro abdominal, 4,5 de comprimento embrionário, 7,9 x 2,7 cm de diâmetro da vesícula gestacional, e placenta com dimensões anatômicas (0,6 cm de espessura), contornos definidos, ecogenicidade e ecotextura normais. Com cerca de 46 dias de prenhez, notou-se feto com 1,9 cm de diâmetro biparietal; 1,9 cm de diâmetro encefálico; 2,3 cm de diâmetro torácico; 2,7 cm de diâmetro abdominal; comprimento renal de 1,2 cm; 0,9 cm de espessura placentária; comprimento femoral de 1,1 cm; comprimento umeral de 1,1 cm; diâmetro da vesícula gestacional de 4,0 cm; além de visualização de membros torácicos e pélvicos, e de batimentos cardíacos com frequência aproximada de 237 bpm. Aos 52 dias de prenhez, constatou-se placenta e o líquido amniótico estavam normais para a fase gestacional, sistema ósseo articular visibilizado e com pouca sombra acústica, feto medindo 2,0 cm de diâmetro biparietal; 1,7 cm de diâmetro encefálico; 3,3 cm de diâmetro torácico; 3,6 cm de diâmetro abdominal. Notaram-se comprimentos renal, femoral e umeral de 1,7 cm, 1,6 cm e 1,7 cm, respectivamente, e frequência cardíaca de 257 bpm. Com 60 dias de prenhez, notou-se placenta com padrões normais medindo 0,4 cm de espessura, sistema ósseo articular desenvolvido, produzindo sombra acústica posterior, feto medindo 2,8 cm de diâmetro biparietal; 2,5 cm de diâmetro encefálico; 4,0 cm de diâmetro torácico; 4,4 cm de diâmetro abdominal, além de comprimento renal de 2,1 cm; comprimento femoral de 2,2 cm; comprimento umeral de 2,6 cm; diâmetro da vesícula gestacional de 5,0 cm, e batimentos cardíacos com frequência aproximada de 217 a 228 bpm. O exame ultrassonográfico demonstrou eficácia para diagnóstico gestacional e acompanhamento do desenvolvimento fetal.

**Palavras-chave:** Cadela; ultrassonografia; prenhez

SBTE 199 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Número de submissão 1590

**Tratamentos de endometrites com infusão intrauterina de glicose 50% em vacas leiteiras**

Fernanda de Souza Rosa<sup>1</sup>; Ramiro Martins Bonotto<sup>1</sup>; Tatiane Camacho Mendes<sup>1</sup>; Milena Tomasi Bassani<sup>1</sup>; Genuina Dalberto<sup>1</sup>; Simone Vargas<sup>1</sup>; Ana Paula da Silva<sup>1</sup>; Adiel Cristiano Nino<sup>2</sup>; Jankiel Primon<sup>2</sup>

1.FAI-Faculdades DE Itapiranga, Itapiranga, SC, Brasil; 2.Médico Veterinário Autônomo, Seberi, RS, Brasil.

As infecções uterinas causam grande impacto econômico na bovinocultura leiteira, pois promovem repetição de estros e gastos com tratamentos, prolongando o intervalo entre partos e interferindo na produtividade desses animais. Assim a

prevenção, o diagnóstico e o tratamento são ferramentas importantes, principalmente se o tratamento for de baixo custo e não possuir carência no leite. Por tanto, objetiva-se com o presente estudo avaliar a eficácia do tratamento de endometrites com infusão intrauterina (IU) de glicose 50%. Foram examinadas ginecologicamente 42 vacas leiteiras repetidoras de estro e 14 foram diagnosticadas com endometrites. Destas 8 com endometrite clínica (EC) diagnosticada através dos sinais clínicos observados no exame ginecológico e pela presença de catarro genital, e 6 com endometrite subclínica (ESC) diagnosticada por meio de exame citológico uterino para identificação da porcentagem de PMNs em relação aos dias pós parto (média 99 dpp) de acordo com a classificação de Gilbert et al (Theriogenology 64, 1879 – 1888, 2005). Também foi coletado swab uterino para identificação bioquímica bacteriana (E. Coli, Staphylococcus spp e Corinebacterium spp), além do teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA). Após o diagnóstico, as vacas foram distribuídas aleatoriamente entre os grupos Glicose (n=7, infusão IU de 200 mL de glicose 50% + 25 mg de cloprostenol) e Antimicrobiano (n=7, 5 dias de tratamento IM com o princípio ativo sensível no TSA + 25 mg de cloprostenol no D1). Aproximadamente 30 dias após o tratamento, as fêmeas foram novamente submetidas ao exame ginecológico e foram consideradas curadas e liberadas para IA as que apresentaram citologia uterina inferior a 5% de PMNs. As vacas do grupo Glicose demonstraram 100% de cura (3 EC e 4 ESC,  $\leq 3,5\%$  PMN), porém as do grupo Antimicrobiano demonstraram 75% de cura (2 EC e 3 ESC,  $\leq 3,5\%$  PMN). As vacas que não responderam ao tratamento do grupo Antimicrobiano (1 EC 10% PMN e 1 ESC 17,5% PMN) foram submetidas ao tratamento do grupo Glicose e demonstram 100% de cura ( $\leq 0,5\%$  PMN). Estas observações sugerem que o tratamento IU com glicose 50% seja eficaz, e além disso, apresenta baixo custo e não tem carência para o descarte de leite, podendo ser uma boa alternativa para o tratamento de endometrites em bovinos leiteiros.

**Palavras-chave:** útero; PMN; antimicrobianos

SBTE 200 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Número de submissão 1609

#### **Consumo de chá verde e de chá branco na proliferação celular do endométrio de ratas**

Inês Cristina Giometti<sup>1</sup>; Francislaíne Anelize Garcia Santos<sup>2</sup>; Samuel Aparecido Freire<sup>1</sup>; Ronaldo Sena e Silva<sup>1</sup>; Paula de Carvalho Papa<sup>2</sup>; Caliê Castilho<sup>1</sup>; Ana Paula Matoso Miskulin Cardoso<sup>1</sup>; Cecília Braga Laposy<sup>1</sup>; Rosa Maria Barilli Nogueira<sup>1</sup>; Érica Solange Caetano Kikuchi<sup>1</sup>

1.UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil; 2.USP, São Paulo, SP, Brasil.

As catequinas presentes nos chás verde e branco (provenientes da planta *Camellia sinensis*) estão associadas com diminuição da proliferação celular em diferentes tipos de cânceres, com prevenção de doenças cardiovasculares e de osteoporose e possuem atividade antioxidativa, antibacteriana. Apesar dos benefícios encontrados pelo consumo desses chás, suas catequinas inibem a proliferação celular e a esteroidogênese em células da granulosa de suínos cultivadas *in vitro*, por isso é importante verificar as possíveis consequências do seu consumo para a reprodução. Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar a influência do chá verde e do chá branco na proliferação celular do endométrio de ratas. Para isto, 90 ratas Wistar foram divididas em três grupos: grupo controle (CT, bebendo água ad libitum); o grupo CV (bebendo somente chá verde comercial, Amor à Vida®, Amor à Vida Produtos Naturais, Brasil); grupo CB (bebendo somente chá branco comercial, Chá & Cia®, Brasil). Os chás foram preparados diariamente a 2,5% por infusão e oferecidos para as ratas em uma situação experimental como 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), sob condições normais de 12 horas de claro: 12 horas de escuro, com livre acesso ao líquido e a comida. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética para ser realizado (protocolos números 325 e 336). O experimento teve duração de três meses, e a 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) e então, sacrificadas. Os úteros foram colhidos em solução de Davidson e as lâminas histológicas foram coradas pelo método de AgNor (“Argyrophilic Nuclear Organizer Regions”) para verificação da proliferação celular endometrial. Para definir as áreas das regiões organizadoras de nucléolo (Nors) e as áreas dos núcleos do endométrio, as lâminas foram fotografadas em aumento de 1000x e as áreas foram marcadas e quantificadas utilizando o software MOTIC Imageplus 2.0® (MOTIC, China), em dez campos diferentes de cada lâmina, onde foram mensurados 10 núcleos em cada campo, perfazendo 100 células por animal. A análise estatística realizada é a ANOVA seguida de Tukey, diferenças significativas foram consideradas quando  $p < 0,05$ . Os endométrios das ratas tratadas com os chás apresentaram menor razão entre núcleo e Nors comparadas ao controle em todos os momentos analisados ( $p < 0,0001$ ): 30 dias (CT =  $4,81 \pm 0,26a$ , CV =  $3,38 \pm 0,22b$ , CB =  $1,44 \pm 0,04c$ ); 60 dias (CT =  $6,10 \pm 0,42a$ , CV =  $1,79 \pm 0,03b$ , CB =  $2,27 \pm 0,40b$ ); 90 dias (CT =  $6,45 \pm 0,62a$ , CV =  $1,92 \pm 0,03b$ , CB =  $3,25 \pm 0,31b$ ). Conclui-se que consumo de chá verde e de chá branco diminui a proliferação endometrial em ratas.

Apoio financeiro: FAPESP (2010/20583-2).

**Palavras-chave:** *Camellia sinensis*; histologia; reprodução

SBTE 201 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Número de submissão 1611

**Expressão de genes de competência oocitária é maior em células do cumulus de vacas Nelores de baixa comparada com alta contagem de folículos antrais**

Camila Oliveira Rosa<sup>1</sup>; Luciana Simoes Rafagnin Marinho<sup>1</sup>; Paulo Roberto Antunes da Rosa<sup>2</sup>; Matheus Pedrotti de Cesaro<sup>2</sup>; Paula Alvares Lunardelli<sup>1</sup>; Katia Cristina Silva-Santos<sup>1</sup>; Vilceu Bordignon<sup>3</sup>; Marcelo Marcondes Seneda<sup>1</sup>

1.UEL, Londrina, PR, Brasil; 2.UFSM, Santa Maria, RS, Brasil; 3.McGill, Sainte-Anne-De-Bellevue, Canadá.

O objetivo deste trabalho foi investigar a relação entre a população de folículos antrais (FA) e a competência oocitária. Ovários (n = 712) de vacas Nelore (n = 356) foram obtidos no abatedouro e distribuídos de acordo com o número de folículos antrais. A média da quantidade de folículos foi de  $61,14 \pm 30,43$  por vaca. Os grupos experimentais foram: fêmeas com  $\leq 31$  FA (média - DP), 46-76 FA (média  $\pm \frac{1}{2}$  DP) e  $\geq 92$  FA (média + DP). Complexos cumulus-oócito (CCOs) foram coletados de cada grupo, maturados, fertilizados e cultivados *in vitro* para avaliar a competência de desenvolvimento para o estágio de blastocisto. CCOs (n = 180) foram utilizados para a análise quantitativa da expressão de RNAm por qRT-PCR em 3 repetições. O RNA total foi extraído a partir das células da granulosa e do cumulus utilizando Trizol. A pureza do RNA e quantidade foram determinados usando um espectrofotômetro nano-drop e 200 ng total de RNA por amostra foram transcritos de forma reversa utilizando o kit iScript cDNA synthesis (BioRad, ON, Canadá). PCR quantitativa foi realizada em um sistema CFX384TM em Tempo Real (BioRad) e iQ SYBR Green Supermix (BioRad). RNAm abundância dos genes testados foram normalizados 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. Os dados de desenvolvimento embrionário a análise estatística foi realizada pelo teste de regressão logística e as diferenças foram consideradas significativas se  $p < 0,05$ . Não houve diferença entre os grupos para clivagem e desenvolvimento para o estágio de blastocisto. Nas células do cumulus, amostras de vacas com  $\leq 31$  AF demonstraram uma maior expressão de genes relacionados à retomada da meiose (NPR-2 e NPR-3), biossíntese de estrogênio (CYP19A1), expansão das células do cumulus (FGF10) e fatores de transcrição que regulam a maturação do oócito e a proliferação celular (STAT3 e FOXO3a). Não houve diferença na abundância de RNAm para STAR (relacionado à biossíntese de estrogênio), NPR-1, PGRMC1, PGR (relacionados à retomada da meiose), LIFRα (fator de transcrição relacionado a maturação do oócito e proliferação celular), FGF2Rb, FSHR, BMPR2, AMH, AMHR2 e TGFBR1 (relacionados com a expansão do cumulus) avaliados nas células de cumulus. Nas células da granulosa, os níveis de RNAm para NPR-1 (relacionado com a retomada da meiose) foram maior no grupo com  $\geq 92$  FA. Os resultados desse estudo revelam a existência de diferenças moleculares relacionadas a retomada da meiose, síntese estrogênica, expansão do cumulus, maturação e proliferação celular entre vacas nelore de baixa vs. alta contagem de FA.

**Palavras-chave:** Células do cumulus; competência oocitária; folículos antrais

SBTE 202 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Número de submissão 1622

**Esteroides foliculares cooperam com o NPPC para retardar a maturação nuclear e aumentar a comunicação oócito-cumulus em bovinos**

Ana Caroline Silva Soares<sup>1</sup>; Valentina Lodde<sup>2</sup>; Lorena Sanches<sup>1</sup>; Rodrigo Garcia Barros<sup>1</sup>; Paula Fernanda de Lima<sup>1</sup>; Christopher Alan Price<sup>3</sup>; Alberto M. Luciano<sup>2</sup>; Jose Buratini<sup>1</sup>

1.UNESP - Campus Botucatu, Botucatu, SP, Brasil; 2.Università Degli Studi Di Milano, Milão, Itália; 3.Universidade De Montreal, Saint Hyacinthe, Canadá.

A maturação oocitária é induzida precocemente quando o complexo cumulus oócito (COC) é removido do folículo, representando eficiência limitada na MIV. O peptídeo natriurético C (NPPC) atrasa a quebra da vesícula germinativa (GVBD) e aumenta a comunicação oócito-cumulus. Em roedores, o estradiol parece cooperar com o NPPC através do aumento da expressão do seu receptor NPR2. Neste estudo, testamos a hipótese de que, esteroides foliculares (estradiol, progesterona e androstenediona) aproximadamente em níveis fisiológicos, cooperam com NPPC para atrasar GVBD (Exp. 1) e mantém a comunicação oócito-cumulus (Exp. 2). Em seguida, avaliamos os efeitos dos esteroides foliculares, NPPC e a combinação de ambos em cultivo pré-MIV na produção de embriões (Exp. 3). Experimentos 1 e 3 foram realizados na UNESP-Botucatu, com ovários de *Bos indicus* (predominantemente Nelore), e experimento 2 na Universidade de Milão, com ovários de *Bos taurus* (Holstein). Foram aspirados COCs de folículos de 3-8mm de ovários de abatedouro e cultivados em grupos de 20. O meio básico, composto por TCM199, BSA (0,4%), amicacina (75µg/ml) e piruvato (22µg/ml). Nos experimentos 1 e 2, COCs foram cultivadas por 9 horas em meio básico (B), meio básico suplementado com NPPC (NPPC), meio básico suplementado com esteroides foliculares (FE) ou esteroides foliculares mais NPPC (NPPC + FE; concentrações descritas na patente PCT 201690005). Ao final do cultivo, a proporção de oócitos no estágio de vesícula germinal (VG) (Exp. 1), e a proporção de COCs com junções comunicantes do tipo GAP (JG) abertas (Exp. 2) foram avaliados. Para identificar a fase de VG, os oócitos foram desnudos e corados com Hoechst 33342 e a comunicação celular foi avaliada através da análise da transferência do corante (Lucifer Yellow) do oócito para as células do cumulus. Os efeitos dos tratamentos foram analisados por ANOVA seguido de teste Tukey. O experimento 3 testou os efeitos dos tratamentos acima sobre a produção de embriões. Para MIV, os COCs foram cultivados em 400 µl de meio básico suplementado com 100 ng/ml de ampirregulina (AREG) a 38,5 ° C e 5% de CO<sub>2</sub> em ar umidificado por 24 horas. O grupo FE+NPPC manteve oócitos em VG como no momento da coleta (96,1 vs 97,5,  $p > 0,05$ ). Além disso, NPPC aumentou a porcentagem de COCs com JG abertas no grupo B+NPPC comparado ao grupo B (47.2 vs. 24.2,  $p < 0,05$ ) e a níveis similares do controle antes de



serem cultivados no grupo FE+NPPC (60.3 vs. 83.1,  $p>0.05$ ). A produção de blastocistos e porcentagem de blastocistos eclodidos e expandidos não diferiu entre os tratamentos. Em conclusão, os dados indicam que os esteroides foliculares aumentam a capacidade de NPPC em manter a parada meiótica e aumentar a comunicação oócito-cumulus. Mais estudos estão em andamento para determinar o efeito da pré maturação nuclear FE + NPPC sobre o desenvolvimento embrionário.

**Palavras-chave:** Maturação oocitária; junções GAP; vesícula germinativa

SBTE 203 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Número de submissão 1624

**Efeitos do inibidor da polimerização de actina, “latrunculin a” durante ativação partenogenética de oócitos bovinos**  
Geraldina Vans Landschoot<sup>1</sup>; Sergio Ferraris<sup>1</sup>; Daniel Salamone<sup>2</sup>

1.Centro de Investigación y Desarrollo en Medicina Experimental (CIDME), Universidad Maimónides., Buenos Aires, Argentina; 2.Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

Os protocolos de transferência nuclear de células somáticas (SCNT) requerem ativação artificial para imitar a fecundação e induzir o desenvolvimento do embrião. No entanto, os tratamentos disponíveis de ativação química podem resultar em aberrações cromossômicas (Kim et al., Biol. Reprod., 54, 1397-404, 1996). Por essa razão, faz-se necessário desenvolver melhores protocolos de ativação. As recentes melhorias na protocolos NT, tal como a substituição do inibidor da polimerização de actina citocalasina B (CB) por a latrunculin A (LatA), contribuíram para melhorar a eficiência de clonagem (Mallol et al., PLoS ONE, 10, oi:10.1371/journal.pone.0120033, 2015). O objetivo deste estudo foi definir a melhor concentração LatA para induzir ativação diplóide de embriões bovinos partenogênicos, em combinação com Roscovitine (Rosco). Para fazer isso, COCs foram coletados de ovários de vaca obtidos de matadouros e maturados *in vitro* em TCM 199 suplementado com 5% FCS, 10 UI mL<sup>-1</sup> de penicilina, 10 ug mL<sup>-1</sup> de FSH, 100 uM cisteamina e 0,3 mM de sódio piruvato, a 39 °C, sob 6,5% de CO<sub>2</sub> em ar, durante 20 h. Após remoção das células do cumulus, metafase II (MII) oócitos foram tratados com 5 µM de ionomicina (Io) durante 4 min e aleatoriamente atribuídos aos seguintes grupos de ativação: a) LatA 1 uM/Rosco (Roscovitina 5 mM durante 5 h); b) LatA 5 µM/Rosco; c) LatA 10 µM/Rosco; d) LatA de 20 µM/Rosco; e) O grupo de controle: 6-dimetilaminopurina 2 mM (DMAP) durante 3 h. Oócitos ativados foram cultivados em meio SOF e as taxas de blastocistos foram avaliadas no dia 7 do desenvolvimento. Resultados: As taxas de blastocistos foram menores nos grupos tratados com Io seguido por: LatA 1 µM/Rosco (n=108, 18,52%), LatA 5 µM/Rosco (n=90, 26,67%), LatA 10 µM/Rosco (n=90, 24,44%) e LatA 20 µM/Rosco (n=65, 16,92%) do que no grupo tratado com DMAP (n=90, 31,58%). Os resultados demonstraram que as taxas de DMAP foram significativamente maiores do que LatA 1 uM/Rosco e LatA 20 uM/Rosco (31,58, 18,52 e 16,92%, respectivamente) (teste de Fisher,  $p<0,05$ ). Por último, Io seguido de LatA 5 uM/Rosco e LatA 10 uM/Rosco, resultaram em taxas de desenvolvimento similares ao tratamento Io-DMAP ( $p>0,05$ ), mas o nível de ploidia do embrião permanece a ser determinada. Como LatA demonstrou menos anomalias cromossômicas (Terashita et al., Plos ONE, 8:e78380. doi: 10.1371), os resultados são encorajadores para serem usados em SCNT, visto que pode aumentar os embriões normais.

**Palavras-chave:** Latrunculin a; ativação partenogenética; bovino

SBTE 204 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Número de submissão 1628

**O oócito regula a expressão do GDF9 e da BMP15 nas células do cumulus bovinas**

Paula Fernanda de Lima<sup>1</sup>; Rodrigo Garcia Barros<sup>1</sup>; Jhessica Naomi Sakoda<sup>1</sup>; Ana Caroline Silva Soares<sup>1</sup>; Christopher Alan Price<sup>2</sup>; Jose Buratini<sup>1</sup>

1.UNESP, Botucatu, SP, Brasil; 2.Universidade de Montreal, Saint Hyacinthe, Canadá.

Ao contrário do camundongo, a presença do oócito não é necessária para a expansão do complexo cumulus-oócito (COC) em bovinos. No entanto, já demonstrado anteriormente que fatores secretados pelo oócito, embora não sejam absolutamente necessários, aumentam a expansão do cumulus em bovinos. Os principais fatores secretados pelo oócito que regulam a maturação COC são os membros da família TGFβ, BMP15 e GDF9. Dados anteriores sugerem que BMP15 e GDF9 são expressos em células do cumulus de bovinos. Deste modo, a existência de uma regulação intra-cumulus mediada por sinalização TGFβ em bovinos constitui uma hipótese interessante. Neste estudo, foi testada a hipótese de que BMP15 e GDF9 são expressos em células do cumulus durante a MIV em bovinos e que a abundância de mRNA é regulada pelo oócito. COCs foram aspirados de folículos de 3-8 mm de diâmetro e COC (grau 1 ou 2) foram divididos em três grupos: COCs intactos (COC), COCs oocetomizados (OOX), e OOX com oócitos desnudos (OD). A oocetomia foi realizada por aspiração do ooplasma com um micromanipulador. COCs foram maturados em grupos de 20 por 4 ou 22 horas (n=4/hora). IVM foi realizada em TCM199 com sais de Earl suplementado ou com FSH (1 ug/ml) ou AREG (100 ug/mL), 0,4% de BSA, 22 ug/ml de piruvato de sódio, 75 µg/ml de amicacina a 38,5 °C e 5,5% de CO<sub>2</sub> em atmosfera húmida. A abundância de RNAm que codifica BMP15 e GDF9 nas células do cumulus foi avaliada por em tempo real de RT-PCR utilizando Poder SybrGreen (LifeTech®) e CYC-A, como gene endógeno. Os efeitos dos tratamentos foram submetidos a análise de variância e grupos foram comparados com o teste de Tukey. Expressão de RNAm de BMP15 GDF9 foi detectada nas células do cumulus bovina. Os números de ciclos de PCR foram, em média, 29 e 28 para BMP15 e GDF9, respectivamente,

em 4 horas de cultivo, e 29 e 31, às 22 horas de cultivo. A oocetomia significativamente reduziu a expressão de RNAm de BMP15 e GDF9 em COCs cultivados com AREG às 4 e 22 horas, mas não com FSH. Co-cultivo de OOX com OD restaurou a expressão de BMP15 e GDF9. Em conclusão, estes dados sugerem que a expressão RNAm de BMP15 e GDF9 nas células do cumulus de bovinos é regulamentada pelo oócito. Este efeito é abolido por níveis supra-fisiológicos de FSH utilizados no MIV em bovinos.

**Palavras-chave:** Células do cumulus; BMP15; AREG

SBTE 205 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Número de submissão 1631

**Estradiol altera o perfil imunohistoquímico das proteínas PKC gama, AKR1B1 e receptor alfa de estradiol no endométrio de fêmeas bovinas**

Bárbara Piffero Mello<sup>1</sup>; Angela Maria Gonella-Díaz<sup>1</sup>; Guilherme Pugliesi<sup>1</sup>; Saara Carolina Scolari<sup>2</sup>; Mario Binelli<sup>3</sup>; Claudia Maria Bertan Membrive<sup>1</sup>

1.USP, Pirassununga, SP, Brasil; 2.FAEF, Garça, SP, Brasil; 3.UNESP, Dracena, SP, Brasil.

Em bovinos o estradiol (E2) exerce importante participação na liberação de PGF2 $\alpha$  endometrial associada com a luteólise, entretanto, os mecanismos moleculares envolvidos em tal ação são pouco conhecidos. A produção de PGF2 $\alpha$  resulta da estimulação de uma cascata de eventos intracelulares, incluindo a participação das proteínas kinase C gama (PKC $\gamma$ ), aldoketo redutase família 1 membro B1 (AKR1B1) e receptor  $\alpha$  de estradiol (ER $\alpha$ ), presentes nas células endometriais. Hipotetizou-se que em fêmeas tratadas com E<sub>2</sub> ocorre uma modificação na concentração de proteínas PKC $\gamma$ , AKR1B1 e ER $\alpha$  no endométrio. Assim, objetivou-se investigar por imunomarcagem as proteínas PKC $\gamma$ , AKR1B1 e ER $\alpha$  no tecido endometrial, em vacas Nelore tratadas ou não com 3mg de 17 $\beta$ -estradiol por via intravenosa, no 15º dia do ciclo estral 0, 4 e 7 horas após a injeção. Vacas Nelore (n=52), pluríparas, cíclicas e não lactantes receberam 2mg de benzoato de estradiol (Sincrodiol, Ouro fino® Cravinhos, Brazil) e um dispositivo intravaginal de progesterona (1g; Sincrogest; Ourofino®, Cravinhos, Brazil) por 8 dias. As vacas receberam 0,5mg de cloprostenol sódico (Sincrocio; Ourofino, Cravinhos, Brazil) via IM, 48 horas antes da retirada e uma segunda aplicação na retirada do dispositivo. No dia 15 do ciclo estral (D0; estro) foram administrados os seguintes tratamentos: placebo (P; 5mL de etanol 50%; via IV), estradiol (E; 5mL de etanol 50% contendo 3mg de 17 $\beta$  estradiol; IV) ou controle (não tratado). Considerou-se o momento da aplicação dos tratamentos como a hora 0. As vacas foram submetidas a uma biópsia endometrial, via transcervical e de acordo com o momento da biópsia foram subdivididas nos seguintes grupos: hora 0 no grupo controle (C; n=10), e nos momentos 4 horas (E4; n=11 e P4; n=10) ou 7 horas (E7; n=10 e P7; n=11). Os procedimentos realizados estão de acordo com os princípios da Comissão de Ética em Experimentação Animal da UNESP de Dracena/SP (Protocolo CEUA 08/2014). O tecido obtido por biópsia foi acondicionado em solução de formol tamponado 4% durante 24 horas e posteriormente foi mantido em álcool 70% até a inclusão em parafina. Secções de endométrio foram avaliadas pela técnica de imunohistochemistry, considerando a imunomarcagem no epitélio luminal (EL), epitélio glandular (EG) e estroma (E). As diferenças estatísticas foram determinadas por teste T e consideradas quando P<0,05. A proteína PKC $\gamma$  apresentou maior imunomarcagem (P<0,05) no EL nos grupos E4 e E7 comparados com P4 e P7h (P<0,05) e maior imunomarcagem no EG em E7 quando comparado a P7. A proteína AKR1B1 apresentou maior imunomarcagem (P<0,05) no EL nos grupos E4 e E7 quando comparados a P4 e P7 e maior expressão no EG em E4 quando comparado a P4. Para ER $\alpha$  houve maior imunomarcagem (P<0,05) no EG nos grupos P4 e P7 quando comparados com E4 e E7 e maior expressão no EL em P4 quando comparado ao grupo E4. Conclui-se que o E<sub>2</sub> aumenta a imunomarcagem das proteínas PKC $\gamma$  e AKR1B1 e diminui a imunomarcagem de ER $\alpha$  no tecido endometrial, desta forma modificando a concentração de receptores endometriais para PKC $\gamma$ , AKR1B1 e ER $\alpha$ .

**Palavras-chave:** Endométrio; PGF2 $\alpha$

SBTE 206 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Número de submissão 1633

**Evidências de que o fator de crescimento dos fibroblastos 2 está envolvido nos mecanismos pelos quais o oócito regula sua própria maturação nuclear**

Rodrigo Garcia Barros<sup>1</sup>; Debora Jardina Sartor<sup>1</sup>; Paula Fernanda de Lima<sup>1</sup>; Ana Caroline Silva Soares<sup>1</sup>; Lorena Sanches<sup>1</sup>; Christopher Alan Price<sup>2</sup>; Jose Buratini<sup>1</sup>

1.UNESP - Botucatu, Botucatu, SP, Brasil; 2.Universidade de Montreal, Saint Hyacinthe, Canadá.

A expressão do fator de crescimento dos fibroblastos 2 (FGF2) é estimulada pelo pico ovulatório de LH em células do cumulus (CC) bovinas. Em células da granulosa bovina, FGF2 ativa ERK1-2, essa via é conhecida por estimular a maturação nuclear do oócito e a expansão das CC. Anteriormente, observamos que o FGF2 aumenta a expansão das CC durante a maturação *in vitro* de complexos cumulus-oócito (COC) bovino. Os objetivos desse estudo foram avaliar os efeitos do FGF2 na quebra da vesícula germinativa, além de verificar se a expressão de FGF2 nas CC é regulada pelo oócito. Efeitos do FGF2 sobre a expressão de genes que regulam a maturação nuclear do oócito também foram investigados. Grupos de 20 COCs (graus 1 e 2) de folículos de 3-8mm de ovários de abatedouros foram cultivados em meio base TCM 199 com sais de Earle suplementado com 0,4% BSA, 1 $\mu$ l/mL FSH, 22 $\mu$ g/mL piruvato de sódio, 75 $\mu$ g/mL amicacina em

38,5°C e atmosfera úmida. Para verificar a maturação nuclear do oócito e a expressão gênica de CC, COCs foram cultivados em 450µL de meio base acrescido de doses graduadas de FGF2 (0, 1, 10 e 100ng/mL; n=5/tempo/dose) por 6 e 22 horas. Após o cultivo, as CC e oócitos foram mecanicamente separados e os oócitos corados com Hoechst 33342 para verificar a quebra da vesícula germinativa (GVBD) as 6 horas, e estágio de metáfase (MI ou MII) as 22 horas. Abundância de RNAm para AREG, EREG, NPPC e NPR2 foi verificada por qPCR realtime e normalizada para CYC-A nas CC do cultivo de 6 horas. Para averiguar a influência do oócito sobre a expressão de FGF2, COC intacto (COC), oocetomizado (OOX) e OOX+oócitos denudos (OD) foram cultivados no meio base em 100µL por 4 e 22 horas. Efeitos dos tratamentos foram testados por ANOVA ou Kruskal-Wallis e as médias comparadas por Fisher protected test. FGF2 aumentou a porcentagem de oócitos em VGBD (18.89±5.86a, 43.36±6.68b, 33.63±6.55ab, 26.88±7.47a %; para 0, 1, 10 e 100ng/mL, respectivamente), sem afetar a progressão da meiose as 22 horas ou expressão gênica. Expressão de FGF2 nas CC não foi influenciada pelo oócito as 4 horas. As 22 horas, entretanto, a abundância relativa de RNAm de FGF2 foi menor em OOX comparado ao COC intacto. A adição de OD ao OOX não restaurou inteiramente a expressão de FGF2 (4.41±0.74a, 1.82±0.12b, 3.19±0.55ab para COC, OOX e OOX+OD, respectivamente), sugerindo que a influência do oócito pode ser parcialmente regulada pelos fatores secretados pelo oócito e, também, envolve diretamente a comunicação celular. Em conclusão, o presente estudo sugere que o FGF2 está envolvido em mecanismos que conduzem a GVBD. Assim como, a expressão de FGF2 é regulada pelo oócito e deve apresentar um mecanismo pelo qual o oócito regula sua própria maturação.

**Palavras-chave:** Células do cumulus; bovino; maturação

SBTE 207 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Número de submissão 1635

**Análise morfológica, citológica e qualidade oocitária de tratos reprodutivos de fêmeas bovinas submetidas ao abate**

Larissa Marchiori Sena; Ítalo Câmara de Almeida; Nara Clara Lazaroni e Merchid; Jacymara Dutra Santos; Thadeu de Castro; Bianca Carvalho dos Santos Albuquerque; Maria Augusta Pires da Luz Chieppe; José Oliveira Carvalho; Carla Braga Martins

*Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, Brasil.*

As desordens que causam infertilidade e subfertilidade em fêmeas bovinas podem ser de caráter infeccioso ou não, ou ainda oriundas de erros de manejo e nutrição. Infecções uterinas estão entre as principais causas de infertilidade, influenciando negativamente na atividade ovariana e no desempenho reprodutivo dos animais. Dessa forma, propõe-se caracterizar as principais afecções reprodutivas por meio de avaliações macroscópicas e citológicas de úteros de fêmeas bovinas, buscando pontuar as desordens que levam à diminuição da eficiência reprodutiva, além de correlacionar os diferentes graus de infecção uterina com o percentual de qualidade oocitária dos animais. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Federal do Espírito Santo, sob número 76/2015. 98 tratos reprodutivos foram obtidos de abatedouros. Dentre os aspectos macroscópicos foram avaliadas alterações relacionadas a morfologia, consistência e coloração. Inflamações foram classificadas de acordo com o aspecto da secreção uterina, sendo: Infecção clínica moderada (grau II): presença de muco turvo ou catarral; Infecção clínica severa (grau III): presença de muco purulento (Ferreira et al., Pesquisa Agropecuária Brasileira 22:339-344, 1987). O diagnóstico das infecções uterinas subclínicas (grau I) foi realizado por meio da citologia endometrial obtida por raspados endometriais. Onde, com base no percentual de neutrófilos, a partir da contagem de 200 células, classificou-se como infecção subclínica a presença acima de 3% de neutrófilos (Salasel et al., Theriogenology, 74:271-1278, 2010). A qualidade oocitária de cada ovário/animal foi realizada de acordo com o número de camadas de células do cúmulo e o aspecto do citoplasma, sendo classificados como: grau I: qualidade excelente, grau II: intermediária e grau III: inferior. Os resultados foram submetidos a análise estatística descritiva, ao teste de correlação de Spearman e pós-comparação ao teste T de Student, à nível de 5% de significância. Dentre as alterações ovarianas, observou-se 1,02% de cistos ovarianos, agenésia ovariana e ooforites. 4,08% dos animais tiveram espessamento de parede uterina. 1,02% dos animais mostraram aumento de comprimento dos cornos uterinos, fibrose uterina e presença de coágulos. Infecções uterinas clínicas foram encontradas em 12,24% dos casos. 6,12% dos animais apresentaram citologia endometrial positiva, sendo diagnosticados com infecção uterina subclínica. Na análise do coeficiente de correlação linear de Spearman houve correlação negativa ( $r = -0,14$ ), não significativa entre os graus de infecção uterina e as taxas de oócitos grau I e II recuperados. Infecções uterinas clínicas e subclínicas foram as alterações mais encontradas, sendo possíveis causas de diminuição da fertilidade. Não houve correlação significativa entre os graus de infecção uterina e a qualidade oocitária dos animais.

**Palavras-chave:** Células do cumulus; infecções uterinas; neutrófilos

SBTE 208 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Número de submissão 1647

**Estacionalidade reprodutiva em cabras da raça Saanen manejadas no sudeste brasileiro**

Mário Felipe Alvarez Balaro<sup>1</sup>; Alex Silva Santos<sup>1</sup>; Samuel Guarana Valverde Mello<sup>1</sup>; Luiza Mattos Cavalcanti<sup>1</sup>; Loara Helena Santana Gonçalves<sup>1</sup>; Luis Fernando Guaraná Macedo Moura<sup>1</sup>; Joanna Maria Gonçalves de Souza Fabjan<sup>1</sup>; Jeferson Ferreira da Fonseca<sup>2</sup>; Felipe Zandonadi Brandão<sup>1</sup>

1.Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; 2.Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral, CE, Brasil.

Objetivou-se caracterizar a estacionalidade reprodutiva durante o período de um ano em cabras da raça Saanen manejadas no Sudeste Brasileiro. O estudo foi realizado em um capril localizado no município de Niterói, Rio de Janeiro (Latitude 22° 52' 30''sul). Foram utilizadas 24 cabras da raça Saanen (3,2 ± 2,1 anos) mantidas sob sistema intensivo de criação. A cada três meses, representando cada estação do ano, foi realizada a pesagem dos animais em balança própria e avaliado o escore de condição corporal (ECC) (Detweiler, G., Annual Goat Field Day, v.23, p.127-133, 2008). A cada 14 dias, o sangue foi colhido através de venopunção jugular em tubo a vácuo (Vacutainer®, BD, Nova Jérsei, EUA) sem anticoagulante, para obtenção do soro. As dosagens de progesterona (P4) séricas foram realizadas por meio da técnica de radioimunoensaio de fase sólida utilizando kits comerciais (MP Biomedicals, Inc, Orangeburg, NY). Para o cálculo de frequência da ciclicidade, consideraram-se como cabras não cíclicas, animais com valores de P4 ≤ 1,0 ng/mL por duas mensurações consecutivas. Os dados de desempenho ponderais e hormonais foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis e comparação de médias pelo teste de Dunn (P<0,05). Não foram encontradas diferenças (P>0,05) no peso corporal e ECC das cabras ao longo das quatro estações do ano (65,1 ± 22 kg; ECC: 3,4 ± 0,4). Com relação às concentrações séricas de P4 e frequência de cabras cíclicas, foram obtidos valores mais elevados (P<0,05) a partir do final de março até o início de agosto (3,3 ± 1,1 ng/mL) com pico de maio até julho (3,9 ± 0,5 ng/mL). Neste período, 93,8% (22/24) das cabras estavam cíclicas, compatíveis com a estação reprodutiva. A partir do final de agosto até o meio de dezembro foram obtidos valores séricos mais baixos (P<0,05) de P4 (0,2 ± 0,4 ng/mL). Neste período, apenas 12,5% (3/24) das cabras estenderam a estação reprodutiva até o meio de setembro. Na sequência, 100% (24/24) das cabras entraram em anestro estacional. A volta da atividade reprodutiva e valores séricos de P4 similares aos encontrados na estação anterior iniciaram no meio de dezembro até o início de março (3,9 ± 2,6 ng/mL) com pico no final de fevereiro até março (6,7 ± 2,3 ng/mL). De dezembro até março, 38,9% (9/24) e 61,1% (15/24) das cabras apresentaram ciclos estrais contínuos e alternados (fase de transição), respectivamente. No período de pico (fev-mar), 83,3% (20/24) das cabras estavam cíclicas. Estes resultados endossam metodologias hormonais (sincronização do estro e indução do estro sincronizado) ou naturais (efeito macho, flushing ou tratamento com luz) mais adequadas de acordo com a época do ano na região. Cabras da raça Saanen, manejadas sob clima tropical no Sudeste Brasileiro, apresentam uma estação reprodutiva definida no período de março até meados de agosto com fase de transição ao anestro em setembro. Este se estende até meados de dezembro em que se inicia a fase de transição para a estação reprodutiva em março.

**Palavras-chave:** Progesterona; ciclo estral; ciclicidade

SBTE 209 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Número de submissão 1665

#### **Parâmetros reprodutivos de rebanhos leiteiros criados em diferentes sistemas no oeste e sudoeste do estado do Paraná**

Thainá Minela<sup>1</sup>; Fernando Bracht<sup>2</sup>; José Manuel Constâncio Mendonça<sup>2</sup>; Thiago de Oliveira Cunha<sup>2</sup>; Taison Souza Balestrin<sup>1</sup>; Ana Paula Martini<sup>1</sup>; Gilson Antonio Pessoa<sup>3</sup>; Janislene Mach Trentin<sup>3</sup>; Mariani Farias Fiorenza<sup>3</sup>; Mara Iolanda Batistella Rubin<sup>1</sup>

1.UFSM, Santa Maria, RS, Brasil; 2.B&M Consultoria Agropecuária LTDA, Cascavel, PR, Brasil; 3.UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

Em rebanhos leiteiros a eficiência reprodutiva é influenciada por diversos fatores. Mediante muitos desafios, as vacas podem não desempenhar o potencial genético esperado. Neste estudo, foram utilizados dados disponibilizados pela empresa B&M Consultoria Agropecuária Ltda do mês de set/2015 a abr/2016, obtidos de 15 rebanhos leiteiros (n=15, n=746 vacas) do oeste/sudoeste do Paraná e mantidos em diferentes sistemas de criação: Compost Barn (CB=1, n=48 vacas), Freestall (FS=2 n=212 vacas) e Semi-confinamento (SC=12, n=486 vacas). As vacas de todos os sistemas foram inseminadas após manifestação natural de cio, ou sincronização do estro e ovulação com progestágenos (Pereira et al. 2015, J. Dairy Sci. 98:947–959). Todos os animais foram examinados por ultrassonografia (US) mensalmente. Considerou-se morte embrionária (ME) ≤60 dias. O efeito da Contagem de Células Somáticas do tanque (x10<sup>3</sup>/ml leite) e produção de leite (kg/vaca/dia) foram avaliados nos parâmetros: dias em lactação (DEL), dias em aberto (DA) e morte embrionária. A influência da temperatura ambiente (T°C) dos meses com média ≤25°C (set/15, out/15, nov/15 e abr/16) ou ≥25°C (dez/15, jan/16, fev/16 e mar/16) foi analisada sobre a produção leiteira, CCS, DEL, DA e ME. Os dados foram analisados pelo PROC GLIMMIX, PROC REG no programa SAS 9.3. A produção de leite (kg/vaca/dia) no sistema CB foi 17,0±2,3 kg/vaca/dia, no FS 21,9±0,33 kg/vaca/dia e no SC 20,4±1,38 kg/vaca/dia, sendo similar entre os sistemas e não comprometeu os parâmetros reprodutivos. A ME foi maior (P=0.03) no sistema FS (62.5±3,6%), em relação aos CB e SC, 38,5±0,5 e 18±0,5%, respectivamente. A CCS no tanque foi maior (P=0,0384) no sistema FS (2266±987,9 x 10<sup>3</sup>/mL) comparado aos sistemas CB (817.5±13,5 x 10<sup>3</sup>/mL) e SC (782,4±114,2 x 10<sup>3</sup>/mL). O aumento da CCS coincidiu com a ocorrência de morte embrionária (P=0.0004, R<sup>2</sup>=0,627, ME=-0,03 + 0.00028\*CCS). A queda da produção de leite (P<0.0001) nos três sistemas coincidiu com o período quente, cuja média dos meses com T°C ≥25°C foi 19,4± 1,0

kg/vaca/dia e meses com  $T^{\circ}C \leq 25^{\circ}C$  foi  $21,1 \pm 1,28$  kg/vaca/dia. O DEL dos rebanhos foi influenciado pelo clima ( $P=0,0027$ ). Os meses quentes elevaram o valor de DEL dos rebanhos ( $220 \pm 11,1$  dias), enquanto que em meses de temperatura amena o DEL foi menor ( $199,3 \pm 10,3$  dias). Houve interação dos sistemas e clima ( $P<0,0001$ ). O DEL médio foi maior no sistema FS ( $241 \pm 33$  e  $273 \pm 24,5$  dias); intermediário no CB ( $234,7 \pm 5$  e  $272,5 \pm 7$  dias) e menor no SC ( $189,3 \pm 10,3$  e  $206,1 \pm 9,9$  dias) em meses de  $T^{\circ}C$  média  $\leq$  ou  $\geq$  a  $25^{\circ}C$ , respectivamente. A temperatura  $\leq 25^{\circ}C$  ( $161 \pm 14,1$  dias) ou  $\geq$  a  $25^{\circ}C$  ( $163,5 \pm 12,4$  dias) não interferiu nos DA ( $P=0,5541$ ), porém no sistema FS ( $223,1 \pm 37,1$  dias) os DA foram maiores ( $P<0,0001$ ) seguido pelo CB ( $201,63 \pm 11$  dias) e SC ( $149 \pm 13,04$  dias). O aumento da CCS esteve relacionado com aumento de morte embrionária nos rebanhos. A eficiência reprodutiva foi influenciada negativamente pela temperatura e práticas de manejo de cada sistema de criação.

**Palavras-chave:** Vacas de leite; morte embrionária; contagem células somáticas

SBTE 210 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Número de submissão 1669

**Dieta insulínogênica, após seu fornecimento, aumenta progesterona circulante mas não altera a expressão gênica de enzimas hepáticas que metabolizam progesterona em vacas holandesas não lactantes**

Camila Spies<sup>1</sup>; Aurea Maria Oliveira Canavessi<sup>1</sup>; Monique Mendes Guardieiro<sup>2</sup>; Pedro Leopoldo Jerônimo Monteiro Jr<sup>1</sup>; Louise Helen de Oliveira<sup>1</sup>; Leonardo de França e Melo<sup>1</sup>; Jessica Nora Drum<sup>1</sup>; Jessica Zulatto dos Anjos<sup>1</sup>; Alan dos Anjos<sup>1</sup>; Roberto Sartori<sup>1</sup>

1.ESALQ/USP, Piracicaba, SP, Brasil; 2.LANAGRO, Campinas, SP, Brasil.

Algumas linhas de pesquisa defendem que a metabolização de progesterona (P4) diminui em situações de alta insulina circulante devido à menor expressão gênica de enzimas hepáticas. Por outro lado, foi demonstrado que ingestão de matéria seca aumenta o fluxo sanguíneo hepático e favorece a metabolização de hormônios esteroides. Os objetivos desse estudo foram avaliar as concentrações circulantes de P4 antes e após o fornecimento de dietas de manutenção (isoenergéticas e isoproteicas) contendo diferentes fontes de carboidrato (milho – mais insulínogênico vs. polpa cítrica – menos insulínogênica) e comparar a expressão gênica das enzimas que metabolizam a P4. As dietas experimentais foram fornecidas por 70 d para 22 vacas holandesas não gestantes e não lactantes, em delineamento em crossover. As enzimas hepáticas avaliadas foram: Citocromo P450, família 2, Subfamília C, polipeptídeo 19; (CYP2C19); Citocromo P450, família 3, Subfamília A, polipeptídeo 4 (CYP3A4); Aldoketoreductase, família 1, membro C4 (AKR1C4); Aldoketoreductase, família 1, membro D1 (AKR1D1). As vacas foram sincronizadas e superovuladas conforme segue: d0: implante de P4 + BE; d4 ao d7: 2 doses diárias de FSH totalizando 300mg; d6: duas doses de PGF2 $\alpha$ ; d8: GnRH a.m. e IA p.m.; d9: IA a.m.; d15: colheita dos embriões. Biópsia hepática foi realizada 8 d após o estro, 4 h após o fornecimento do alimento, no final de cada réplica. As amostras hepáticas foram mantidas em RNAlater a  $-80^{\circ}C$  até avaliação. Amostras sanguíneas foram colhidas 6 d após o estro, imediatamente antes do fornecimento do alimento para dosagem por RIE de insulina e P4 e 4 h após, para a dosagem de P4. A análise de expressão gênica (RT-qPCR) foi realizada utilizando-se kit LightCycler 480 Sybr Green Master (Roche) de acordo com as instruções do fabricante. A análise estatística foi realizada utilizando o PROC MIXED do SAS 9,3 para as concentrações hormonais. Os dados de expressão gênica foram avaliados através de delta-delta CT e PROC GLIMMIX do SAS 9,3. A concentração circulante de insulina foi de  $15,8 \pm 0,9$  para o milho e  $11,5 \pm 0,9$   $\mu UI/mL$  para o grupo polpa cítrica ( $P < 0,01$ ). A P4 circulante, 4 h após o fornecimento de alimento, aumentou em 17% no grupo milho vs. 6% no grupo polpa cítrica ( $P < 0,01$ ). A expressão gênica das enzimas que metabolizam P4 foi igual entre os tratamentos, sendo a expressão relativa de milho vs. polpa cítrica, para as enzimas estudadas, respectivamente: CYP2C19: 0,26 vs. 0,27 ( $P = 0,87$ ), CYP3A4: 0,19 vs. 0,10 ( $P = 0,46$ ), AKR1C4: 0,16 vs. 0,13 ( $P = 0,37$ ) e AKR1D1: 4,47 vs. 3,87 ( $P = 0,41$ ). Além disso, não houve diferença ( $P > 0,10$ ) na expressão relativa das enzimas quando insulina circulante mais alta vs. mais baixa foi comparada, independente de tratamento. Conclui-se que, apesar de não influenciar a expressão gênica de enzimas que metabolizam a P4, o fornecimento de dieta insulínogênica parece promover um aumento imediato na produção de P4.

**Palavras-chave:** Progesterona; insulina; catabolismo hepático

SBTE 211 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Número de submissão 1673

**O embrião bovino modula a função do endométrio 7 dias após o estro *in vivo***

Mariana Sponchiado<sup>1</sup>; Nathália Souza Gomes<sup>1</sup>; Patrícia Kubo Fontes<sup>2</sup>; Maressa Izabel Santos da Silva<sup>1</sup>; Thiago Martins<sup>1</sup>; Guilherme Pugliesi<sup>1</sup>; Maite Del Collado<sup>1</sup>; Athos de Assumpção Pastore<sup>3</sup>; Marcelo Fabio Gouveia Nogueira<sup>2</sup>; Mario Binelli<sup>1</sup>

1.Universidade de São Paulo - USP, Pirassununga, SP, Brasil; 2.UNESP, Botucatu, SP, Brasil; 3.CRV Lagoa, Sertãozinho, SP, Brasil.

O trato reprodutivo materno tem um importante papel no desenvolvimento embrionário inicial. Secreções ovidutais e uterinas provêm o ambiente ótimo de estabelecimento e manutenção da gestação. Os embriões bovinos produzem interferon-tau (IFN-t) a partir do dia 6 após a IA. No entanto, não há evidências de que o embrião afeta o funcionamento do endométrio antes de ocorrer seu alongamento, o qual ocorre 13 dias após a IA. Nossa hipótese foi que o embrião afeta

o funcionamento do endométrio, incluindo a resposta ao IFN- $\gamma$ , de maneira espaço-específica 7 dias após a IA. Especificamente, respostas do endométrio à presença do embrião foram esperadas da região mais proximal à distal ao oviduto. O ciclo estral de vacas Nelore múltíparas e não lactantes foi sincronizado e os animais foram alocados em um dos dois grupos experimentais no momento do estro (D0): Controle (Con; n=8), onde a inseminação foi mimetizada com diluidor seminal; ou Gestante (Gest; n=16), vacas foram inseminadas com a mesma partida de sêmen bovino comercial, 12h após o estro. As vacas foram abatidas no D7 e o corno uterino ipsilateral ao CL foi isolado e dividido em terço anterior, médio e posterior, a partir da junção útero-tubárica (JUT). Cada terço uterino foi lavado isoladamente com D-PBS e a presença do embrião no lavado foi confirmada nas vacas do grupo Gest. Subsequentemente, amostras de endométrio intercaruncular foram coletadas da JUT e de cada terço uterino na região mesometrial. A abundância relativa de transcritos para os Genes estimulados por interferon (ISGs; MX1, MX2, ISG15, OAS1, IFI6 e IRF6), Receptor de interferon 2 (IFNAR2), Sintase de prostaglandina E (PTGES) e genes de referência (GAPDH, PPIA e ACTB) foram avaliadas nas amostras de endométrio por PCR usando a plataforma Fluidigm (Biomark HD). Os dados de abundância relativa de transcritos foram analisados por split-plot ANOVA (SAS v. 9.3). O tamanho do folículo pré-ovulatório, área do CL e concentração plasmática de P4 foram similares entre os grupos ( $p>0.1$ ). Todos os embriões (n=10) foram encontrados nos lavados do terço anterior. Verificou-se interação entre grupo e região para a abundância de transcritos de ISG15 ( $p<0.02$ ), MX2 ( $p<0.03$ ), MX1 ( $p<0.07$ ) e PTGES ( $p<0.05$ ). A abundância de ISG15, MX1, MX2 e PTGES foi maior (2.0, 1.5, 1.95 e 1.4-vezes, respectivamente) na JUT do grupo Gest, porém foi similar nas demais regiões. Houve efeito de região na abundância de mRNA para IFNAR2 ( $p<0.04$ ), sendo a expressão aumentada na JUT comparada às demais regiões. Em resumo, propomos que o IFN- $\gamma$  liberado pelo embrião atua através de receptores específicos no endométrio para estimular a transcrição de ISGs e, possivelmente, outros genes. Além disso, a proximidade física do embrião parece ser necessária para estimular o endométrio, provavelmente por causa da capacidade limitada de síntese e secreção de sinais pelo embrião nesta fase inicial. Esta é a primeira vez que essa resposta do endométrio ao embrião precoce é relatada *in vivo*. Potenciais papéis iniciais do IFN- $\gamma$  são desconhecidos e merecem mais estudos. Nós especulamos que a sinalização pelo embrião modula a função endometrial para apoiar o desenvolvimento embrionário.

**Palavras-chave:** Desenvolvimento embrionário pré-implantacional; endométrio; expressão gênica

SBTE 212 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Número de submissão 1680

#### **Estradiol modula a expressão de genes envolvidos na síntese de PGF2 $\alpha$ no endométrio de fêmeas bovinas**

Milena Lopes Oliveira<sup>1</sup>; Angela Maria Gonella-Díaz<sup>1</sup>; Saara Carolina Scolari<sup>1</sup>; Roney Santos Ramos<sup>1</sup>; Guilherme Pugliesi<sup>1</sup>; Mario Binelli<sup>1</sup>; Claudia Maria Bertan Membrive<sup>2</sup>

1.USP, Pirassununga, SP, Brasil; 2.UNESP, Dracena, SP, Brasil.

Em bovinos, o estradiol exerce importante participação na liberação de PGF2 $\alpha$  endometrial associada com a luteólise. A produção de PGF2 $\alpha$  resulta da estimulação de receptores de oxitocina e subsequente ativação de uma cascata de eventos intracelulares. Entretanto, os mecanismos moleculares pelos quais o estradiol atua na cascata geradora de PGF2 $\alpha$  endometrial são pouco conhecidos. A hipótese é que o estradiol aumenta a expressão gênica de proteínas envolvidas na cascata geradora de PGF2 $\alpha$  no endométrio de fêmeas bovinas. Vacas Nelore (N=52), pluríparas, cíclicas e não lactantes receberam 2mg de benzoato de estradiol (Sincrodiol, Ouro fino® Cravinhos, Brazil) e um dispositivo intravaginal de progesterona (1g; Sincrogest; Ourofino®, Cravinhos, Brazil) por 8 dias. As vacas receberam 0,5mg de cloprostenol sódico (Sincrocio; Ourofino, Cravinhos, Brazil) via IM, 48 horas antes da retirada e uma segunda aplicação na retirada do dispositivo. No dia 15 do ciclo estral (D0; estro) foram administrados os seguintes tratamentos: placebo (P; 5mL de etanol 50%; via IV), estradiol (E; 5mL de etanol 50% contendo 3mg de 17 $\beta$  estradiol; IV) ou controle (não tratado). Considerou-se o momento da aplicação dos tratamentos como a hora 0. As vacas foram submetidas a uma biópsia endometrial, via transcervical e de acordo com o momento da biópsia foram subdivididas nos seguintes grupos: hora 0 no grupo controle (C; n=10), e nos momentos 4 horas (E4; n=11 e P4; n=10) ou 7 horas (E7; n=10 e P7; n=11). O tecido obtido por biópsia foi analisado por qRT-PCR, para quantificação de transcritos dos genes: PTGS2, PLA2G4, ESR1, ESR2, OXTR, PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ , AKR1CB1 e AKR1C4. A abundância de transcritos foi analisada por two-way ANOVA e por teste de médias. O gene PTGS2 ( $P<0,05$ ) apresentou menor expressão nos grupos P7 e E7 comparado aos grupos P4 e E4, respectivamente. A expressão dos genes PLA2G4 e ESR1 no grupo E4 foi menor comparada à do E7 ( $P<0,05$ ). Nos grupos E4 e E7 observou-se menor expressão do gene ESR2 comparada às dos demais grupos ( $P<0,05$ ). Observou-se maior expressão de OXTR nos grupos E4 e E7 ( $P<0,05$ ) comparada às demais. Houve menor expressão de PRKC $\alpha$  no grupo E7 comparada às demais ( $P<0,05$ ). Verificou-se menor expressão de PRKC $\beta$  nos grupos P7 e E7 ( $P<0,05$ ) comparada às demais. A expressão de AKR1B1 e AKR1C4 foi menor ( $P<0,05$ ) nos grupos E4 e E7 comparada às dos outros grupos. Conclui-se que, com exceção do OXTR, a administração de estradiol reduziu a expressão gênica da maioria das proteínas envolvidas de síntese de PGF2 $\alpha$ , indicando um feedback negativo agudo na transcrição desses [A1] genes. Sugere-se que, em um momento anterior ao das biópsias realizadas, tenha ocorrido aumento da expressão desses mesmos genes. Assim, torna-se necessária a avaliação da expressão proteica, para identificar se a diminuição na abundância dos transcritos está associada a um aumento na abundância de proteínas após quatro horas do tratamento.

**Palavras-chave:** Luteólise; prostaglandina; endométrio

SBTE 213 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Número de submissão 1681

**A produção de embriões bovinos sob estresse oxidativo e glicêmico leva a perda do controle transcricional**

Camila Bruna de Lima<sup>1</sup>; Jéssica Ispada<sup>1</sup>; Erika Cristina dos Santos<sup>2</sup>; Patrícia Kubo Fontes<sup>3</sup>; Marcelo Fabio Gouveia Nogueira<sup>3</sup>; Marcella Pecora Milazzotto<sup>2</sup>

1.USP, São Paulo, SP, Brasil; 2.UFABC, Santo André, SP, Brasil; 3.UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

Embora Técnicas de Reprodução Assistida venham sendo usadas por mais de 30 anos, há ainda algumas preocupações a respeito de como a manipulação de embriões pode impactar na saúde da prole. Embriões produzidos *in vitro* (PIV) são submetidos a inúmeras formas de estresse durante o cultivo *in vitro*. Muitos estudos mostraram que a exposição a diferentes concentrações de glicose e/ou altas tensões de oxigênio podem levar ao bloqueio do desenvolvimento e blastocistos de baixa qualidade. O desafio é definir marcadores de estresse embrionário para formular condições de cultivo mais apropriadas para o sucesso da PIV. Neste contexto, o estudo de expressão gênica representa uma ferramenta valiosa para avaliar o impacto do estresse celular e desvios do fenótipo normal. Assim, este estudo avaliou como o genoma dos embriões responde a diferentes condições estressoras. Para isto, embriões bovinos foram produzidos *in vitro* seguindo os protocolos convencionais em 4 replicatas. Os embriões foram cultivados em diferentes tensões de oxigênio (20 e 5%) a partir do dia 0 e também em diferentes concentrações de glicose (0,2mM, 0,6mM e 1mM) após o dia 3. Um total de 72 blastocistos de 6 grupos foram coletados para análise no dia 7. O perfil de transcrição de 96 genes foi avaliado com Sistema BioMark HD (Fluidigm, San Francisco). Após a análise estatística, os genes foram considerados relevantes quando  $1,5 \leq \text{Fold-Change} \leq 0,66$ . Embora não haja diferença estatística, as taxas de blastocisto aumentam gradualmente com a concentração de glicose (25,19% [0,2mM], 29,92% [0,6mM] e 36,09% [1mM]) em 20% de O<sub>2</sub> e (24,16% [0,2mM], 26,11% [0,6mM] e 37,35% [1mM]) em 5% de O<sub>2</sub>. Para a quantificação relativa de transcritos, o grupo 0,6mM–5%O<sub>2</sub> foi usado como uma referência fisiológica. Ao todo, 56 transcritos apresentaram diferenças em pelo menos um grupo quando comparado ao grupo de referência. Além disso, 5 genes são menos expressos em todos os outros grupos analisados, enquanto 7 genes são mais expressos quando comparados com a mesma referência. Uma investigação mais profunda revelou que embriões cultivados em concentrações de glicose mais altas (1mM) ou mais baixas (0,2mM) em ambas as tensões de oxigênio apresentaram uma maior expressão de genes relacionados ao ciclo celular (CDK6, NFKB2, PFKP), diferenciação e qualidade (IFITM3, IGFBP4, PAF1, DDIT3). Além disso, a transcrição de genes relacionadas à iniciação de apoptose (CASP9), a função mitocondrial (AUH) e reparo do DNA (MORF4L2) aparecem regulados negativamente nos mesmos grupos. A ativação do genoma em resposta às condições ambientais reflete em alterações na homeostase metabólica. Em geral, os nossos resultados revelaram uma desregulação da expressão de genes importantes e que podem se traduzir em perturbações do desenvolvimento e fenótipos anormais na prole.

**Palavras-chave:** Hiperglicemia; estresse oxidativo; PIV

SBTE 214 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Número de submissão 1693

**Pré-maturação oocitária de duas horas com forskolin e IBMX modula os perfis lipídico e de expressão gênica em blastocistos bovinos produzidos *in vitro***

Eduardo Montanari Razza<sup>1</sup>; Mateus José Sudano<sup>2</sup>; Katia Roberta A. Belaz<sup>3</sup>; Patrícia Kubo Fontes<sup>1</sup>; Fernanda Fagali Franchi<sup>1</sup>; Priscila Helena Santos<sup>1</sup>; Marcos Nogueira Eberlin<sup>3</sup>; Mariana Fernandes Machado<sup>1</sup>; Marcelo Fabio Gouveia Nogueira<sup>4</sup>

1.UNESP-Botucatu, Botucatu, SP, Brasil; 2.UNIPAMPA, Uruguai, RS, Brasil; 3.UNICAMP, Campinas, SP, Brasil; 4.UNESP, Assis, SP, Brasil.

Diferentes sistemas de maturação *in vitro* (MIV) têm sido extensivamente testados para melhorar a eficiência da produção *in vitro* de embriões (PIVE). Testamos aqui um sistema de pré-maturação (PM) que utiliza forskolin (FSK) e 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) a fim de manter níveis ótimos de adenosina monofosfato cíclica no oócito. No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos deste sistema sobre a qualidade dos blastocistos produzidos. O acúmulo de lipídios nos embriões PIV relaciona-se a um baixo potencial de desenvolvimento e criopreservação de embriões, especialmente quando comparado com embriões *in vivo*. Nosso objetivo foi avaliar se a PM de oócitos por 2 h com FSK e IBMX pode afetar o perfil lipídico e a expressão diferencial de genes relacionados à qualidade de blastocistos após PIVE. Para tanto, complexos cumulus-oócitos (CCO) bovinos foram submetidos ao sistema de PM, no qual foram maturados (2 h) em meio TCM199 com FSK (100 µM) e IBMX (500 µM), seguido de 24 h de MIV convencional [TCM199, FSH recombinante humano (0,1 UI/ml), albumina sérica bovina (4 mg/mL), piruvato (0,011 g/mL), amicacina (16,67 mg/mL) - grupo Pré-MIV]. Simultaneamente, CCO foram cultivados durante 24 h com os mesmos meios de MIV convencional descritos acima (grupo controle). Oócitos maturados foram igualmente fecundados e cultivados até o estágio de blastocisto. O perfil lipídico de blastocistos

individuais foi avaliado qualitativamente espectrometria de massa (MALDI-MS). A abundância de RNAm de 78 genes foi avaliada pelo sistema microfluídico de arranjo dinâmico BioMark HD System™ (Fluidigm®). Os dados de MALDI-MS foram adquiridos direta e individualmente sobre embriões no modo de íons positivos com o espectrômetro de massa Autoflex-III MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics) e matriz de 2,5-di-hidroxibenzóico ácido (DHB) para ionização do lipídios. Dados de lipídios foram analisados por abordagem estatística multivariada com o software MetaboAnalyst 3.0. Abundância relativa de genes expressos diferencialmente foi calculada pelo método  $\Delta\Delta Ct$  (gene alvo em relação à média dos endógenos: GAPDH, ACTB e PPIA) e grupos foram comparados através do teste-t com significância de  $P < 0,05$ . Resultados preliminares de MALDI-MS indicam forte variabilidade entre íons lipídicos de relação massa/carga ( $m/z$ ) de 704, 727, 729, 733, 743, 745, 747, 749, 757, 759, 763, 775, 782, 785, 787, 789, 791, 815, 835, 837 e 860. A abundância de RNAm de GPX4 e SREBP1 foi maior no controle do que no grupo Pré-MIV. Além disso, 4 genes apresentaram tendência a downregulation no grupo Pré-MIV [IGFBP4, IFITM3, OCLN e PGK1 ( $0,05 < P < 0,10$ )]. Estes resultados sugerem que a pré-maturação de oócitos por 2 h, foi capaz de afetar a qualidade dos blastocistos resultantes, estimado pelo perfil lipídico e pela abundância relativa de RNAm de genes relacionados à qualidade embrionária.

Apoio: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP): # 2012/50533-2 e #2012/23409-9.

**Palavras-chave:** Pré-maturação; blastocisto; *in vitro*

SBTE 215 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Número de submissão 1696

**Expressão gênica do corpo lúteo após pulsos intrauterinos com doses baixas de prostaglandina E1 e F2 alfa em vacas**  
Julían Camilo Ochoa<sup>1</sup>; Giovanni Baez<sup>2</sup>; Leonardo Melo<sup>3</sup>; Jessica Mota<sup>1</sup>; Francisco Peñagaricano<sup>4</sup>; Alvaro Guerra<sup>2</sup>; João Pinheiro<sup>1</sup>; Roberto Sartori<sup>3</sup>; Milo Wiltbank<sup>2</sup>

1.UNESP, Botucatu, SP, Brasil; 2.University of Wisconsin, Madison, Estados Unidos; 3.USP, Piracicaba, SP, Brasil; 4.University of Florida, Gainesville, Estados Unidos.

Em ruminantes a luteólise natural é caracterizada pela liberação de vários pulsos de prostaglandina F2alfa (PGF) produzidos pelo útero. PGF é o hormônio luteolítico, enquanto a prostaglandina E1 (PGE1) é considerada um mediador luteoprotetor. Em estudos anteriores, infusões com doses baixas de PGF no útero com intervalos de 6 horas resultou em regressão do corpo lúteo (CL). A proposta deste experimento é desenvolver um modelo para avaliar o efeito de baixas doses de PGE1, também infundidas no lúmen uterino sobre a resposta luteal a PGF intrauterina. Vacas no dia 10 do ciclo estral receberam infusões intrauterinas de salina (0.1 ml de salina + 0.1 ml de DMSO), PGE (2mg de PGE1 em 0.1ml de DMSO) ou PGF (0.25 mg of PGF em 0.1 ml of salina) em intervalos de 6 horas em um desenho experimental 2 X 2. Portanto os animais foram agrupados em quatro tratamentos: SALINA (4 infusões de salina; n=5), PGE (4 infusões de PGE1; n=5), PGF (4 infusões de PGF; n=5) e PGE+PGF (4 infusões de PGE1+PGF; n=5). As concentrações plasmáticas de P4 foram dosadas por radioimunoensaio e o volume luteal foi determinado por ultrassonografia transretal. Biopsias luteais foram coletadas de cada vaca 30 minutos após cada infusão para determinar a expressão de genes em resposta a cada tratamento. Os dados foram analisados pelo procedimento Proc Mixed do SAS, também foi utilizado o test Fisher LSD para avaliar as diferenças entre as médias em cada ponto no tempo. As concentrações de P4 diminuíram no grupo PGF em comparação com o grupo Salina no tempo 12 h (48.9% do controle) após a primeira infusão de PGF, no tempo 24 h (20.2% do controle), e em todos tempos subsequentes ( $P < 0.05$ ). Não foram encontradas diferenças nas concentrações circulantes de P4 entre os grupos Saline, PGE e PGF+PGE. Houve também uma diminuição do volume luteal entre o grupo PGF e os outros três grupos que foi observada nos tempos 24 (56.4% do controle), 48 (30.6% do controle), e 72 (20.4% do controle) h após o tratamento com PGF ( $P < 0.05$ ). Não houve diferenças no volume luteal entre os tratamentos salina, PGE e PGE+PGF. Por tanto infusões intrauterinas simultaneas de baixas doses de PGE1 bloquearam a ação luteolítica intrauterina de pulsos de PGF em vacas, como observado nas mudanças circulantes de P4 e volume luteal. Análises iniciais da expressão de genes realizados por biopsia luteal coletados após o terceiro pulso de PGF indicam o padrão típico de expressão de genes em resposta ao tratamento com PGF (FGF2, EGR1, FOS e FAS aumentaram; PTGFR, VEGFA, NR5A1 e STAR diminuíram) e o tratamento PGE1+ PGF bloqueou completamente a expressão destes genes. Infusões intrauterinas de PGF e PGE1 parecem ser um excelente modelo para determinar o padrão de expressão de genes envolvidos no efeito luteoprotetor da PGE1. Esse modelo permitiria determinar o papel da PGE1 nos mecanismos envolvidos no resgate do CL durante o início da gestação.

**Palavras-chave:** Corpo lúteo; luteólise; prostaglandina E1

SBTE 216 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Número de submissão 1701

**Avaliação de diferentes estratégias de suplementação mineral e vitamínica injetável (KIT Adaptador® MIN e Adaptador® VIT, Biogénesis Bagó) na melhoria das taxas de prenhez em vacas de corte**



Thiago Santin<sup>1</sup>; Milton Maturana Filho<sup>1</sup>; Kleber Menegon Lemes<sup>1</sup>; Manuel Agustin Silva<sup>1</sup>; Reuel Luiz Gonçalves<sup>2</sup>; Guillermo Alberto Mattioli<sup>3</sup>; João Paulo Mendes Lollato<sup>2</sup>; Juan Manuel Persico<sup>2</sup>; Eneiva Carla Carvalho Celeghini<sup>1</sup>; Ed Hoffmann Madureira<sup>1</sup>

1.FMVZ-USP, Pirassununga, SP, Brasil; 2.Biogénesis-Bagó, Curitiba, PR, Brasil; 3.Universidad Nacional La Plata, La Plata, Argentina.

A suplementação estratégica de vitaminas e minerais durante o período pré IATF tem sido associada a melhoria do desempenho reprodutivo em vacas de corte, no entanto, a carência de Selênio, Manganês, Zinco e Cobre, ocorre em grande parte do Brasil. Estes microminerais são essenciais a atividades antioxidativas, que podem contribuir com a fertilidade. A suplementação mineral injetável é opção economicamente viável para atender a demanda desses micronutrientes, principalmente em períodos de maior demanda. O objetivo desse estudo foi comparar diferentes estratégias para suplementação mineral e vitamínica injetável (KIT Adaptador® MIN e Adaptador® VIT, Biogénesis Bagó) durante a estação de monta de vacas da raça nelore (n=408). O experimento foi conduzido no setor de bovinos de corte do campus administrativo da USP de Pirassununga, utilizando um delineamento inteiramente casualizado com arranjo fatorial de tratamentos (2X2), sendo que os fatores avaliados foram a suplementação mineral e vitamínica. Os grupos experimentais foram G1) 2 doses de KIT Adaptador®, com intervalo de 20 dias; G2) 1 dose de KIT Adaptador® no início do protocolo; G3) 1 dose de KIT Adaptador® 20 dias antes do protocolo e, G4) controle (placebo). Desta forma, os animais (n = 408) foram distribuídos aleatoriamente entre os grupos. O protocolo hormonal utilizado foi: D0= inserção do implante Cronipres® Mono Dose com 1 g de P4+ aplicação de 2 mg de BE (Bioestrogen®, Biogénesis Bagó, Brasil); D8,5= retirada do implante intravaginal de P4+ aplicação de 300 UI de eCG (Ecegon®, Biogénesis Bagó, Brasil), + 75 µg de D-Cloprostenol (PGF2α, Croniben®, Biogénesis Bagó, Brasil) + 1mg BE (Bioestrogen®, Biogénesis Bagó, Brasil). No D10 foi realizada a IATF no período da manhã. A taxa de ciclicidade e a taxa de prenhez (TP) foram avaliadas por ultrassonografia (Mindray M5 Vet, com probe linear de 5,0 MHz). A avaliação de prenhez foi realizada nos dias 30 e 60 dias após a IATF. Os dados obtidos foram submetidos à análise de frequência pelo PROC FREQ e análise de regressão logística pelo PROC LOGISTIC, utilizando-se o programa Statistical Analyses System (SAS, 9.3) adotando-se nível de significância de 5%. Houve uma melhoria na ciclicidade (P<0.05) das vacas tratadas com KIT Adaptador® antes do início do protocolo (G1=59,2%, G2= 54,5%, G3=62,4% e G4=48,53%). A taxa de prenhez no diagnóstico de 30 dias foi maior nas vacas que receberam KIT Adaptador® (G1=52,5%, G2= 61%, G3=57,7% e G4=51,5%). A taxa de prenhez aos 60 dias (P<0.05) também foi melhor nos animais tratados (G1=51.4%, G2= 60%, G3=55.7% e G4=49.5%). Além disso, também houve uma maior taxa de ciclicidade (P<0.05) nas vacas suplementadas com Kit Adaptador®, que foram avaliadas para a resincronização no diagnóstico de 30 dias (G1=74.5%, G2= 64.3% G3=63.3% e G4=55.4%). As vacas que receberam a suplementação injetável de KIT Adaptador® tiveram um maior diâmetro folicular médio no momento da inseminação (G1=15.9%, G2=15.4%, G3=14.8% e G4=13.1%) e uma melhor vascularização (G1=61.4%, G2= 59.6%, G3=62.1% e G4=451.4%) do maior folículo avaliado no momento da IATF (P<0.05). Portanto, a suplementação estratégica com KIT Adaptador® MIN e Adaptador® VIT (Biogénesis Bagó) 20 dias antes ou no início do protocolo foi eficiente e economicamente viável na melhoria de resultados dos protocolos de IATF em bovinos de corte. A administração de duas doses foi eficiente tanto na melhoria de resultados do primeiro protocolo de IATF, como na manutenção da ciclicidade até o programa de resincronização.

**Palavras-chave:** Fertilidade; suplemento; doppler

SBTE 217 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Número de submissão 1702

#### **Expressão gênica de caspase15 em embriões suínos de diferentes grupos genéticos**

Lincoln Silva Amorim<sup>1</sup>; Taynan Stonoga Kawamoto<sup>2</sup>; Simone Elisa Facione Guimarães<sup>3</sup>; Priscila Vendramini Silva<sup>3</sup>; Paulo Sávio Lopes<sup>3</sup>; José Domingos Guimaraes<sup>4</sup>

1.Biotran, Cruz das Almas, BA, Brasil; 2.UFU, Uberlândia, MG, Brasil; 3.Departamento de Zootecnia Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil; 4.Departamento de Veterinária Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

A apoptose tem um papel importante no desenvolvimento embrionário pré-implantação, pois as células embrionárias estão sujeitas aos danos no DNA que podem ativar mecanismos de reparo ou induzir a apoptose. Esta última culmina com a ativação da enzima caspase responsável pela clivagem de vários substratos celulares. O objetivo do presente estudo foi medir diferenças entre genes relacionados a apoptose como o da caspase (Casp15) entre embriões Piau e embriões de linhagem comercial de suínos. Marrãs de ambas genéticas foram abatidas ou submetidas a laparotomia exploratória para recuperação de embriões no dia 6 após o acasalamento (dia 0 = estro). A cirurgia foi realizada como descrito anteriormente (RD Cameron, Australian Veterinary Journal, 66, 314-318, 1989) e aprovada pelo comitê de ética da UFV. Embriões de genética comercial foram obtidos através de lavagem do trato uterino post-mortem 6 dias após o acasalamento, utilizando PBS a 37 °C acrescido de 1% de PVA. Os embriões foram classificados conforme as recomendações da IETS (International Embryo Transfer Society, 1998) e 65 blastocistos de grau I foram selecionados para o estudo (35 e 30 de Piau e linhagem comercial, respectivamente). Os embriões foram preservados em 2 µl de PBS com 1% de PVA, em criotubos, e mantidos em nitrogênio líquido até a extração de RNA. A extração foi realizada utilizando RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valência,

CA). O RNA total foi transcrito de forma inversa com ProtoScript M-MuLV First Strand cDNA Synthesis Kit (Biolabs, Ipswich, MA). PCR quantitativo em tempo real foi realizado utilizando GoTaq qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI) em ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems, Foster City, CA). Os primers foram desenhados a partir de sequências de suínos disponíveis no GenBank. A linearidade da amplificação por Casp15 RNAm foi semelhante ao do gene de referência, GAPDH. As reações foram realizadas usando 200 nM e 400 nM de iniciadores para Casp3 e GAPDH, respectivamente, e 1,6 ng do cDNA por reação de cada gene. As condições dos ciclos térmicos consistiram em 40 ciclos de 30 s de fusão a 95 ° C, seguido por 30 segundos de emparelhamento e extensão a 60 °C. Após amplificação, foi realizada uma análise da curva de fusão para validar a ausência de produtos não específicos (dados não mostrados). Dados de expressão gênica foram apresentados utilizando o método 2- $\Delta$ Ct (KJ Livak e TD Schmittgen 2001, Methods, 25, 402-408). Os resultados de expressão dos genes foram analisados usando procedimentos GLM (SAS Institute, Cary, NC). A expressão de RNAm de Casp15 não foi diferente entre os embriões pré-implantação de Piau e linhagem de suíno comercial ( $p > 0,05$ ). Apesar do fato de que nenhuma diferença foi encontrada, o desenvolvimento do embrião Piau e do tamanho da leitegada são diferentes quando comparados com outras raças.

**Palavras-chave:** Apoptose; transcritos; suínos

SBTE 218 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Número de submissão 1705

**Prevalência de Brucelose, Leptospirose e Neosporose em fêmeas bovinas com retenção de placenta no sudoeste do Paraná**

Yuri da Fontoura Porto<sup>1</sup>; Adalgiza Pinto-Neto<sup>1</sup>; Fabricio Bernardi<sup>2</sup>; Marina Gabriela Possa<sup>2</sup>; Geovan Vendruscolo<sup>1</sup>; Marcelo Falci Mota<sup>1</sup>; Antônio Campanha Martinez<sup>3</sup>; Rodolfo Casimiro Berber<sup>4</sup>

1.Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS, Realeza, PR, Brasil; 2.Autonoma, Realeza, PR, Brasil; 3.Universidade Estadual de Maringá, Umuarama, PR, Brasil; 4.Universidade Federal do Mato Grosso, Sinop, MT, Brasil.

A Brucelose e Leptospirose são doenças reconhecidas pelo potencial zoonótico, além de causar transtornos reprodutivos em bovinos, e a Neosporose, que acarreta em diminuição na produção leiteira. Considerando o impacto econômico e de desenvolvimento da produtividade que estas doenças predispõem, objetiva-se com esse estudo estabelecer a prevalência de Brucelose, Leptospirose e Neosporose em fêmeas bovinas acometidas pela retenção de placenta (RP) em rebanhos no Sudoeste do Paraná. As 84 fêmeas bovinas do estudo foram diagnosticadas com RP pela presença parcial ou total dos anexos fetais no útero desses animais após 12 horas do parto. Para o diagnóstico de Brucelose utilizou-se o exame sorológico do Antígeno Acidificado Tamponado, para Leptospirose a técnica de Soroaglutinação Microscópica, e para Neosporose a técnica de Imunofluorescência indireta. Foram diagnosticados positivos os animais com título igual ou superior à 1:100 (Leptospira) e 1:200 (Neospora). Em nenhum dos 84 animais com RP foi detectada a presença da bactéria B. abortus. Desses, 39,28% (33/84) foram reativos para um ou mais sorovares de Leptospira, 15,47% (13/84) foram positivos para N. caninum e 4,76% (4/84) foram reativos para sorovares de Leptospira sp. e N. caninum, concomitantemente. Fêmeas bovinas com RP apresentaram titulação para Leptospira sp e/ou Neospora sp, cuja presença desses agentes poderia se relacionar também a ocorrência da RP e outros problemas reprodutivos.

**Palavras-chave:** Bovinos de leite; doença reprodutiva; eficiência reprodutiva

SBTE 219 Embriologia, biologia do desenvolvimento e fisiologia da reprodução

Número de submissão 1710

**Efeito da suplementação mineral e vitamínica injetável, (KIT Adaptador<sup>®</sup> MIN e Adaptador<sup>®</sup> VIT, Biogénesis Bagó), associado a vacinação contra doenças reprodutivas (bioleptogen<sup>®</sup> e bioabortogen<sup>®</sup> h, biogénesis bagó) sobre as taxas de prenhez em vacas de corte**

Manuel Agustin Silva; Thiago Santin; Milton Maturana Filho; Kleber Menegon Lemes; Reuel Luiz Gonçalves; Guillermo Alberto Mattioli; João Paulo Mendes Lollato; Juan Manuel Persico; Eneiva Carla Carvalho Celeghini; Ed Hoffmann Madureira

FMVZ-USP, Pirassununga, SP, Brasil.

A suplementação injetável de vitaminas e minerais durante período de maior atividade e estresse pode melhorar a resposta antioxidativa, principalmente por atender a demanda de micronutrientes como Selênio, Manganês Zinco e Cobre e vitaminas como Retinol (A) e Tocoferol (E), que são deficientes na pastagem na maioria do território do Brasil. Estes microminerais e vitaminas são essenciais a atividades antioxidativas, com isso, a suplementação estratégica desses elementos, em períodos como na época de manejo durante a estação de monta e o período de vacinações, podem contribuir com melhoria da fertilidade em vacas de corte. A suplementação mineral injetável é opção economicamente viável para atender a demanda desses micronutrientes, principalmente em períodos de maior demanda. As doenças reprodutivas afetam significativamente o desempenho reprodutivo dos rebanhos no Brasil. O objetivo desse estudo foi verificar a eficiência da suplementação mineral e vitamínica injetável (Kit Adaptador<sup>®</sup> MIN e Adaptador<sup>®</sup> VIT, Biogénesis Bagó), associada a vacinação contra leptospirose e IBR/BVD (Bioleptogen<sup>®</sup> e Bioabortogen<sup>®</sup> H, Biogénesis Bagó) durante a estação de monta na melhoria da fertilidade de vacas da raça nelore (n=532). O experimento foi conduzido no setor de bovinos de corte do

campus administrativo da USP de Pirassununga, utilizando um delineamento inteiramente casualizado com arranjo fatorial de tratamentos (2X2), sendo que os fatores avaliados foram a suplementação mineral e vitamínica (KIT Adaptador® MIN e Adaptador® VIT, Biogénesis Bagó) e a vacinação contra Leptospirose e IBR/BVD, totalizando, portanto, quatro grupos experimentais. Desta forma, os animais (n=532) foram distribuídos aleatoriamente entre os grupos. Os animais tratados receberam a primeira dose de KIT Adaptador® e também das vacinas 20 dias antes do início do protocolo de IATF. No dia da colocação do implante foi feito o reforço da dose do produto e das vacinas. O protocolo hormonal utilizado foi: D0= inserção do implante Cronipres® Mono Dose com 1 g de P4 + aplicação de 2 mg de BE (Bioestrogen®, Biogénesis Bagó, Brasil); D8,5= retirada do implante intravaginal de P4 + aplicação de 300 UI de eCG (Ecegon®, Biogénesis Bagó, Brasil), + 75 µg de D-Cloprostenol (PGF2α, Croniben®, Biogénesis Bagó, Brasil) + 1mg BE (Bioestrogen®, Biogénesis Bagó, Brasil). No D10 foi realizada a IATF no período da manhã. A taxa de ciclicidade e a taxa de prenhez (TP) foram avaliadas por ultra-sonografia (Mindray DP2200 Vet, com probe linear de 5,0 MHz). A avaliação de Prenhez foi realizada nos dias 30 e 60 dias após a IATF. Os dados obtidos foram submetidos à análise de frequência pelo PROC FREQ e análise de regressão logística pelo PROC LOGISTIC, utilizando-se o programa Statistical Analyses System (SAS, 9.3) adotando-se nível de significância de 5%. Houve uma melhoria na ciclicidade (P<0.05) dos animais que receberam KIT Adaptador® (C=41.7%; Vac=60.8%; Adapt= 67.7%; Adapt+Vac=54,3%) e houve uma interação entre os fatores estudados (P=0,02 Adapt; P=0.05 interações) na taxa de prenhez aos 30 dias (C=48.9%; Vac=55.4%; Adapt= 70.8%; adapt+Vac=64,1%), e aos 60 dias (P<0.05) houve apenas o efeito de KIT Adaptador®, sendo (C=41.7%; Vac=52,1%; Adapt= 63.7%; adapt+Vac=55,4%). Portanto, a suplementação estratégica com Kit Adaptador® MIN e Adaptador® VIT, Biogénesis Bagó, associado as vacinas contra doenças reprodutivas é uma estratégia eficiente e economicamente viável na melhoria de resultados em programas de IATF de bovinos de Corte.

**Palavras-chave:** Fertilidade, suplementação injetável; vacinas reprodutivas; vacas nelore

SBTE 220 Clonagem, transgênese e células-tronco

Número de submissão 1456

#### **Geração *in vitro* de células germinativas primordiais (PGCS) a partir de células pluripotentes induzidas (IPS) em bovinos**

Fabiana Fernandes Bressan; Lucas Simões Machado; Naira Caroline Godoy Pieri; Flavio Vieira Meirelles

*Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, Brasil.*

O processo de reprogramação nuclear possui importantes contribuições tanto no estudo da ciência básica como aplicada, como por exemplo, no aumento da eficiência das biotécnicas de produção animal e na medicina, com a possibilidade de terapia celular autóloga para o tratamento de inúmeras enfermidades. Já foi relatado que as células pluripotentes embrionárias (CTEs), e mais recentemente as células-tronco induzidas à pluripotência (iPSCs), são capazes de se diferenciar em células similares às primordiais germinativas (PGCs) e até mesmo desenvolverem-se *in vitro* em gametas (oócitos e espermatozoides) nos modelos murino e humano. Este estudo objetivou a geração de PGCs *in vitro* (iPGCs) a partir de células iPS no modelo bovino e subsequente caracterização pela detecção de marcadores específicos de pluripotência e células germinativas. Para tal, duas linhagens de iPS bovinas previamente geradas e caracterizadas (Bressan et al., *Reprod Fertil Dev* 27; 2015) foram induzidas em PGCs *in vitro* (total de cinco repetições) a partir do protocolo adaptado ao descrito para células iPS murinas (Hayashi et al., *Cell* 146:4; 2011). Em resumo, as células iPS bovinas foram induzidas a um estado semelhante ao epiblasto (epiblast-like ou EpiLCs) em placas de seis poços cobertas por fibronectina (16,7µg/ml) em meio de cultivo N2B27 suplementado com activina A (20 ng/ml), bFGF (12ng/ml) e KSR (1%) por 48 horas e induzidas às iPGCs com o cultivo não aderente (placas Agreewell) em meio de cultivo GK15 (GMEM suplementado com 15% KSR, 0,1mM NEAA, 1mM de piruvato de sódio, 0,1mM 2-mercaptoetanol, 2mM L-glutamina e 1% antibióticos) na presença das citocinas BMP4 (500ng/ml), SCF (100 ng/ml), BMP8b (500ng/ml) e EGF (50ng/ml) por 4 dias. As estruturas obtidas foram caracterizadas quanto à morfologia, detecção da fosfatase alcalina e detecção dos marcadores específicos OCT4, DDX4, VASA e c-Kit por imunofluorescência. Foi possível gerar *in vitro* estruturas similares às PGCs com marcação positiva para as marcações em todas as estruturas testadas, sendo este resultado inédito no contexto mundial. A produção *in vitro* de PGCs a partir das células iPS representa uma importante ferramenta para as biotecnologias da reprodução provendo respostas importantes acerca dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos, tanto na reprogramação celular quanto na biologia das células germinativas pluripotentes.

**Palavras-chave:** IPS; PGCS; reprogramação celular

SBTE 221 Clonagem, transgênese e células-tronco

Número de submissão 1471

#### **Efeito da transfecção e co-incubação de espermatozoide bovino com DNA exógeno sobre a funcionalidade e qualidade para seu uso em transferência gênica mediada por espermatozoides**

Maria Elena Arias; Andrea Soledad Delgado; Esther Sánchez; Ricardo Nicolas Felmer

*Universidad de la Frontera, Temuco, Chile.*

Transferência gênica mediada por espermatozoide (SMGT) é baseada na capacidade do espermatozoide de se ligar a DNA exógeno e transferi-lo ao oócito durante a fertilização. Em bovinos o progresso desta técnica foi lento devido à pouca reprodutibilidade e baixa eficiência desta técnica nos embriões transgênicos da geração seguinte. O objetivo do presente estudo foi avaliar reagentes comerciais para transfecção sobre a qualidade espermática e parâmetro funcionais. Adicionalmente, a habilidade do espermatozoide de incorporar DNA exógeno também foi acessada. Estas análises foram conduzidas por citometria de fluxo e microscópio confocal de fluorescência e os parâmetros de motilidade também foram avaliados pelo sistema de análise computacional assistida (CASA). A transfecção foi realizada utilizando-se complexos de plasmídeo de DNA marcado com FITC + i) Lipofectamina (Lipofectamine® LTX-Plus™; Life Technologies, CA, USA), ii) SuperFect (SuperFect®; Qiagen, Hilden, Alemanha) e iii) TurboFect (TurboFect®; Thermo Scientific, MA, USA) por 0,5, 1, 2 e 4 h, respectivamente. As diferenças entre os tratamentos foram analisadas por ANOVA após transformação arco-seno dos dados proporcionais. Para identificar as diferenças entre os grupos, o pós-teste de Tukey foi realizado com nível de significância de  $P < 0,05$ . Os resultados mostraram que 100% dos espermatozoides transfectados ligaram ao DNA exógeno, incluindo o DNA controle sem transfecção. Ainda, os tratamentos SuperFect e TurboFect promoveram a incorporação de DNA exógeno ( $P < 0,05$ ). A viabilidade espermática foi afetada ( $P < 0,05$ ) apenas com Lipofectamina (73,4%) e TurboFect (62,9%), após 4 h de tratamento. Todos os tempos de incubação afetaram significativamente os parâmetros de motilidade, exceto para Lipofectamina e SuperFect após 0,5 h de incubação. A integridade do DNA níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) não foram afetadas em todos os tratamentos. Entretanto, transfecção utilizando SuperFect e TurboFect afetaram negativamente ( $P < 0,05$ ) a membrana do acrossoma e TurboFect mostrou o menor potencial de membrana mitocondrial de todos os tratamentos. Em conclusão, demonstramos o sucesso da técnica de ligação e incorporação de DNA exógeno pelo espermatozoide. Adicionalmente, mostramos que a transfecção espermática utilizando Lipofectamina permitiu ao espermatozoide capturar o DNA sem comprometer sua viabilidade e motilidade. Entretanto, este método seria mais aconselhável para produzir embriões transgênicos por FIV-SGMT. Apesar da transfecção usando SuperFect e TurboFect aumentarem a quantidade de DNA exógeno presente no espermatozoide, estes compostos afetaram negativamente alguns parâmetros incluindo a motilidade e a integridade acrossomal, o que paradoxalmente poderia ser benéfico para os procedimentos de SMGT via ICSI (Arias et al. *Reprod Fertil Dev.* 26(6):847-54. 2014). Estudos futuros ainda são necessários para confirmar o efeito destes tratamentos na produção de animais/embriões transgênicos por ICSI-SMGT e/ou FIV-SMGT.

O suporte financeiro de FONDECYT 11130724 CONICYT-Chile é reconhecido com gratidão.

**Palavras-chave:** Transfecção, transgênico, SMGT

SBTE 222 Clonagem, transgênese e células-tronco

Número de submissão 1481

#### **Isolamento de vesículas extracelulares a partir do meio condicionado de células tronco mesenquimais de tecido adiposo bovino**

Carla Martins de Queiroz; Tatiana Lih Ikeda; Leandro Maia; Carolina Nogueira de Moraes; Fernanda Cruz Landim; João C.P. Ferreira

*UNESP, Botucatu, SP, Brasil.*

Vesículas Extracelulares (VEs) possuem potencial terapêutico pois participam de processos como comunicação intercelular, imunomodulação, proliferação e diferenciação celular (De Jong et al., *Front Immunol.* 608: 1-13, 2014). Uma etapa fundamental para caracterizar VEs é a determinação de seu tamanho e morfologia por microscopia eletrônica (Lässer et al., *J Vis Exp.* 59: e3037, 2012). Os exossomos (exos) e as microvesículas são os principais representantes das VEs. Exos são nanovesículas com 40 a 150nm de tamanho e as microvesículas possuem entre 50-1000nm (De Jong et al., 2014). Desta forma, o objetivo deste estudo foi testar e padronizar a técnica de isolamento de VEs a partir do meio condicionado de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo bovino (CTM-TAb) mediante análise por microscopia eletrônica de transmissão. Para isso, foi colhido tecido adiposo visceral adjacente de peça uterina de abatedouro ( $n=3$ ). Um pool referente às 3 réplicas biológicas foi submetido a digestão enzimática (solução de colagenase 4 mg/mL) e a porção vascular estromal cultivada em meio de manutenção composto por DMEM baixa glicose/F12 (1:1), 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de penicilina, 1% anfotericina B a 37,5°C em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub>. As CTM-TAb já foram previamente caracterizadas em nosso laboratório utilizando o mesmo protocolo de isolamento e cultivo. Em primeira (P1) e segunda (P2) passagem iniciou-se o protocolo para obtenção das VEs (Pascucci et al., *Vet J.* 202: 361–366, 2014). Inicialmente trocou-se o meio de manutenção por meio livre de SFB durante 24 horas. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 2000g por 20 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi filtrado em filtro 0,22µm e então submetido a uma primeira ultracentrifugação a 100000g por 60 minutos a 4°C. O pellet foi então ressuspensionado e lavado em PBS, e seguiu-se nova ultracentrifugação com as mesmas especificações. O pellet final foi ressuspensionado em 1mL de PBS e armazenado a -80°C. Para microscopia eletrônica, uma grade de níquel revestida em Formvar foi posicionada sobre 20µL da suspensão em PBS durante 60 minutos. As grades foram lavadas sequencialmente em 3 gotas (30 µL) de PBS. Então, a amostra foi fixada em Paraformaldeído 2% por 10 minutos lavando em seguida a grade. Posteriormente a amostra foi incubada em acetato de uranila 2% e em metil celulose 0,13% mais acetato de uranila 0,4% e colocada para secagem. Na análise ultraestrutural por microscopia eletrônica observou-se majoritariamente em ambas amostras provenientes de P1

e P2 inúmeras estruturas vesiculares de 50 a 150 nm de diâmetro. Estes achados indicam a presença de vesículas extracelulares no meio condicionado das CTM-TAB em ambas as passagens estudadas. Desta forma, concluímos que a técnica empregada foi eficaz para obtenção de vesículas extracelulares provenientes de CTM-TAB, abrindo novas possibilidades para obtenção, pesquisa e aplicação terapêutica futura.

**Palavras-chave:** Exossomos; microvesículas; microscopia eletrônica de transmissão

SBTE 223 Clonagem, transgênese e células-tronco

Número de submissão 1490

**Análise proteômica do secretoma de células endometriais progenitoras de bovinos desafiadas ou não com lipopolissacarídeo bacteriano**

Carolina Nogueira de Moraes<sup>1</sup>; Leandro Maia<sup>1</sup>; Aspinas Chapwanya<sup>2</sup>; Fernanda Cruz **Landim Alvarenga**<sup>1</sup>; Eliandre Oliveira<sup>3</sup>; Eunice Oba<sup>1</sup>

1.FMVZ, Botucatu, SP, Brasil; 2.Ross University School of Veterinary Medicine, Basseterre, Sao Cristovao; 3.Proteomics Plataform.Parc. Científic Barcelona, Barcelona, Espanha.

O meio condicionado (MC) pelo cultivo de células endometriais contém moléculas bioativas que apresentam papel importante na modulação inflamatória, além de efeito parácrino. A inflamação/infecção uterina gera substanciais perdas econômicas na bovinocultura e a utilização de MC ou da célula mesenquimal tronco/progenitora (CP) já foi comprovada em outras espécies para o controle de diversas afecções, incluindo as do ambiente uterino. O objetivo deste estudo foi classificar acordo com o PANTHER (Protein ANALysis THrough Evolutionary Relationships; <http://pantherdb.org/>), as proteínas encontradas no secretoma de células endometriais mesenquimais tronco/progenitoras de bovinos (bCEPs) desafiadas ou não com o lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano. bCEPs foram isoladas (Fortier J Reprod Fert 83:239-248,1988 modificado), caracterizadas, cultivadas em 3a passagem em placas de 24 wells (1000 células/cm<sup>2</sup>) até confluência, quando então foram privadas do meio com soro fetal bovino e submetidas (grupo tratado-GT) ou não (grupo controle-GC) ao desafio com 1µg/mL LPS (E. coli, sorotipo 0111: B4, Sigma). Após 12 horas, os MCs das 3 réplicas biológicas de diferentes animais foram coletados (GT vs GC) e um pool do GC e do GT foi submetido a redução, alquilação, digestão com tripsina e análise por espectrometria de massas acoplado a cromatografia líquida (nanoLC/MS/MS). A análise de dados foi feita com Proteome Discoverer contra a base de dados Swiss-Prot Mammalia/TREMBL *Bos taurus*. 396 e 300 grupos de proteínas foram identificados, respectivamente nas amostras do GT e GC. Destes, 155 proteínas eram exclusivas do GT. A classificação das proteínas foi feita pelo PANTHER de acordo com os processos biológicos (PB), função molecular (FM), componente celular (CC) e classe de proteínas (CP). Em geral, nós verificamos um enriquecimento positivo (EP) para PB na função ativação de macrófagos (GO:0042116;FE=7.87) e endocitose mediada por receptor (GO:0006898;FE=5,23) no GT. Em relação a FM, foi observado EP para atividade hidrolase (GO:0016787;FE=1.87) e inibitória de enzima (GO:0004857;FE=5,15) no GT, e atividade de molécula estrutural (GO:0005198;FE=2,73) no GC. Para CP foram verificados enriquecimentos em ambos os grupos para matriz extracelular (GO:0031012) e região extracelular (GO:0005576), além de filamento intermediário do citoesqueleto (GO:0045111) no GC. Interessantemente, com relação a CP nós evidenciamos EP em proteínas de resposta antibacteriana (PC00051;FE=5,87) no GT. Nossos resultados, baseados sobretudo no EP para ativação de macrófagos, permitiu inferir de que nosso modelo de estimulação *in vitro* com LPS bacteriano das bCEPs é efetivo para estudar a resposta imunoinflamatória. Provavelmente as bCEPs secretam proteínas de resposta antibacteriana, como mecanismo de defesa, o que é uma característica bastante interessante para o uso na terapia celular.

Agradecimento: FAPESP (14/20447-2;15/18964-1), ProteoRed-ISCIII.

**Palavras-chave:** Endométrio; secretoma; bovino

SBTE 224 Clonagem, transgênese e células-tronco

Número de submissão 1491

**Análise proteômica das células-tronco mesenquimais do cordão umbilical equino: uma abordagem global e funcional**

Leandro Maia<sup>1</sup>; Carolina Nogueira de Moraes<sup>1</sup>; Marianne Camargos Dias<sup>1</sup>; Julia Bauzá Martinez<sup>2</sup>; Antonia Odena Caballol<sup>2</sup>; Fernanda Cruz Landim<sup>1</sup>; Eliandre de Oliveira<sup>2</sup>

1.FMVZ-UNESP Botucatu, Botucatu, SP, Brasil; 2.Proteomics Plataform. Parc Científic de Barcelona, Barcelona, Espanha.

Em Medicina equina, estudos envolvendo análise proteômica são ainda escassos, sobretudo envolvendo células-tronco (CT). Para o nosso conhecimento esse é o primeiro estudo descrevendo o proteoma das células-tronco mesenquimais provenientes da matriz intervacular do cordão umbilical (CTMs-MICU) equino de uma forma global e funcional. O objetivo deste trabalho foi analisar o proteoma das CTMs-MICU previamente caracterizadas para determinar a abundância e classificar as proteínas identificadas de acordo com GO (Gene Ontology,<http://geneontology.org>). Três réplicas biológicas de lisados das CTMs-MICU (N=3 animais) foram digeridos enzimaticamente e analisados por espectrometria de massas (nanoLC-MS/MS) usando estratégia shotgun. As amostras foram analisadas em três réplicas

técnicas. A pesquisa de dados foi conduzida contra a base de dados Uniprot Equus. 2118 grupos de proteína foram identificados com pelo menos dois peptídeos por proteína (FDR<1%). A classificação das proteínas foi feita de acordo com o processo biológico, função molecular e componente celular utilizando o sistema de classificação PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships, <http://pantherdb.org>). A análise Panther evidenciou um enriquecimento positivo em 42 processos biológicos, 23 funções moleculares e 18 componentes celulares. Abundância das proteínas foi estimada por cálculo do emPAI ( $10^{\text{PAI}-1}$ ), em que o PAI (Protein Abundance Index) é o número de peptídeos identificados dividido pelo número de peptídeos observáveis por proteína. Para o cálculo do conteúdo da proteína em mol% foi utilizada a equação  $\text{emPAI}/\Sigma(\text{emPAI}) \times 100$  (Ishihama et al. Mol Cell Proteomics. 4(9):1265-72, 2005). As duas proteínas mais abundantes no proteoma das CTMs-MICU são as proteínas do citoesqueleto actina (4,68 mol%) e vimentina (3,58 mol%) que tem um importante papel na estabilidade e motilidade celular. Adicionalmente, nós identificamos 14 antígenos de superfície celular. Três deles, o CD44, CD90 e CD105 já foram validados por citometria de fluxo. No presente estudo também evidenciamos importantes informações acerca das propriedades biológicas das CTMs-MICU que reforçam seu uso para terapia celular. Tais informações estão relacionadas ao seu excelente potencial de diferenciação, a baixa imunogenicidade (baixa expressão de MHC-II) e estabilidade cromossômica, adicionados aos achados de proteômica que permitem inferir sobre uma importante capacidade de migração e atividades relacionadas aos processos metabólicos primários, síntese de proteínas, empacotamento de vesículas, transporte mediado por vesículas e atividade antioxidante. Adicionalmente, a identificação de diferentes marcadores de superfície poderão contribuir para o estabelecimento de um painel imunofenotípico mais sustentável para caracterização das CTMs provenientes de anexos fetais equino.

Agradecimentos: FAPESP (Proc: 12/23888-4; Proc: 15/17619-9), PROPe-UNESP, ProteoRed-ISCI e Parc Científic de Barcelona

**Palavras-chave:** Proteômica; célula tronco; equino

SBTE 225 Clonagem, transgênese e células-tronco

Número de submissão 1498

#### **Embriões de ovinos geneticamente modificado em IVF e SMT**

Patricio Diaz Pumará<sup>1</sup>; Julia Aguerre Cano<sup>2</sup>; Monica Hebe Vazquez-Levin<sup>3</sup>

1.Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción, Escuela de Veterinaria - Universidad del Salvador, Av. Champagnat 1599, 1630, Pilar, BA, Argentina; 2.Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción, Escuela de Veterinaria Universidad del Salvador, Av. Champagnat 1599, 1630, Pilar, BA, Argentina; 3.Laboratorio de Interacción Celular en Modelos de Reproducción y Cancer- IBYME-Conicet, V. De Obligado 2490, Buenos Aires, Argentina.

A modificação do genoma de gado da fazenda tem na técnica de transferência de genes mediada por esperma (TGME) uma opção que excede a eficiência de outros métodos, tais como micro-injeção de genes no pró-núcleo masculino, fatores retrovirais, ou núcleos de células-tronco transfectadas. O objetivo do presente trabalho é desenvolver um protocolo que combina as técnicas de fertilização *in vitro* (FIV), e inseminação artificial laparoscópica (IAUL), com a transferência de genes heterólogo através de espermatozoides intactos em ovinos. O primeiro esforço foi voltado para o desenvolvimento da técnica de fertilização *in vitro* em combinação com células espermáticas transfectadas com genes repórter. Ressalte-se que as técnicas de FIV e transfecção de espermatozoides ovinos utilizadas, foram escolhidas com base nos resultados obtidos previamente (Raffaelli, P. Proc. Ann. Meet. SBTE 2011, p.410). Neste ensaio 48 complexos cumulus-oócitos (COCs) foram obtidos por punção folicular a partir ovários oriundos de abatedouros. Os oócitos foram maturados *in vitro* durante 24 horas em TCM199 suplementado com 20% de soro de ovelha inativado pelo calor (HISS) suplementado com antibiótico, mantidos em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> em ar a 38,5°C e saturação de umidade. Duas amostras de sêmen, uma tratada e outra controle foram processadas. A amostra a) (tratada)  $1,2 \times 10^6$  SPZ foi co-incubada com 400 ng plasmídeo incluindo um gene repórter que codifica fluorescência vermelha. A amostra controle, b), concentração semelhante de esperma não foi co-incubada. A capacitação espermática em ambas as amostras foram induzidas por re-suspensão em fluido sintético de oviduto (SOF), 20% de HISS e 10 mg/ml de heparina, a 38,5°C durante 3 h em tubo fechado. A fertilização foi realizada em meio SOF suplementado com 2% HISS. O lote a) recebeu 21 oócitos, mais  $1,2 \times 10^6$  SPZ co-incubados e lote b) 27 oócitos  $1,2 \times 10^6$  SPZ não co-incubados. Após 15h de incubação os oócitos foram removidos e cultivados in TCM199 mais HISS e antibiótico, nas mesmas condições de temperatura e de umidade que aqueles referidas para a maturação. Após 120h, embriões obtidos foram classificados e registrados por micrografia de fluorescência confocal. Da amostra a) foram coletados: 11 blastocistos, 6 oócitos não fertilizados e 4 zonas pelúcidas vazias. Todos os embriões (51,4%) mostraram sinal fluorescente vermelho em todos os blastômeros. No entanto, oócitos não fertilizados e degenerados (48,6%) não mostraram sinais de fluorescência. Na amostra controle b), a presença de fibrina causou dificuldade de leitura e perda de embriões. Contudo quatro blastocistos e três oócitos não fertilizados podem ser recolhidos, nenhum dos quais (100%) apresentaram sinal de fluorescência. Conclui-se que a transfecção por espermatozoide e a integração do transgen ao embrião mostrou-se eficiente, uma vez que tanto a amostra de controle “b)” e os oócitos não fertilizados (6) da amostra “a)” não mostraram fluorescência, enquanto que todos os oócitos fertilizados (11) da amostra “a)” mostraram intenso sinal fluorescente em todos os blastômeros. Embora os resultados sejam suficientemente eloquentes, estudo estatístico pelo método X<sup>2</sup> foi feito, mostrando diferenças significativas (P<0,05).

**Palavras-chave:** FIV; fertilização *in vitro*; IAUL inseminação artificial laparoscópica; TGME transferência de genes mediada por espermatozoide

SBTE 226 Clonagem, transgênese e células-tronco

Número de submissão 1576

**Análise da sincronização do ciclo celular de fibroblastos provenientes da pele de gato doméstico (*Felis silvestris catus*) e kodkod (*Leopardus guigna*)**

Paula Fernanda Gallegos; Daniel Veraguas; Fidel Ovidio Castro; Lleretny Rodriguez-Alvarez

Department of Animal Science, Faculty Of Veterinary Sciences, University Of Concepcion, Chillan, Chile.

O kodkod é o menor gato silvestre da América do Sul, e sua população está em constante diminuição. A sincronização do ciclo celular de células doadoras desempenha um papel crucial na TNCS. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de dois tratamentos diferentes, privação de soro (PS) e inibição de contacto (IC), na indução da quiescência celular em fibroblastos de pele oriunda de gato doméstico e kodkod. Todos os experimentos foram realizados com fibroblastos nas passagens 5 a 6. A PS foi obtida pela substituição do meio de cultura com 10% de SFB por um meio com 0,5% de SFB. A IC foi realizada permitindo que as células atingissem uma confluência de 100%. Ambos os tratamentos foram avaliados nos dias 1, 3 e 5, e células em crescimento (60-80% de confluência; CC) foram utilizadas como controle. Foram realizadas três réplicas de cada tratamento. Para a análise do ciclo celular, as células fixadas foram incubadas com 50 µg/ml de iodo de propídio e 100 µg/ml de RNase durante 30 min a 37°C. A citometria de fluxo foi realizada pelo equipamento Attune® NxT Acoustic Focusing Cytometer (Thermo Fisher Scientific). Pelo menos 10.000 eventos foram registados utilizando o canal BL2-A (filtro 574/26 nm). Os resultados foram analisados usando o Attune® NxT SW v1.1 software. A Apoptose foi avaliada por análise da expressão do gene de BAX e BCL2 por RT-qPCR, SDHA foi utilizado como controle interno. Os resultados da Citometria de fluxo foram analisados por ANOVA, utilizando o procedimento GLM do software SAS, e a comparação de médias pelo teste de Tukey. Os resultados de RT-qPCR foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis utilizando o software Infostat. Em todos os experimentos, as diferenças foram consideradas a  $P < 0,05$ . A análise de citometria de fluxo revelou que em fibroblastos de gato doméstico, ambos tratamentos PS e IC aos 3 e 5 dias aumentaram a porcentagem de células em G0/G1 e diminuiu a fração de células em S e G2/M comparado com CC ( $P < 0,05$ ). Por outro lado, PS por 3 e 5 dias e IC por 1 e 3 dias aumentaram a porcentagem de células em G0/G1 em fibroblastos de kodkod ( $P < 0,05$ ), mas somente a PS durante 5 dias reduziu a porcentagem de células na fase G2/M comparado com CC ( $P < 0,05$ ). Com relação à análise da expressão gênica, em fibroblastos de gato doméstico, não foram encontradas diferenças na razão BAX/BCL2 entre PS e IC (nos dias 1, 3 e 5) comparado com CC. Em células de kodkod a razão BAX/BCL2 foi maior em IC aos 3 e 5 dias de tratamento do que em PS aos 3 e 5 dias ( $P < 0,05$ ). Em IC a expressão relativa da BCL2 não é suficiente para reduzir os níveis de BAX após 3 dias, indicando uma alta incidência de apoptose. Em conclusão, os fibroblastos de gato doméstico e kodkod respondem de forma diferente aos métodos de sincronização celular. Pode-se sugerir a PS durante 3 ou 5 dias para a sincronização do ciclo celular de fibroblastos de kodkod. Estes resultados são importantes para a produção de embriões kodkod por TNCS.

**Palavras-chave:** Sincronização do ciclo celular; gato doméstico; felinos silvestres

SBTE 227 Clonagem, transgênese e células-tronco

Número de submissão 1583

**Caracterização de células-tronco derivadas do endométrio bovino durante a fase folicular do ciclo estral**

Evelyn Elia Lara; Nathaly Stephanie Rivera; Fidel Ovidio Castro

Universidad de Concepción, Chillán, Chile.

O objetivo deste estudo foi identificar e caracterizar as células-tronco derivadas do endométrio bovino durante a fase folicular do ciclo estral. As biopsias endometriais foram colhidas de quatro vacas híbridas, ipsilateralmente ao folículo pré-ovulatório, durante a fase folicular (18 dias após a ovulação), em conjunto com a avaliação morfológica dos ovários e dosagem de progesterona e 17 $\beta$ -estradiol séricos por meio de radioimunoensaio. Os cultivos primários foram obtidos através de digestão enzimática com collagenase 1%, expandidos e congelados para a realização dos ensaios com as amostras em terceira passagem (P3). O RNA e proteína total foram isolados e avaliados para marcadores embrionários (OCT4, NANOG, SOX2) e de células-tronco mesenquimais (CD44 e CD117) através de RT-qPCR ou ensaios proteicos (Oct4, Sox2, cd44) como imuno-histoquímica em tecidos fixados e/ou western blot (WB) em tecidos e células. As células dos cultivos primários foram isoladas e caracterizadas de acordo com morfologia e diferenciação *in vitro* para as linhagens condrogênica, osteogênica e adipogênica aos 7 e 14 dias de indução. O potencial de diferenciação foi avaliado mediante coloração de alcian blue, alizarin red e oil red O, respectivamente. Aliquotas em primeira passagem (P1) foram semeadas em baixa densidade (30 células/cm<sup>2</sup>) e cultivadas durante 30 dias, quando as colônias foram então coradas com Giemsa e quantificadas. A eficiência clonogênica foi calculada como (n° de clones/n° de células semeadas) x 100. A análise estatística, das provas de PCR quantitativo e de tempo real, realizou-se através da prova não-paramétrica de Wilcoxon pelo software Infostat 3.0 (Infostat, Buenos Aires, Argentina). Os marcadores de células-tronco embrionárias OCT4 e SOX2, exceto NANOG foram detectadas em tecidos e células através de RT-qPCR e determinação proteica. A proteína Oct4 não foi

encontrada por WB em células descongeladas, entretanto foi localizada mediante imuno-histoquímica nos tecidos fixados, em nível perinuclear e membrana no estroma e tecido glandular. Um padrão similar foi encontrado para a proteína Sox2 nas amostras de tecidos. Por sua parte, SOX2 foi observado no estroma, fibroblastos, glândulas e células periglandulares em nível nuclear e perinuclear. Os marcadores mesenquimais CD44 e CD 117 foram detectados por qPCR nos tecidos e células, porém a proteína foi encontrada apenas no tecido (WB). Os cultivos primários foram capazes de aderir-se ao plástico, apresentaram morfologia similar a fibroblastos e se diferenciaram *in vitro* nas linhagem condrogênica e osteogênica, porém não na linhagem adipogênica, o que foi descartado através de coloração e RT-qPCR. As unidades formadoras de colônias foram observadas para a linhagem celular avaliada, com uma média de 5,3 colônias em 3 réplicas (eficiência de clonogenicidade: 0,63%) e um tempo de duplicação de 30 horas. Nossos resultados indicam que o endométrio bovino possui células-tronco/progenitoras indiferenciadas com capacidade de auto-renovação, formação de colônias, expressão de proteínas e genes específicos de células tronco e diferenciação em pelo menos duas linhagens mesodermas. Estes resultados estão de acordo com nossos resultados previamente encontrados no estudo do tecido endometrial bovino durante as fases lúteas (inicial e tardia) do ciclo estral.

Este estudo foi financiado através da Bolsa Conicyt de doutorado nacional n°21150425 pelo Governo do Chile.

**Palavras-chave:** Células-tronco; endométrio; bovino

SBTE 228 Clonagem, transgênese e células-tronco

Número de submissão 1599

**Transfecção gênica de células primárias de fibroblastos bovinos utilizando nanotubos de carbono multicamadas carboxilados**

Michele Munk Pereira<sup>1</sup>; Humberto de Mello Brandão<sup>2</sup>; Rafaella de Souza Salomão Zanette<sup>1</sup>; Carolina Capobiango Romano Quintão<sup>2</sup>; Eliza Diniz de Souza<sup>3</sup>; Leonara Beatriz Fayer Almeida<sup>1</sup>; Luiz Orlando Ladeira<sup>4</sup>; Luiz Sérgio de Almeida Camargo<sup>2</sup>

1.Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brasil; 2.EMBRAPA Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brasil; 3.Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, Brasil; 4.Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

A inserção de DNA dentro de células de mamíferos é uma importante fase na produção de animais transgênicos. Contudo, células de linhagens primárias são difíceis de serem transfectadas (Gresh et al., 2012. *Methods Mol Biol*, 801:65-74). Recentemente, os nanotubos de carbono têm sido explorados como um novo e eficiente sistema de entrega gênica devido a sua estrutura e propriedades únicas (Cheung et al., 2010. *Adv Drug Deliv Rev*, 62: 633-649). Entretanto, ainda não foi avaliado seu potencial de transfecção de linhagens primárias de células fibroblásticas. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial uso de nanotubos de carbono multicamadas carboxilados (MWCNTs-COOH) como um novo vetor não-viral para transfecção de linhagens primárias de fibroblastos bovinos. MWCNTs-COOH foram complexados ao DNA plasmidial contendo o gene que codifica a proteína verde fluorescente (GFP) para formar o complexo MWCNT-COOH/pDNA. Fibroblastos bovinos coletados de vacas Gir foram congelados a -80°C. As células armazenadas na 2ª passagem foram descongeladas e cultivadas em meio DMEM (1x10<sup>4</sup> células/poço) suplementado com 10% de soro fetal bovino e incubados a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade. Os fibroblastos foram transfectados com complexos MWCNTs-COOH/pDNA (relação 5:1) ou polietilenoimina (PEI) 25KDa (relação 1:1) (Controle). A expressão do gene GFP nas células transfectadas foi examinada por citômetro de fluxo equipado com laser de argônio de 488 nm e filtro de emissão 530/30 nm “bandpass” (detector FL1) (FACScalibur; Becton Dickinson, San Jose, CA) e a detecção do gene pelo ensaio de PCR em tempo real (ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems, Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). A análise estatística foi realizada por ANOVA e as médias comparadas pelo teste Student Newman Keus. A análise por citometria de fluxo demonstrou que não houve diferença de eficiência de transfecção entre MWCNT-COOH e PEI (P>0,05). Foram observados que 3,30% ± 0,36% dos fibroblastos positivos para GFP com MWCNT-COOH e 3,96% ± 1,42% com PEI. Para verificar os resultados obtidos por citometria de fluxo, foi realizada a análise por PCR em tempo real para avaliar a presença do gene GFP nos fibroblastos. A banda do produto do gene GFP também foi detectada por eletroforese, confirmando a presença do transgene nos fibroblastos transfectados. Nossos resultados demonstram que os MWCNTs-COOH podem ser uma alternativa de vetor gênico para a transfecção de linhagens primárias de fibroblastos bovinos.

**Palavras-chave:** Nanotubos de carbono; carreadores gênicos; transgênico

SBTE 229 Clonagem, transgênese e células-tronco

Número de submissão 1651

**Blastocistos bovinos produzidos a partir de genoma de espermatozoides clonado e ovócitos maduros ou pré-ativado**  
Mariana Suvá; Lucia Natalia Moro; Daniel Salamone

Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

Clonagem do genoma do espermatozoide tem um grande potencial na produção de gado. A disponibilidade de várias cópias de um único genoma de espermatozoide permitiria o rastreio genético para características produtivas valiosas. Além disso, vários ovócitos da mesma ou de diferentes doadoras poderiam ser fertilizados com exatamente o mesmo genoma paterno.



Isto é possível pela produção de embriões androgenéticos haplóides (AHe), seguida pela fusão de seus blastômeros com ovócitos, para obter embriões diplóides. Como na clonagem, a fase do ciclo celular do ovócito beneficiário no momento de fusão pode afetar o desenvolvimento do embrião. Aqui, foi avaliado o efeito do estágio nuclear do ovócito no momento da fusão com o blastômero androgenético haplóide sobre o desenvolvimento *in vitro* de embriões de bovino. Para este objetivo, os zigotos foram produzidos por fertilização *in vitro* (FIV) curta e zona a pelúcida foi removida. Para gerar o AHe, os zigotos foram corados com Hoechst-33342 para visualizar DNA e o núcleo materno foi aspirado por micromanipulação. Um grupo de não-enucleados foi utilizado como controle FIV. Todos os embriões foram cultivados individualmente em micropoços cobertos por meio SOF. Após 30-35h de cultura, AHe em estágio de 4 células foram desagregadas e os blastômeros foram fusionados individualmente, quer com oócitos maduros livres de zona pelúcida seguido de ativação (FA grupo), ou com oócitos livres de zona pelúcida pré-ativados (grupo AFA). Para a fusão, um duplo pulso de corrente direta de 65 V, cada pulso de duração de 30  $\mu$ s, separados por 0,1 s foi aplicado. O protocolo de ativação consistiu em 5 $\mu$ M ionomicina durante 4 min, seguido por 50 $\mu$ M de Roscovitina durante 5h (no grupo AFA a fusão foi realizada durante a terceira hora de incubação em Roscovitina). Para o controle de ativação diplóide, o mesmo protocolo de ativação foi realizada em oócitos MII, mas Roscovitine foi suplementada com 5 $\mu$ g / ml citochalasin B para evitar a extrusão do segundo corpo (grupo PA). Além disso, um grupo de AHe foi avaliado para o desenvolvimento do embrião. Grupos FA, AFA e PA foram cultivados como descrito acima. Os dados foram analisados pelo teste de Fisher (p < 0,05). As taxas de clivagem, mórula e blastocisto foram: 82,8, 8,2 e 4,1% para FA (n = 122); 86,4, 1,5 e 1,5% em AFA (n = 66); 86,3, 8,4 e 0,9% para AHe (n = 226); 91,4, 42,3 e 30,1% para a FIV (n = 163); e 86,9, 23,2 e 18,1% para o PA (n = 99). As taxas de clivagem diferiram apenas entre FIV e FA, mas não entre outros grupos. Curiosamente, o desenvolvimento de estágio mórula caiu significativamente em ambas as FA e AFA em relação aos controles. Grupo de desenvolvimento PA foi menor do que no FIV. Blastocistos foram obtidos em FA e AFA, embora em taxas mais baixas do que em PA e FIV. Em conclusão, foi possível produzir blastocistos diplóides por fusão de blastômeros haplóides androgenéticos com ambos os oócitos MII ou oócitos pré-ativados, e o estágio de núcleo do oócito destinatário não afetou significativamente o desenvolvimento do embrião. No entanto, a sincronização das células do doador e do receptor ainda precisa ser explorada, e a sua capacidade para desenvolver *in vivo* após a transferência do embrião será avaliada. Estes resultados asseguraram perspectivas promissoras na clonagem do genoma do espermatozoide.

**Palavras-chave:** Clonagem do genoma do espermatozoide; hemiclones diplóides; bovino

SBTE 230 Clonagem, transgênese e células-tronco

Número de submissão 1663

#### **Comparação ultra-estrutural da diferenciação adipogênica induzida de células tronco mesenquimais de tecido adiposo e medula óssea equina**

Elaine Cristina Galhardo<sup>1</sup>; Bruna de Vita<sup>2</sup>; Danielle Jaqueta Barberini<sup>2</sup>; Elena Carolina Serrano Recalde<sup>2</sup>; Caroline Medeiros Geraldini<sup>2</sup>; Marina Landim e Alvarenga<sup>2</sup>; Carolina Nogueira de Moraes<sup>2</sup>; Leandro Maia<sup>2</sup>; Fernanda Cruz Landim<sup>2</sup>

1.Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP, Botucatu, SP, Brasil; 2.Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

As células tronco mesenquimais (CTMs) têm promovido avanços na terapia celular em Medicina Veterinária e nas pesquisas em Biologia Celular. O tecido adiposo (TA) e medula óssea (MO) são as fontes mais conhecidas de CTMs. Este estudo objetivou comparar a ultraestrutura de CTMs derivadas de TA e MO de equinos cultivadas e diferenciadas *in vitro* na linhagem adipogênica. Aproximadamente dois gramas de TA foram coletados da base da cauda de um equino, e cerca de 16 mL de MO foram coletados com agulha de mielograma na altura da quinta estérnebra, seguindo protocolo nº 758 aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto de Biociências da Unesp. O isolamento das CTMs do TA foi realizado por digestão enzimática com collagenase, e as CTMs da MO foram isoladas por gradiente de densidade em ficoll. O cultivo foi realizado em meio contendo DMEM alta glicose, penicilina/streptomicina e anfotericina, e suplementado com 10% de SFB até a segunda passagem, quando iniciou-se o ensaio de diferenciação adipogênica induzido por meio específico (StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit - Gibco CA, USA) com duração de 18 dias. A diferenciação adipogênica foi confirmada por coloração com Oil Red, que evidenciou abundância de gotículas de lipídeo nas CTMs-TA e em menor quantidade nas CTMs-MO. A análise ultraestrutural demonstrou semelhança na morfologia de CTMs obtidas da MO e TA. Ambas apresentaram superfície recoberta por protruções e prolongamentos, indicando alta atividade celular, com absorção e liberação de grande quantidade de material. O núcleo apareceu localizado centralmente, com aspecto irregular e cromatina descondensada. No citoplasma foi observado grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso, o qual em alguns pontos apresentou cisternas dilatadas e com grande quantidade de material amorfo em seu interior. Grande quantidade de vesículas e fagossomos de tamanhos distintos também foram observadas, especialmente nas CTMs-MO. As mitocôndrias apresentaram maior eletrondensidade, com cristas evidentes e aspecto tubular em ambas as amostras, e aspecto alongado destacado nas CTMs-TA. Vesículas de lipídeo foram observadas nas CTMs-TA e praticamente inexistentes nas CTMs-MO. Conclui-se que a diferenciação adipogênica das CTMs-TA apresentou características semelhantes aos pré-adipócitos de forma mais evidente do que nas CTMs-MO.

**Palavras-chave:** Diferenciação celular; adipogênese; morfologia celular

SBTE 231 Clonagem, transgênese e células-tronco

Número de submissão 1690

**Avaliação da qualidade de oócitos caprinos e seus efeitos sobre a eficiência da clonagem após maturação *in vivo* ou *in vitro***

Luis Henrique de Aguiar<sup>1</sup>; Carlos Enrique Mendez Calderón<sup>2</sup>; Saul Gaudencio Neto<sup>1</sup>; Rafael Rossetto<sup>1</sup>; Leonardo Tondello Martins<sup>1</sup>; Kaio César Simiano Tavares<sup>1</sup>; Felipe Ledur Ongaratto<sup>2</sup>; Cicera Regina Lazzarotto<sup>1</sup>; Luciana Relly Bertolini<sup>3</sup>; Marcelo Bertolini<sup>2</sup>

1.Universidade de Fortaleza, Fortaleza, CE, Brasil; 2.Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil; 3.Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

A qualidade do oócito desempenha um papel fundamental na reprogramação nuclear após a clonagem (TNCS), com a fonte de oócitos tendo um efeito significativo sobre o resultado final. Embora a utilização de oócitos maturados *in vivo* para clonagem parecer ser mais eficiente, apesar da variação na maturação, a utilização de oócitos maturados *in vitro* fornece citoplastos mais homogêneos e síncronos para a clonagem. O refinamento dos critérios de avaliação de qualidade oocitária pode melhorar a sobrevivência *in vitro* e *in vivo* após a clonagem. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da qualidade morfológica do ooplasma, configuração da cromatina e proximidade entre metáfase II (MII) e corpúsculo polar (CP) entre oócitos maturados *in vitro* e *in vivo* sobre a sobrevivência *in vitro* e a taxa de prenhez após a clonagem por TNCS em caprinos, seguindo os nossos procedimentos já estabelecidos (Martins et al., 2016, Cellular Reprogramming, in press). Oócitos maturados *in vivo* ou imaturos foram obtidos a partir de 65 e 94 fêmeas estimuladas com FSH por aspiração de folículos pré-ovulatórios de ovários de matadouro (*in vivo*) ou por laparoscopia (*in vitro*), respectivamente. Oócitos imaturos foram maturados *in vitro* durante 22 h. Após a seleção de CP, oócitos em MII dos dois grupos de maturação foram classificados individualmente durante a enucleação em relação à qualidade do ooplasma (bom, regular ou ruim), configuração da cromatina (normal ou anormal), e proximidade entre CP e MII (longe ou perto). Após a reconstrução com fibroblastos transgênicos caprinos, ativação do embrião (dia = 0) e cultivo *in vitro* por 12-h; os embriões clonados de ambos os grupos de maturação foram cirurgicamente transferidos para o oviduto de receptoras síncronas (13 embriões/receptora). O diagnóstico de gestação foi realizado por ultrassonografia no dia 23. Os dados sobre maturação, qualidade de ooplasma, configuração da cromatina, proximidade entre corpúsculo polar/MI, taxas de sobrevivência pós-reconstrução e de prenhez foram comparados por ANOVA ou qui-quadrado ( $p < 0,05$ ). Depois de 10 (*in vivo*) e 15 (*in vitro*) repetições, a maturação foi maior no grupo *in vitro* (996/1682, 59,2%) do que no *in vivo* (580/1526, 35,7%), sem diferenças observadas entre grupos para o número médio de oócitos em MII por cabra (10,6 vs. 8,9), para oócitos avaliados como bons ( $23,7 \pm 2,8$  vs  $14,8 \pm 2,8\%$ ), regulares ( $38,1 \pm 2,4$  vs  $37,0 \pm 2,4\%$ ) ou ruins ( $38,2 \pm 4,1$  vs  $48,2 \pm 4,1\%$ ), para anomalias de cromatina (98/858, 11,4% vs. 53/562, 8,9%), ou para a sobrevivência *in vitro* pós reconstrução (243/562, 90,4% vs. 797/858, 92,9%). Embora a taxa de PB perto da MII ser maior no grupo *in vivo* (243/501, 47,2%) do que *in vitro* (92/724, 12,8%) as taxas de prenhez foram maiores no grupo *in vitro* (14/41, 34,1%, para 539 embriões transferidos) do que o grupo *in vivo* (4/29, 13,7%, para 379 embriões transferidos). Nas nossas condições, a maior eficiência de clonagem em caprinos foi obtida utilizando oócitos maturados *in vitro*.

**Palavras-chave:** Clonagem; maturação; caprinos

SBTE 232 Biotecnologias de suporte: criopreservação, criobiologia, biologia molecular e “ômicas”

Número de submissão 1470

**Sobrevivência de embriões bovinos de 7 dias produzidos *in vitro* expostos a 0,5 M de sacarose antes de congelamento lento**

Maria Eduarda Bicca Dode<sup>1</sup>; Chelsie B. Steinhauser<sup>2</sup>; Jane H. Pryor<sup>2</sup>; Tiago Veiras Collares<sup>1</sup>; João Carlos Deschamps<sup>1</sup>; Charles R Looney<sup>2</sup>; David Forrest<sup>3</sup>

1.UFPEL, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Laboratório de Embriologia Molecular e Transgênese, Pelotas, RS, Brasil; 2.Ovagenix, Bryan, Estados Unidos; 3.Texas A&M University, Dept. of Animal Science, College Station, Estados Unidos.

A exposição de embriões bovinos a sacarose, tem como função reduzir água dentro das estruturas celulares, atenuando a formação de cristais de gelo que podem ser prejudiciais durante a criopreservação. Este estudo avaliou a capacidade de sobrevivência e a viabilidade pós-descongelamento de embriões bovinos produzidos *in vitro*, expostos a 0,5 M solução de sacarose antes do congelamento lento. Três réplicas de oócitos coletados de abatedouros ( $n = 856$ ) foram maturados em trânsito (DeSoto Biosciences Inc., Seymour, EUA), fertilizados *in vitro* (FIV) e cultivados *in vitro* (CIV) como descrito por Pryor (Reprod. Fert. E dev. 28, 172, 2015). No Dia 7 pós-FIV, foi verificada taxas de blastocisto/clivados ( $n = 488/241$ ), os embriões foram classificados de acordo com os padrões IETS [mórula compacta (MC), blastocisto inicial (BI), blastocisto (BL), BL expandido (-BLEx)] e divididos aleatoriamente em 3 tratamentos: 2 min 0,5M de exposição a sacarose - sem congelamento (S); nenhuma exposição a sacarose - congelamento em solução Vigro de congelamento etilenoglicol com sacarose (EG; Vetoquinol, Pullman, WA, EUA); e 2 min 0,5M exposição à sacarose anterior ao congelamento -

congelamento conforme tratamento anterior (SEG). Os embriões foram mantidos em crioprotetor antes do congelamento por 5-7 min em palhetas de 0,25 ml, reduzindo 0,5°C/min, e a partir de -6°C a -32°C submersos em nitrogênio líquido. Os embriões congelados foram descongelados em contato com o ar (20-25°C) durante 5 segundos e imersos em água a 30°C durante 10 s, então foram lavados em meio Vigro Holding (Vetoquinol) (37°C) durante 15 min antes de serem colocadas em meio de cultura por mais 48 h (dia 9 pós-FIV). Embriões que avançaram um estágio foram considerados sobreviventes. No Dia 9 embriões foram fixadas em metanol frio, lavados em PBS / 0,1% de Tween 20, colocados em 10 µg mL-1 Hoechst 33342 / glicerol e visualizados sob luz UV para contagem de células. Os dados foram analisados usando o teste de qui quadrado comparando os grupos de tratamento globais e por estágio com  $p < 0,05$  como significativo. Não houve diferença significativa na contagem de sobrevivência e células vivas, em 48 h entre S (72,8%; 119), EG (63,3%; 107), e SEG (51,9%; 123) para as fases combinadas, respectivamente. Curiosamente, a capacidade de sobrevivência para a EB e ExBL foram significativamente maiores em S (85,7; 70,0%) quando comparado com EG (66,7; 55,6%) e SEG (58,6; 25,0%), sem diferença para BL (81,3, 62,5, 68,8%), respectivamente. Estranhamente, CM embriões tiveram uma taxa mais baixa para S em comparação com EG e SEG (47,0, 56,3 e 70,6%, respectivamente), mas devido ao baixo número em todos os tratamentos, a estatística não pôde ser verificada. Os resultados indicam que uma exposição de 2 minutos em solução 0,5 M de sacarose antes de congelamento lento em etileno-glicol, pode não ser benéfico para a sobrevivência dos embriões, e, de fato, pode mesmo ser prejudicial para embriões na fase de EB e ExBL.

**Palavras-chave:** Criopreservação; transferência direta; etilenoglicol

SBTE 233 Biotecnologias de suporte: criopreservação, criobiologia, biologia molecular e “ômicas”

Número de submissão 1484

#### **Uso de forskolin no cultivo *in vitro* de embriões bovinos submetidos à vitrificação**

Daniela Moraes Pereira<sup>1</sup>; Mariane Gabriela Cesar Ribeiro Ferreira<sup>1</sup>; Mirela Brochado Souza<sup>2</sup>; Wilian Aparecido Leite da Silva<sup>1</sup>; Christopher Junior Tavares Cardoso<sup>3</sup>; Henrique Kischel<sup>1</sup>; Elielton Dias da Silva Arruda<sup>1</sup>; Ana Caroline Bini de Lima<sup>1</sup>; Fabiana de Andrade Melo Sterza<sup>1</sup>

1.Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, Aquidauana, MS, Brasil; 2.Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil; 3.Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil.

Os embriões produzidos *in vitro* apresentam maior quantidade de gotas lipídicas em seu citoplasma, fato que tem sido relacionado a sua menor criotolerância. O forskolin é um ativador da adenilato ciclase, que ativa a lipase endógena por meio da cAMP e da proteína quinase, causando lise dos triglicerídeos intracelulares e consequentemente a formação do glicerol. Nesse sentido, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos do forskolin (Sigma-Aldrich®, Corporation, St. Louis, MO), adicionado ao meio de cultivo embrionário sobre a criotolerância de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Para tanto, ovários bovinos foram coletados em abatedouro local e transportados até o laboratório em solução salina 0,9% à 37 °C, acrescida de antibiótico. Os folículos foram aspirados e os COCs rastreados e classificados. Em seguida, 1007 Complexos Cumulus Oócitos (COCs) foram maturados *in vitro* por 24 horas. A fertilização *in vitro* (FIV) foi realizada com sêmen da raça Nelore de fertilidade comprovada, previamente preparado em gradiente Percoll®. O período de incubação da FIV foi de 18-22 horas. O cultivo *in vitro* foi realizado em meio SOF por 9 dias. No D5, os embriões foram divididos em dois grupos, sendo: Grupo Controle (GC, grupo cultivado na ausência de forskolin) e Grupo Forskolin (GF, grupo cultivado com 20 µM de forskolin por 24 horas a partir do D5). Todas as etapas da PIVE foram feitas em incubadora a 38,5° C, 5% de CO2 e máxima umidade. No D7, blastocistos de grau I foram vitrificados de acordo com o protocolo de Kuwayama et al. (2005). O aquecimento foi realizado 1 mês depois e os embriões adicionalmente cultivados por 3 e 24 horas. As variáveis avaliadas foram: taxa de blastocisto em D7, taxa de embriões vitrificáveis em D7 (grau 1) e a taxa de reexpansão em 3 e 24 horas após o aquecimento. Os dados foram submetidos a análise de variância Anova (Programa R), considerando o nível de significância de 5%. A taxa de blastocisto em D7 não foi diferente ( $P > 0,05$ ) entre os grupos (GF 22,71% x GC 25,41%), porém, a taxa de embriões vitrificáveis em D7 foi maior no grupo Forskolin (43,24% x 25%;  $P < 0,05$ ). A taxa de reexpansão após 3 horas de cultivo pós aquecimento foi maior no grupo Forskolin (45% x 24%;  $P < 0,05$ ), porém após 24 horas de cultivo esse efeito deixou de ser observado (GF 55% X GC 56%). Diante disso, sugere-se que a adição de 20 µM de forskolin ao meio de cultivo de embriões bovinos melhora a qualidade e a criotolerância dos blastocistos, diminuindo o tempo de reexpansão após o aquecimento.

**Palavras-chave:** Criopreservação; fertilização *in vitro*; lipólise química

SBTE 234 Biotecnologias de suporte: criopreservação, criobiologia, biologia molecular e “ômicas”

Número de submissão 1520

#### **Desenvolvimento, número de células totais e apoptose em embriões bovinos submetidos à biópsia manual no sétimo dia após a fecundação *in vitro***

Carolina Capobianco Romano Quintão; Clara Slade Oliveira; Célio Freitas; Eliza Diniz de Souza; Jessica Fernanda Souza; Bruna Rios Coelho Alves; Luiz Sérgio de Almeida Camargo

Embrapa Gado de Leite, Juiz De Fora, MG, Brasil.

Na espécie bovina, a técnica de biópsia embrionária (associada à produção *in vitro* de embriões) é útil para a genotipagem, bem como para o estudo de alterações cromossômicas associadas à sobrevivência do conceito. Em um trabalho anterior (Quintão, C.C.R. et al., Anim. Reprod. 2015), observamos que a biópsia manual realizada no sexto dia (D6) pós FIV não afeta a viabilidade embrionária no D8 (quando embriões foram analisados quanto à viabilidade), porém ainda não há estudos sobre o efeito da biópsia em blastocistos no D7. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da biópsia manual, realizada no D7 pós FIV, no desenvolvimento e na viabilidade de embriões bovinos. Oócitos obtidos de ovários de abatedouro foram maturados e fecundados *in vitro*. No final da FIV, os possíveis zigotos foram desnudados e cultivados em meio CR2aa suplementado com 2,5% SFB a 38,5°C com 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub> e umidade saturada. No D7 os blastocistos foram distribuídos, aleatoriamente, em dois grupos: CON (controle, n=79) e BIO (biópsia, n=78), sendo os embriões BIO seccionados manualmente com microlâminas (Bioniche, Canadá) em gotas de 20 microlitros de meio TALP-HEPES com 2% SFB sob microscópio estereoscópio. Os blastocistos dos dois grupos foram então transferidos para gotas individuais de 20 microlitros de meio CR2aa, e cultivados por 24h (D8) sob as mesmas condições de cultivo supracitadas. No D8 foram avaliadas a expansão da blastocela e a qualidade (IETS, 1998) embrionária. Blastocistos dos grupos CON (n=18) e BIO (n=20) foram, aleatoriamente selecionados e fixados para contagem do número total de células (TOT) e número de células apoptóticas (APO) através da técnica de TUNEL (Promega, EUA). O índice apoptótico foi calculado por APO/TOT. O desenvolvimento embrionário foi analisado pelo teste Qui-quadrado. Os valores de TOT, APO e índices apoptóticos (indicados como média  $\pm$  EPM) foram submetidas à ANOVA e as médias comparadas pelo teste SNK. Quanto ao desenvolvimento, a taxa de blastocistos com blastocela expandida no D8 foi menor ( $P<0,01$ ) no grupo BIO (67,9%) em relação ao CON (89,8%), porém não foi evidenciada ( $P>0,05$ ) diferença na qualidade embrionária, de modo que a proporção de embriões de qualidade 1 e 2 foi de 66,2% (CON) e 56,6% (BIO) e de qualidade 3 foi de 33,8% (CON) e 43,4% (BIO). Foram observadas diferenças ( $P<0,05$ ) no número de células totais ( $149,9 \pm 6,2$  vs  $112,8 \pm 5,9$ ), apoptóticas ( $9,6 \pm 1,9$  vs  $16,7 \pm 1,8$ ) e no índice apoptótico ( $6\% \pm 1$  vs  $14\% \pm 1$ ), entre CON e BIO, respectivamente. Conclui-se que a biópsia manual em embriões no D7 interfere no desenvolvimento nas 24h seguintes pós-biópsia, pois apesar de não afetar a qualidade morfológica dos embriões, reduz o número total de células e aumenta o índice apoptótico.

Apoio financeiro: CNPQ, FAPEMIG e EMBRAPA.

**Palavras-chave:** Biópsia; embriões bovinos; FIV

SBTE 235 Biotecnologias de suporte: criopreservação, criobiologia, biologia molecular e “ômicas”

Número de submissão 1526

#### **Análise de dados de RNA-seq em um servidor local “galaxy” de ambiente amigável ao usuário, produtivo e reprodutível**

Jochen Bick; Susanne Ulbrich; Stefan Bauersachs

*Eth Zurich, Zurich, Suíça.*

Desde que o sequenciamento de RNA uma enorme quantidade de dados e cada vez mais ferramentas de análises são desenvolvidas, é importante identificar as ferramentas mais acuradas e confiáveis com ajustes ótimos. Para enfrentar este desafio, nós utilizamos um servidor local Galaxy que nos proporciona uma maneira produtiva e reprodutível de analisar a enorme quantidade de dados gerados por projetos de genômica funcional. A maioria das ferramentas para análises NGS compõe linhas de comando em máquinas Linux. Para pesquisadores com formação em biologia, é um grande desafio utilizar estas ferramentas complexas e se familiarizar com o ambiente bio-informático. As ferramentas do Galaxy (Blankenberg et al., Current Protocols in Molecular Biology. ch 19: Unit 19.10.1-21, 2010) utilizam estas linhas de comando e fornecem uma interface gráfica fácil de usar, desejável para usuários sem formação em computação. Adicionalmente, os arquivos criados no Galaxy's podem ser rastreados e criados fluxogramas de trabalho das análises realizadas. A plataforma Galaxy está aberta na web e foi desenvolvida e introduzida em 2005 nas Universidades do Estado da Pensilvânia e John Hopkins (Giardine et al., Genome Research. v.15, p.1451-5, 2005). Ela foi desenhada para dar acesso fácil aos arquivos de pesquisa (arquivos FastQ, Fasta, anotações nos genomas, tabelas grandes) e fornece também um leque de ferramentas iniciais para análise básica dos dados. Para expandir estes pacotes de ferramentas básicas, é possível instalar ferramentas publicadas na App store (Galaxy Tool Shed - <https://toolshed.g2.bx.psu.edu> ~ 3700 ferramentas diferentes), que auxilia a agrupar ferramentas de uma área de pesquisa específica. Particularmente, o campo de análises de RNA-Seq congrega a maior comunidade desenvolvedora de ferramentas. Como o Galaxy é aberto, é fácil desenvolver e integrar novas ferramentas ao ambiente Galaxy. Além do servidor público do Galaxy <https://usegalaxy.org>, que é mantido pelo time que desenvolveu o Galaxy, também é possível programar um galaxy instalado localmente. Isto garante mais funcionalidade, flexibilidade, independência e confidencialidade se você trabalhar com dados não publicados. Um fluxograma básico para análise de dados de RNA-Seq inclui a verificação da qualidade, filtragem, separação e identificação de adaptadores, seguida de mapeamento para o genoma ou transcriptoma de referência. Finalmente, uma tabela de contagem de reads é gerada baseada em um arquivo com as anotações do gene. Os próximos passos seriam a análise estatística com o pacote BioConductor R como o EdgeR ou DESeq2. Este modelo pode ser colocado em prática em um fluxograma da plataforma Galaxy (sequência de análises utilizando ferramentas em série) é uma característica útil do Galaxy, que pode ser gerada manualmente ou extraída de arquivos pré-existentes e compartilhados no ambiente Galaxy. Uma vez que o usuário fez seu login na interface da web, é possível trabalhar em um ambiente personalizado, no qual

comandos básicos, como ver, converter ou calcular dados são facilmente acessíveis. Em resumo, Galaxy é uma forma prática de se estabelecer uma eficiente análise de bioinformática para conjunto de dados em larga escala gerados por laboratórios de biologia molecular.

**Palavras-chave:** Plataforma Galaxy; análise de RNA-seq; NGS

SBTE 236 Biotecnologias de suporte: criopreservação, criobiologia, biologia molecular e “ômicas”

Número de submissão 1534

**Efeito da modulação da Acil-CoA sintetase de cadeia longa no desenvolvimento e criotolerância de embriões bovinos**  
Roniele Santana Valente<sup>1</sup>; Tamie Guibu de Almeida<sup>2</sup>; Mayra Fernanda Alves<sup>2</sup>; Daniel Robert Arnold<sup>2</sup>; Fernanda Cruz Landim<sup>3</sup>; José Henrique Fortes Pontes<sup>2</sup>; Andrea Cristina Basso<sup>2</sup>; Mateus José Sudano<sup>1</sup>

1.Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, RS, Brasil; 2.In vitro Brasil, Mogi Mirim, SP, Brasil; 3.Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil.

As Acil-CoA sintetases de cadeia longa (ACS) são uma família de enzimas que ativam ácidos graxos de cadeia longa para gerar Acil-CoA de cadeia longa, substrato essencial para síntese de várias espécies lipídicas, incluindo triacilglicerol, colesterol e fosfolípidos. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da modulação da ACS no desenvolvimento e criopreservação de embriões bovinos. Oócitos recuperados de ovários de abatedouros contendo citoplasma homogêneo e mais de três camadas de células do cóculo foram maturados (dia -1) e fertilizados (dia 0) *in vitro*. Os possíveis zigotos foram cultivados em aaSOF contendo 2,5% de SFB. No dia 5 de cultivo, o meio foi suplementado com o modulador positivo (ACS+) e negativo (ACS-) da ACS. Um estudo preliminar (1000 oócitos) foi conduzido para determinar a melhor dose das drogas entre 5 concentrações (100x, 10x, 1x, 10<sup>-1</sup>x e 10<sup>-2</sup>x). A maior dose de cada modulador que não afetou o desenvolvimento e a qualidade embrionária foi selecionada (ACS+: 10x e ACS-: 10<sup>-2</sup>x). Posteriormente, 4105 oócitos foram maturados, fertilizados e cultivados *in vitro* (aaSOF + 2,5% SFB). No dia 3, foram avaliadas as clivagens e os embriões não clivados foram descartados. No dia 5, os embriões foram aleatoriamente distribuídos para cada tratamento a seguir: ACS+ (n=579), ACS- (n=594), associação ACS+ e ACS- (ACS+/-; n=581), e controle (C; tratado apenas com PBS, n=600). No dia 7, a produção de blastocistos foi avaliada e blastocistos expandidos de grau I, II e III foram vitrificados (n=293) pelo método cryotop. Os dados foram analisados por ANOVA utilizando o PROC GLIMMIX do SAS. A taxa de clivagem total foi de 71,2% (2921/4105). A produção de blastocistos foi similar (P>0.05) entre tratamentos: ACS+ (24%; 199/829), ACS- (24% 198/131), ACS+/- (23%; 190/815), C (27%; 221/826). Não houve diferença (P>0.05) na taxa de re-expansão entre os tratamentos e grau de qualidade dos blastocistos (ACS+: 91-100%; ACS-: 90-100%; ACS+/-: 91-95%; e C: 86-96%). A taxa de eclosão dos embriões expandidos grau I (ACS+: 93.3%, 14/15; ACS-: 83.8%, 26/31; ACS+/-: 86.9%, 20/23; e C: 96.7%, 30/31) e grau II (ACS+: 91.3 %, 21/23; ACS-: 92.3%, 12/13; ACS+/-: 65.2%, 15/23; e C: 84.0%, 21/25) foram similares (P>0.05) entre tratamentos. Contudo, blastocistos expandidos grau III derivados de ACS+ (78,2 %, 18/23) tiveram maior (P < 0,05) taxa de eclosão em comparação com a ACS- (53,5 %, 15/28) e C (51,7%, 15/19), mas semelhante (P> 0,05) com a ACS +/- (58,6%, 17/29). Portanto, este estudo revela que: i) o uso de moduladores positivos e negativos da ACS não afetou o desenvolvimento embrionário; ii) a modulação negativa da ACS não melhorou a criotolerância; iii) a estimulação da ACS aumentou a criotolerância de blastocistos expandidos grau III, mesmo em associação com o modulador negativo. Assim, acredita-se que a ativação de ácidos graxos contendo 12, 14 e 20 carbonos no metabolismo lipídico favorece a criotolerância de embriões de qualidade inferior.

**Palavras-chave:** Criotolerância; desenvolvimento embrionário; embriões bovinos

SBTE 237 Biotecnologias de suporte: criopreservação, criobiologia, biologia molecular e “ômicas”

Número de submissão 1551

**Estudo de polimorfismos do gene JY-1 e sua associação à produção *in vivo* e *in vitro* de embriões em doadoras da raça Holandesa (*Bos taurus taurus*)**

Cecilia Rodrigues Alves Silveira<sup>1</sup>; Júlia Cestari Pierucci<sup>1</sup>; Carlos Alberto Rodrigues<sup>2</sup>; Augusto Castro Neto<sup>3</sup>; Gregório Miguel Ferreira de Camargo<sup>4</sup>; Daniel Jordan de Abreu dos Santos<sup>1</sup>; Ana Cláudia de Freitas<sup>1</sup>; Pietro Sampaio Baruselli<sup>5</sup>; Humberto Tonhati<sup>1</sup>; Lindsay Unno Gimenes<sup>1</sup>

1.FCAV - UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil; 2.Clínica Veterinária Samvet, São Carlos, SP, Brasil; 3.Bioembryo, Bauru, SP, Brasil; 4.Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, Dois Vizinhos, PR, Brasil; 5.FMVZ - USP, São Paulo, SP, Brasil.

A proteína JY-1 é específica do oócito e possui um importante papel regulador na foliculogênese, maturação oocitária e no início do desenvolvimento embrionário. O gene em bovinos que codifica esta proteína possui três éxons e dois íntrons, sendo que a região codificadora compreende partes dos éxons 2 e 3. O objetivo do presente estudo foi verificar a ocorrência de polimorfismos no gene JY-1 e sua associação com a produção *in vivo* e *in vitro* de embriões de doadoras da raça Holandesa. Dados retrospectivos de produções *in vivo* (n=572) e *in vitro* (n=1.068) de embriões durante o período de 2013 a 2015 foram obtidos de 144 vacas doadoras de embriões e oócitos não lactantes da raça Holandesa. Para a identificação dos polimorfismos do gene JY-1, foram colhidas amostras de folículos pilosos, sendo a região do éxon 2 amplificada e sequenciada pelos métodos de PCR-sequenciamento. Foram detectados quatro SNPs, sendo dois localizados no éxon 2

(rs381676360; rs384600927) e dois no íntron 2 (rs378994837; rs211595914). O SNP rs381676360 provocou uma substituição não sinônima de aminoácido (leucina/isoleucina) e o rs384600927, uma substituição sinônima do aminoácido valina. Em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, uma das quatro frequências genotípicas não se encontrava em equilíbrio (rs211595914;  $P < 0,01$ ). Considerando o teste de desequilíbrio de ligação (DL), maiores valores de  $r^2$  ( $> 0,33$ ) foram observados entre os SNPs rs381676360, rs384600927 e rs378994837 ( $r^2 = 0,767-0,973$ ) e um SNP (rs211595914) apresentou baixos valores de  $r^2$  ( $r^2 = 0,016-0,025$ ). A associação dos SNPs com as características avaliadas [número de embriões transferíveis produzidos *in vivo* (NET); taxa de embriões transferíveis *in vivo* (%ET); número de embriões produzidos *in vitro* (NE); taxa de clivagem (%CLIV) e taxa de embriões *in vitro* (%E)] foi realizada utilizando modelos lineares generalizados através do procedimento GLIMMIX do pacote estatístico do SAS 9.3®. A correção de Bonferroni para o número de SNPs estudados foi aplicada e foram considerados SNPs associados os que obtiveram valores de  $P < 0,0125$ . Nenhum dos SNPs foi associado às características estudadas isoladamente. Porém, quando todos os SNPs foram considerados em conjunto quanto à associação às características, valores significativos foram encontrados para o NET ( $P < 0,01$ ), NE ( $P < 0,01$ ) e %E ( $P < 0,01$ ). Ainda, os três SNPs em DL foram associados à %E ( $P = 0,012$ ). Nenhum SNP foi associado à característica %ET. Desta forma, é possível concluir que o gene JY-1 possui polimorfismos do tipo SNP em vacas da raça Holandesa e que estes, estão associados à produção embrionária. Destaca-se a necessidade da caracterização de outras regiões do gene com o objetivo de encontrar novos polimorfismos e novas associações.

Agradecimentos: FAPESP (PROC 2014/13162-1) e CNPq (PROC 447.172/2014-0) pela bolsa e suporte financeiro.

**Palavras-chave:** SNP; marcador molecular; gado leiteiro

SBTE 238 Biotecnologias de suporte: criopreservação, criobiologia, biologia molecular e “ômicas”

Número de submissão 1564

#### **Retirada do fluido da blastocle associada à melatonina no meio de cultivo melhora a viabilidade de embriões bovinos vitrificados**

Thaís Campos Marques<sup>1</sup>; Tiago Omar Diesel<sup>1</sup>; Carolina Gonzales da Silva<sup>2</sup>; Elisa Caroline da Silva Santos<sup>3</sup>; Carlos Frederico Martins<sup>2</sup>; Margot Alves Nunes Dode<sup>4</sup>; Maria Lúcia Gambarini<sup>1</sup>

1.Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil; 2.Embrapa Cerrados/CTZL, Brasília, DF, Brasil; 3.National Institute Agrobiological Sciences, Tsukuba, Japão; 4.Embrapa/Cenargen, Brasília, DF, Brasil.

O tratamento com melatonina (MEL) e a retirada do fluido da blastocle (RFB) tem sido sugeridos como boas opções para melhorar o desenvolvimento e a viabilidade embrionária após a criopreservação de embriões bovinos (Wang F et al, J Pineal Res, 56, 333-42, 2014; Wang F et al, PLoS One, 9, e93641, 2014; Min SH et al, Cryobiology, 66, 195-9, 2013). Investigou-se os efeitos da RFB antes da vitrificação de embriões produzidos *in vitro* com MEL. Ovócitos viáveis foram maturados *in vitro* (MIV) por 24 horas a 38,5°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Sêmen convencional congelado (Nelore, 1x10<sup>6</sup>/mL) foi usado para a fecundação. Após 18 horas, os prováveis embriões foram cultivados sem MEL (Controle) ou com MEL a 10<sup>-9</sup> M (CIV+M10-9) por sete dias nas mesmas condições que MIV. No dia 3, realizou-se feeding de acordo com o tratamento. No sétimo dia de cultivo, a metade dos blastocistos expandidos (Bx) grau I e II do tratamento CIV+M10-9 foi submetida à RFB (CIV+M10-9 RFB). Embriões grau I e II dos três grupos foram vitrificados (n=618), aquecidos e recultivados em meio de cultivo (CIV) por 72 horas. Avaliou-se taxas de re-expansão (TR) após 2 e 24 horas e taxas de eclosão (TE) após 24, 48 e 72 horas. O número total de células (NTC) e número de células apoptóticas (NCA) em Bx foi avaliado pela técnica TUNEL. NTC e NCA apresentaram distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e foram comparadas pelo teste de Tukey (ANOVA). TR e TE foram avaliadas pelo teste qui-quadrado. Os dados confirmaram que, independente da RFB, a suplementação de MEL a 10<sup>-9</sup> M ao meio de cultivo melhorou as TR e TE às 24, 48 e 72 horas ( $P < 0,05$ ). A TR às 2 h do controle (n=198), CIV+M10-9 (n=215) e CIV+M10-9 RFB (n=205) foram 29,3%, 86,7% e 89,3%, e às 24 h foram 78,8%, 89,7% e 87,7%, respectivamente. O controle necessitou de um período de 24 horas de recultivo para sua total re-expansão em relação aos grupos com MEL ( $P < 0,05$ ). As TE às 24 horas foram 6,1%, 18,7% e 27,3%, às 48 horas foram 6,7%, 37,9% e 41,5%, às 72 horas foram 20,3%, 56,1% e 66,8%, respectivamente para controle, CIV+M10-9 e CIV+M10-9 RFB. A TE às 24, 48 e 72 horas após o aquecimento foi superior no CIV+M10-9 RFB em relação aos demais tratamentos ( $P < 0,05$ ). Embora controle e CIV+M10-9 apresentaram a mesma TE às 24 horas ( $P > 0,05$ ), a MEL aumentou a TE às 48 e 72 horas quando adicionada no CIV ( $P < 0,05$ ). A média do NTC e do NCA dos grupos frescos foi  $135,6 \pm 5,5$  e  $7,8 \pm 0,6$  (controle, n=15) e  $135,4 \pm 5,6$  e  $3,4 \pm 0,6$  (CIV+M10-9, n=15) e dos grupos vitrificados foi  $139,8 \pm 6,1$  e  $12,5 \pm 0,6$  (controle, n=15),  $136,1 \pm 5,6$  e  $4,9 \pm 0,6$  (CIV+M10-9, n=15),  $140,1 \pm 5,8$  e  $3,7 \pm 0,6$  (CIV+M10-9 RFB, n=15), respectivamente. Não houve diferença quanto ao NTC ( $P > 0,05$ ). O NCA apresentou-se similar nos grupos com MEL, independente da vitrificação e da RFB ( $P > 0,05$ ), porém menor que os grupos sem MEL ( $P < 0,05$ ). Esta pesquisa demonstrou efeito benéfico da suplementação de melatonina a 10<sup>-9</sup> M ao meio de cultivo quanto à qualidade e viabilidade embrionária, independente da RFB.

Apoio Financeiro: Embrapa MP1 e CNPQ

**Palavras-chave:** Apoptose celular; antioxidante; criotolerância

SBTE 239 Biotecnologias de suporte: criopreservação, criobiologia, biologia molecular e “ômicas”

Número de submissão 1572

**Influência da suplementação alimentar de novilhas Nelore com ácidos graxos poliinsaturados sobre a criotolerância e o perfil de lipídios de membrana de embriões produzidos *in vitro* frescos e vitrificados**

Beatriz Caetano da Silva Leão<sup>1</sup>; Nathália Alves de Souza Rocha-Frigoni<sup>1</sup>; Eriklis Nogueira<sup>2</sup>; Elaine Cristina Cabral<sup>3</sup>; Christina Ramires Ferreira<sup>3</sup>; Marcos Nogueira Eberlin<sup>3</sup>; Monica Ferreira Accorsi<sup>4</sup>; Thiago Vieira Neves<sup>4</sup>; Gisele Zoccal Mingoti<sup>4</sup>

1.Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium - Unisalesiano, Araçatuba, SP, Brasil; 2.Embrapa Pantanal, Corumbá, MS, Brasil; 3.Laboratório Thomson de Espectrometria de Massas - UNICAMP, Campinas, SP, Brasil; 4.Laboratório de Fisiologia da Reprodução - FMVA UNESP, Araçatuba, SP, Brasil.

A suplementação alimentar de fêmeas bovinas doadoras de oócitos com ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) pode modular mecanismos moleculares de absorção de lipídios em oócitos inclusos nos folículos ovarianos, afetando o subsequente desenvolvimento embrionário *in vitro*. Ainda, o sucesso da criopreservação embrionária pode ser afetado pela composição de lipídios de membrana, como fosfatidilcolinas (PC) e esfingomielinas (SM). O objetivo desse estudo foi avaliar o desenvolvimento e a criotolerância de embriões PIV a partir de oócitos recuperados de novilhas Nelore (n=16) alimentadas com dieta controle (Contr) ou com gordura protegida ruminal rica em ácido linoléico (Megalac-E<sup>®</sup>), por no mínimo 60 dias (Gord). Além disso, foi avaliado o perfil lipídico de membrana dos embriões frescos e vitrificados, de ambos os tratamentos utilizando espectrometria de massas por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-MS). COCs (n=491) recuperados após 6 sessões de OPU foram MIV por 22h. Após a FIV (D=0), os zigotos foram CIV em meio SOF (5mg/mL BSA e 2,5% SFB, 5% CO<sub>2</sub> em ar) por 7 dias. As taxas de clivagem e blastocistos (BI) foram avaliadas nos D3 e 7, respectivamente. BI foram vitrificados (Ingámed, Brasil) e a taxa de sobrevivência embrionária avaliada 24h após o aquecimento. BI frescos e viáveis após o aquecimento foram transferidos para microtubos contendo 200µL de solução aquosa de metanol HPLC 50%, armazenados a -20°C e imediatamente transportados para a análise por MS. Cada embrião foi depositado no centro do spot da placa de MALDI-MS, sobre a qual foi depositado 1µL de matriz (1.0 mol/12.5 ácido diidroxibenzóico em metanol), em temperatura ambiente até sua cristalização. Os espectros foram obtidos no intervalo de massas de 700-1200 m/z nos modos positivo e reflectron, utilizando o espectrômetro de massas Autoflex III (Bruker Daltonics, USA). Os íons mais intensos de cada espectro foram considerados como ponto de partida para a determinação da relação m/z correspondente aos lipídios e, apenas as m/z claramente distintas dos ruídos nos espectros foram incluídas na análise discriminante parcial dos quadrados mínimos (PLS-DA). As taxas de clivagem, BI e as abundâncias relativas dos íons mais relevantes para explicar a variabilidade dos resultados foram submetidas à ANOVA (GLIMMIX, SAS Institute), seguida pelo teste de Tukey. A taxa de re-expansão embrionária foi avaliada por X2 (P<0,05). Os dados estão apresentados como LSM±EPM. A dieta não afetou (P>0,05) as taxas de clivagem (65,0±3,1%, em média), de BI (43,2±3,7%, em média) e de sobrevivência embrionária após aquecimento (79,3%, em média). A suplementação com PUFA aumentou (P<0,05) a abundância relativa de apenas um tipo de lipídio, atribuído como PC éter (PCe) 38:2. A criopreservação alterou (P<0,05) a abundância relativa de 10 tipos de lipídios: PC 32:0, PC 34:1, SM 24:1, PC 40:6 ou PC 42:9, PC plasmalogeno (PCp) 44:10 ou PC 42:7, triacilglicerol (TAG) 54:9 e um íon não atribuído (m/z 833.2) foram reduzidos nos BI que sobreviveram à vitrificação, em comparação aos frescos. Porém, a abundância dos íons PC 36:3 ou PC 34:0, PCe 38:2 ou PC 36:6 e PC 36:5 ou PCe 38:1 aumentou (P<0,05) após a vitrificação. Os resultados demonstram que os perfis de PC, SM e TAG determinados pela MS diferiram significativamente entre blastocistos bovinos frescos e criopreservados. Devido às diferenças entre as abundâncias dos íons, os mesmos podem ser utilizados como potenciais marcadores da sobrevivência embrionária pós-criopreservação.

**Palavras-chave:** Bovino; criopreservação; espectrometria de massas

SBTE 240 Biotecnologias de suporte: criopreservação, criobiologia, biologia molecular e “ômicas”

Número de submissão 1579

**Criotolerância e taxa de concepção após exposição de embriões bovinos produzidos *in vitro* ao Forskolin ou ácido linoleico antes da vitrificação**

Melissa Meneghel<sup>1</sup>; Priscila Chediek Dall Acqua<sup>1</sup>; Marcela Ambroggi<sup>1</sup>; Lucas Maciel Gouvêa<sup>2</sup>; Marcos Antônio de Achilles<sup>3</sup>; Beatriz Caetano da Silva Leão<sup>1</sup>; Eriklis Nogueira<sup>4</sup>; Nathália Alves de Souza Rocha-Frigoni<sup>1</sup>; Gisele Zoccal Mingoti<sup>1</sup>

1.Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita, Jaboticabal, SP, Brasil; 2.Concepção Reprodução Bovina, Araçatuba, SP, Brasil; 3.Achilles Genetics - Biotecnologia em Reprodução Animal, Garça, SP, Brasil; 4.Embrapa Pantanal, Corumbá, MS, Brasil.

O presente estudo teve como objetivos avaliar os efeitos de estimuladores da lipólise (Forskolin: Forsk) e inibidores da lipogênese (Ácido Linoléico: LA) durante o cultivo *in vitro* (CIV) sobre o acúmulo de lipídios intracitoplasmáticos e criotolerância do embrião bovino (Experimento 1), bem como avaliar o efeito do tratamento dos embriões com Forsk sobre a taxa de concepção após transferência para receptoras (Experimento 2). No Experimento 1, oócitos (n=1242) foram maturados *in vitro* (MIV) durante 22h a 38,5°C e 5% de CO<sub>2</sub> em ar em meio TCM-199 bicarbonato com 10% SFB e hormônios. Após fecundação, os prováveis zigotos foram cultivados em meio SOF (grupo Controle) suplementado com: 100 µM LA durante todo o período do CIV (grupo LA); ou 5 µM Forsk a partir do dia 6 do CIV (grupo Forsk); ou com

associação de LA e Forsk, como acima descrito (grupo LA+Forsk). O CIV foi conduzido a 38,5°C e 5% de CO<sub>2</sub> em ar, por 7 dias. O desenvolvimento embrionário foi avaliado no dia 7 do CIV (D7), quando os blastocistos foram corados com Sudan Black B 1% para determinação do conteúdo lipídico intracitoplasmático. Os embriões foram avaliados em microscopia de luz e as imagens obtidas foram analisadas por Q-Capture Pro Image Software. O grupo Controle foi escolhido como calibrador e a média de cada grupo foi dividida pela média do calibrador para calcular a intensidade relativa de pixels, expressa em unidades arbitrárias. Os blastocistos expandidos foram vitrificados (Vetri Ingá®), aquecidos e cultivados por 24h em SOF para determinação das taxas de re-expansão. Os dados foram analisados por ANOVA seguido por teste de Tukey, e as taxas de re-expansão por qui-quadrado ( $P < 0,05$ ). Não foi observada diferença entre os grupos ( $P > 0,05$ ) na taxa de produção de blastocistos (variação entre 47,2±3,9% e 51,6±5,5%). Observou-se diminuição ( $P < 0,05$ ) da quantidade de lipídeos intracitoplasmáticos nos embriões do grupo Forsk (0,86±0,04) comparado com Controle (0,99±0,02) e LA (1,02±0,02); no entanto, o grupo LA+Forsk (0,95±0,03) não diferiu ( $P > 0,05$ ) dos demais. Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre os grupos na taxa de re-expansão imediata após o aquecimento (0h: 30,8% a 41,9%). Após cultivo de 24h, a re-expansão foi maior ( $P < 0,05$ ) no grupo Forsk (71,4%) comparado com Controle (46,2%) e LA+Forsk (45,2%); o grupo LA (65,1%) não diferiu dos demais ( $P > 0,05$ ). Baseado nestes resultados, o tratamento com 5 µM Forsk foi escolhido para o desenvolvimento do Experimento 2: oócitos (n=1947) foram aspirados de 22 doadoras Nelore e foram maturados e fecundados *in vitro* como acima descrito. Os prováveis zigotos foram cultivados de acordo com os tratamentos Controle e Forsk acima descritos e, no D7, foram vitrificados e aquecidos, antes de serem transferidos para receptoras sincronizadas. Os dados da taxa de concepção foram analisados através do comando PROC GLIMMIX (SAS Inst. Inc.). A taxa de concepção após transferência dos embriões aquecidos foi semelhante ( $P > 0,05$ ) entre os grupos Controle (15,1±3,6%) e Forsk (19,7±4,0%). De acordo com os resultados obtidos, o tratamento com Forsk foi eficiente para promover a redução da quantidade de lipídeos intracitoplasmáticos e melhorar a criotolerância de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Apesar disso, não aumentou a taxa de concepção.

Agradecimentos: CAPES

**Palavras-chave:** Ácido linoléico; Forskolin; criopreservação

SBTE 241 Biotecnologias de suporte: criopreservação, criobiologia, biologia molecular e “ômicas”

Número de submissão 1591

#### **Avaliação espermática de bubalinos criopreservado em diferentes diluidores com uso de sondas fluorescentes**

Anelise Sarges Ramos<sup>1</sup>; Nathalia Clemente Barreto<sup>1</sup>; Sebastião Tavares Rolim Filho<sup>1</sup>; Haroldo Francisco Lobato Ribeiro<sup>2</sup>; Elenara Botelho Araujo<sup>1</sup>; Otávio Mitio Ohashi<sup>1</sup>; Henry Daniel Manrique Ayala<sup>2</sup>; Alessandra Ximenes Santos<sup>2</sup>; Arnaldo Algaranhar Gonçalves<sup>2</sup>; Víctor da Costa Mileo<sup>1</sup>

1.UFRA, Belém, PA, Brasil; 2.UFPA, Belém, PA, Brasil.

Objetivou-se com este trabalho comparar o efeito de diluidores à base de Citrato (73 mL de Citrato de Sódio e 1g de D-Fructose), Lactose (73 mL de lactose a 11% e 1 g de D-frutose), Tes-Tris (24,5g de Tes, 5,3g de Tris, 1g de D-frutose, 11g de leite desnatado) e Tris (12,11g de Tris, 6,8g de ácido cítrico, 2,05g de D-frutose e 2,05g de lactose), sendo adicionados 7mL de glicerol, 20mL de gema de ovo e 1 mg/mL de antibiótico a todos os quatro diluidores, na criopreservação de sêmen bubalino, com a finalidade de aumentar a taxa de prenhez e disseminar biotécnicas reprodutivas. O experimento foi realizado no Laboratório do Setor de Reprodução Animal, UFRA, utilizando dois touros bubalinos da raça Murrah. As colheitas seminais foram feitas com vagina artificial, totalizando 10 ejaculados, os quais foram criopreservados nos quatro diluidores e submetidos a análises de motilidade, vigor e integridade de membrana plasmática (IMP), pelos testes hiposmótico (HOS) e eosina-nigrosina (EN). O Teste de Termorresistência (TTR) compreendeu análises de motilidade e vigor espermáticos após três horas de incubação. Na microscopia de epifluorescência utilizou-se associação de sondas fluorescentes: Iodeto de propídio (PI), Hoechst 33342 (H342), Aglutinina de Pisum sativum conjugada com o isotiocinato de fluoresceína (FITC-PSA), Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1) para análise da IMP, integridade de membrana acrossomal e potencial de membrana mitocondrial. A análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey (5%) foram utilizados. Em relação à motilidade, os diluidores Tes-Tris (70,50±10,00%) e Tris (78,50±10,81%) foram melhores que o Citrato (43,00±23,59%) e Lactose (42,50±25,52%). Quanto ao vigor o Tes-Tris (2,80±0,58%) e Tris (3,15±0,91%) foram superiores a Lactose (1,85±0,91%). Em relação IMP (HOS e EN), nos quatro diluidores, não ocorreram diferença estatística. No TTR, a motilidade do Tes-Tris (19,00±20,25%) e Tris (20,00±21,86%) diferiram estatisticamente do Citrato (2,50±6,35%) e Lactose (1,70±2,36%). Na avaliação do vigor o Tes-Tris (1,30±0,82) e o Tris (1,35±0,67) apresentaram melhores resultados do que o Citrato (0,30±0,67) e a Lactose (0,40±0,52). Na microscopia de epifluorescência, os diluidores demonstraram eficácia na criopreservação, pois não diferiram estatisticamente. Por outro lado a porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática intacta, acrossoma intacto e com função mitocondrial foi melhor preservada no diluente Tes-Tris (42,5±12%). As sondas fluorescentes monitoram a integridade das estruturas espermáticas, as quais possuem a capacidade de ligar-se a pontos específicos das células, permitindo o diagnostico pratico e direto (CELEGHINI, Reprod Dom Anim, 42, 479–488, 2007). Portanto, os diferentes diluidores demonstraram satisfatória função de criopreservação do sêmen bubalino, os quais mantiveram a IMP dos espermatozoides e o Tes-Tris e Tris foram os que apresentaram os melhores resultados.

**Palavras-chave:** Búfalo; fluorescência; teste de termorresistência



SBTE 242 Biotecnologias de suporte: criopreservação, criobiologia, biologia molecular e “ômicas”

Número de submissão 1596

**Inibição da HSP90 durante maturação interfere na abundância relativa de transcritos específicos no oócito bovino**

Eliza Diniz de Souza<sup>1</sup>; Natana Chaves Rabelo<sup>2</sup>; Rhaisa Bernarde Silva Dias<sup>3</sup>; Michele Munk Pereira<sup>4</sup>; Gustavo Torres de Souza<sup>4</sup>; Iuri Drumond Louro<sup>1</sup>; Luiz Sérgio de Almeida Camargo<sup>5</sup>

1.Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)/Renorbio, Vitoria, ES, Brasil; 2.Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira / Fiocruz (IFF, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; 3.Universidade Presidente Antônio Carlos (UNIPAC), Juiz de Fora, MG, Brasil; 4.Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora, MG, Brasil; 5.Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brasil.

A proteína de choque térmico 90kDa (HSP90) é uma das mais abundantes chaperonas e essencial à sobrevivência da célula. Sua inibição pelo 17-alilamino-17-demetoxigeldanamicina (17AAG; Sigma, St. Louis, USA) durante a MIV reduz a competência oocitária com consequente diminuição na taxa de produção de embriões (Souza et al., 2013. AnimReprod, 10:515). Em camundongos, a redução ou a inibição da HSP90, causa uma série de anomalias que impedem a progressão da meiose em oócitos (Metchat et al., 2009). O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da inibição da HSP90 pelo 17AAG durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos na quantidade relativa de transcritos específicos associada ao desenvolvimento e maturação. Oócitos imaturos aspirados de ovários de abatedouro foram selecionados e distribuídos aleatoriamente em três grupos: 0 (controle), 1 e 2µM de 17AAG nas 12h iniciais da MIV (24h) a 38°C, 5%CO<sub>2</sub> e umidade saturada. Três pools de dez oócitos para cada grupo foram desnudados em hialuronidase 0,1% e congelados em nitrogênio líquido. Para a extração do RNA total dos oócitos foi utilizado RNeasy micro Kit® (Qiagen, São Paulo, Brasil) e para a transcrição reversa o kit SuperScript® III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). A quantificação relativa dos transcritos MAPK, c-MOS, MATER, ZAR, e HSP90 foi realizada por Real-TimePCR pelo método do Ct comparativo, utilizando o gene GAPDH como referência endógena e o grupo controle como calibrador. Os resultados foram analisados pelo software REST®, que usa o modelo estatístico Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation TEST®. Os valores são mostrados como média±EP. Não houve diferença (P>0,05) entre o grupo 1µM e o grupo controle na quantidade de transcritos dos genes MAPK (0,85±0,17), c-MOS (0,86±0,13), MATER (0,93±0,14), ZAR (0,97±0,15) e HSP90 (0,70±0,11). Entretanto, o grupo com 2µM do inibidor da HSP90 apresentou menor quantidade de transcritos dos genes MAPK, ZAR e HSP90 (P<0,05; 0,63±0,10; 0,68±0,10; 0,60±0,08, respectivamente) que o grupo controle. Conclui-se que a inibição da HSP90 utilizando 2µM de 17AAG por 12h durante a MIV interfere na abundância de transcritos de genes importantes para a maturação e posterior desenvolvimento embrionário, o que ressalta a importância da HSP90 nos processos de maturação oocitária.

**Palavras-chave:** Expressão gênica; 17AAG; maturação

SBTE 243 Biotecnologias de suporte: criopreservação, criobiologia, biologia molecular e “ômicas”

Número de submissão 1597

**Taxa de apoptose após vitrificação/reaquecimento de embriões Gir produzidos *in vitro***

Clara Ana Santos Monteiro<sup>1</sup>; Beatriz Abdalla Ferraz de Barros<sup>2</sup>; Paola Maria da Silva Rosa<sup>3</sup>; Gabriela Ramos Leal<sup>1</sup>; Agostinho Jorge dos Reis Camargo<sup>4</sup>; Raquel Varella Serapião<sup>4</sup>; Clara Slade Oliveira<sup>5</sup>

1.Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil; 2.Fundação Educacional D. André Arcoverde-FAA, Valença, RJ, Brasil; 3.Universidade Severino Sombra-USS, Vassouras, RJ, Brasil; 4.Pesagro Rio, Niterói, RJ, Brasil; 5.Embrapa Gado De Leite, Valença, RJ, Brasil.

A raça Gir é a principal representante *Bos indicus* nos sistemas leiteiros na América do Sul, especialmente no Brasil, tendo apresentado melhora significativa na produção de leite, além da resistência às condições de clima tropical e ectoparasitas, sendo, portanto, uma importante raça doadora de oócitos para PIVE. A criopreservação de embriões é uma ferramenta vantajosa na PIVE, apresentando, as subespécies *Bos taurus* e *Bos indicus* desempenhos diferentes nessa biotécnica. Apesar da importância da raça Gir no Brasil, pouco se sabe sobre seus parâmetros de tolerância a criopreservação. Sendo assim, o objetivo do estudo foi verificar a taxa de apoptose associada à criotolerância de embriões Gir puros produzidos *in vitro*. Para obtenção dos CCOs, doadoras Gir foram submetidas à aspiração folicular guiada por ultrassonografia transvaginal. Os oócitos viáveis foram maturados, fertilizados com sêmen sexado de touro Gir, e os prováveis zigotos foram cultivados durante 7 dias. Foi utilizado sistema de incubação a 38,5° C, 5%CO<sub>2</sub> em ar atmosférico e alta umidade, e meios de MIV, FIV e CIV da Bioklone® (Jaboticabal, Brasil). No 7º dia de cultivo os embriões foram vitrificados utilizando o protocolo proposto por Vajta (Vajta, Mol Reprod Dev, 51, 53-58, 1998) com pequenas modificações. Os embriões vitrificados foram reaquecidos e cultivados por mais 3 horas, quando foi avaliada a re-expansão da blastocle. Os embriões vitrificados/reaquecidos que apresentaram re-expansão da blastocle (V+) e que não apresentaram (V-) foram corados para avaliação do número total de células (NTC) com Hoechst e apoptose com detecção de imunofluorescência da caspase-3. A comparação entre as médias do NTC e taxa de apoptose entre os grupos foi feita através do Teste de Mann Whitney. As análises estatísticas foram realizadas no software InStat GraphPad, com nível de significância de 5%. Um total de 38 embriões vitrificados/reaquecidos foi obtido em 3 repetições (V+ n= 10; V- n=28). Não houve diferença (p>0,05) entre os

grupos, tanto na média do NTC (V+: 82,4a ± 27,1; V-: 79,5a ± 26), quanto na taxa de apoptose (V+: 5,9%a; V-: 15,4%a). Vale ressaltar que, embora, esse efeito não tenha sido significativo, foi observado, no grupo de embriões que não apresentou re-expansão da blastocle, um maior número de embriões apresentando mais de 20% de células apoptóticas. No entanto, a taxa de apoptose não parece ser a causa da não re-expansão da blastocle de embriões da raça Gir vitrificados, e por tanto que não são selecionados para transferência.

Agradecimentos: FAPERJ, FAPEMIG, CAPES, Embrapa Gado de Leite.

**Palavras-chave:** Caspase; OPU; *Bos indicus*

SBTE 244 Biotecnologias de suporte: criopreservação, criobiologia, biologia molecular e “ômicas”

Número de submissão 1601

**Uso de marcadores moleculares CLARIFIDE Nelore para predição de índices reprodutivos em novilhas Nelore**

Juliano Rodrigues Melo; Aduino José Guedes Franco Filho; Everton Rodolfo Carvalho; Rafael Carvalho; Mauro Meneguetti; Fernando Alfonso Di Croce; Ocilon de Sá Filho; Jason Barrett Osterstock

*Zoetis, São Paulo, SP, Brasil.*

Estudos indicam que a Predição do Valor Molecular (MVP) para características reprodutivas, como Probabilidade de Parto Precoces (PPP) e Idade ao Primeiro Parto (IPP), pode ser utilizada como ferramenta para prever o desempenho reprodutivo futuro de fêmeas bovinas (Evans et al., 1999; Doyle et al., 2000; Donoghue et al., 2004). O objetivo deste estudo foi avaliar correlações entre MVP (PPP e IPP) e índices reprodutivos de novilhas Nelore precoces. Utilizaram-se 908 novilhas Nelore (263,0 ± 27,4 Kg; 17,6 ± 1,0 meses de idade), manejadas em pasto de *Brachiaria decumbens* com suplementação proteica (0,1% PV) e avaliadas genomicamente (CLARIFIDE Nelore, Zoetis). Todas as novilhas foram submetidas a protocolo de indução de ciclicidade, seguido por sincronização de ovulação e IATF. As novilhas que não engravidaram à IATF foram resincronizadas e, em seguida, expostas à monta natural por 90 dias. Avaliações ultrassonográficas avaliaram a resposta ao protocolo de indução de ciclicidade (presença de CL no dia do início do protocolo de IATF) e a taxa de prenhez ao final da estação de monta. As análises estatísticas foram realizadas no SAS 9.3 (SAS Instituto, Cary-NC, EUA), utilizando o PROC LOGISTIC para avaliar as variáveis binomiais e o PROC GLM para avaliar as variáveis contínuas. Houve efeito do MVP para PPP na taxa de indução de ciclicidade ( $P = 0,005$ ), de forma que cada ponto percentual de aumento no MVP incrementou em 5% a probabilidade de resposta ao protocolo de indução. Novilhas com menor valor para IPP tenderam ( $P = 0,1$ ) a apresentar melhor prenhez ao final da estação de monta. Os MVP para PPP e IPP fornecidos pela ferramenta genômica CLARIFIDE Nelore permitiram identificar novilhas que responderam melhor ao protocolo de indução de ciclicidade e que tenderam a apresentar maior probabilidade de prenhez ao final da estação de monta.

**Palavras-chave:** Clarifide; molecular; reprodução

SBTE 245 Biotecnologias de suporte: criopreservação, criobiologia, biologia molecular e “ômicas”

Número de submissão 1614

**Influência da via GMPc no conteúdo lipídico de oócitos bovinos maturados *in vitro***

Letícia Schefer<sup>1</sup>; Katia Lancellotti Schwarz<sup>2</sup>; Daniela Martins Paschoal<sup>2</sup>; Hugo Fernandes<sup>2</sup>; Fernanda Cavallari Castro<sup>2</sup>; Cláudia Lima Verde Leal<sup>2</sup>

*1. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil; 2. Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, Brasil.*

A criopreservação de oócitos e embriões é uma das dificuldades encontradas na produção *in vitro* de embriões bovinos (PIV). Oócitos e blastocistos de bovinos PIV apresentam acúmulo de lipídios mais elevados em relação aos produzidos *in vivo*. Essa característica tem sido associada com a qualidade inferior do embrião PIV e, por consequência, sua maior sensibilidade à criopreservação. Foi observado em adipócitos humanos que além da via clássica mediada pelo AMPc sobre a lipólise celular, a via GMPc também ativa enzimas importantes nesse processo, através da proteína cinase dependente de GMPc (PKG). O objetivo desse estudo foi avaliar a influência da via GMPc na lipólise oocitária. Pools de 25 CCOs foram maturados *in vitro* (MIV) em TCM199 suplementado com 10% SFB e diferentes moduladores da via GMPc. A síntese de GMPc foi estimulada por 10<sup>-5</sup> M Protoporfirina IX e 10<sup>-6</sup> M NPPA (peptídeo natriurético atrial) e bloqueada por 10<sup>-4</sup> M ODQ. A degradação do GMPc pela PDE5 foi inibida por sildenafil (SDF - 10<sup>-5</sup> M) associado a 10<sup>-5</sup> M KT5823 (inibidor da PKG). Após 24h, os oócitos foram desnudados e corados com Hoechst 33342 e Nile Red, para análise, por microscopia de epifluorescência, do estágio de maturação nuclear e teor lipídico, respectivamente (emissão 445-450nm e excitação 475-490nm e emissão 590nm e excitação 516-560nm, respectivamente). As imagens obtidas tiveram suas intensidades de fluorescência (IF) mensuradas pelo programa ImageJ. Os dados referentes a 5 replicatas/grupo foram submetidos a análise estatística por ANOVA seguida pelo teste Tukey com nível de significância de 5% (software GraphPad Prism). A maturação nuclear (%MII) não foi influenciada por nenhum dos moduladores da via GMPc (77,6%,  $P > 0,05$ ). A via GMPc estimulada pela Protoporfirina IX (21,5 ± 0,94 IF) ou por SDF associado ao KT5823 (29,2 ± 1,15 IF) resultou em oócitos com menor teor de lipídios em relação aos demais tratamentos e ao grupo controle (36,9 ± 2,12 IF,  $P < 0,05$ ). No entanto, o estímulo gerado pelo NPPA não foi suficiente para reduzir o conteúdo lipídico (34,1 ± 1,43 IF) que foi similar ao tratamento com ODQ (32,6 ± 1,71 IF) e ao controle ( $P > 0,05$ ). Nossos resultados sugerem a interferência da via GMPc sobre a lipólise

oocitária e com diferentes efeitos diante estímulos distintos. Mais estudos são necessários para compreensão completa da via GMPc na lipólise oocitária.

**Palavras-chave:** Criopreservação; GMPc; oócitos

SBTE 246 Biotecnologias de suporte: criopreservação, criobiologia, biologia molecular e “ômicas”

Número de submissão 1623

#### **Administração de cloprostenol na primeira semana pós-parto não parece modificar a expressão de PTGFR no endométrio de vacas mestiças**

Aline Sousa Camargos<sup>1</sup>; Sabine Wohlfres-Viana<sup>2</sup>; Isadora Frazon Costa<sup>3</sup>; Luiz Sérgio de Almeida Camargo<sup>2</sup>; João C.P. Ferreira<sup>3</sup>; Alcides Amorim Ramos<sup>4</sup>; Eunice Oba<sup>3</sup>

1.IF Goiano Campus Morrinhos, Morrinhos, GO, Brasil; 2.Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brasil; 3.DRARV FMVZ UNESP, Botucatu, SP, Brasil; 4.FMVZ UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

Este estudo investigou se a administração pós-parto de prostaglandina sintética, cloprostenol, a vacas mestiças afeta a expressão de receptores PGF2 $\alpha$  no útero. O estudo foi conduzido na fazenda Santa Fé, Brasil. Oito vacas Holstein-Zebu paridas, saudáveis, com condição corporal entre 3,5 and 4 (0-5 na escala), foram utilizadas. Todas as vacas apresentaram parto normal sem retenção de placenta. Após o parto (D0), as vacas foram aleatoriamente divididas em um de dois tratamentos. Controle: 2 mL de salina i.m. (n=4) ou CLO: 530  $\mu$ g de cloprostenol (n= 4) no D2 e D5 pós-parto. Foram coletadas biópsias endometriais aos D2, D7 e D14, utilizando uma agulha de biópsia Yomann (Hauptner®, Solingen, Alemanha). As amostras endometriais foram lavadas em PBS (LGC Biotecnology, SP, Brasil), colocadas em micro tubos contendo RNA later® (Life Technologies, CA, USA), estocadas a 5°C por 24 h e após -80°C. A extração do RNA total foi realizada com o RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante, e tratadas com DNase. O RNA foi quantificado no espectrofotômetro (ND-100 Nanodrop, Wilmington, USA). A transcrição reversa foi realizada com Superscript III First-Strand Synthesis Supermix kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), de acordo com as especificações do fabricante. A quantificação relativa dos transcritos do receptor de PGF2 $\alpha$  (PTGFR) foi realizada utilizando-se ACTB e GAPDH como genes de referência. PCR em tempo real foi realizado utilizando-se o Master Mix kit Power SYBR Green (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Os dados foram analisados por GLM ANOVA, utilizando o pacote SAS (v. 9.2, SAS Institute, Cary, USA). Fontes de variação foram os tratamentos (CONT e CLO); dias (2, 7 e 14); e interação tratamento vs dia. Médias da expressão relative dos genes foram contrastadas pelo teste SNK. A expressão do PTGFR foi similar entre os tratamentos (P > 0,05) em todos os dias pós-parto avaliados. Entretanto, notamos uma diminuição consistente da expressão do PTGFR entre dia 2 e 14 para ambos os grupos, apesar de não haver diferenças entre os dias pós-parto. Esta diminuição poderia sinalizar que o efeito sinalizador da PGF2 $\alpha$  é reduzido ao longo do pós-parto devido à baixa expressão do seu receptor. A ausência de efeito de cloprostenol na expressão endometrial de PTGFR em vacas mestiças Holstein-Zebu contrasta com os achados em Nellore, onde maior expressão de PTGFR foi detectado no endométrio no dia 14 pós-parto em vacas injetadas com cloprostenol nos dias 1 e 4 of pós-parto (Moraes, Theriogenology, 83, 276, 2015). Estes achados contrastantes podem ser devidos a diferenças fisiológicas no puerpério entre vacas leiteiras e de corte (Carthy, Animal, 8, 675, 2014). Em conclusão, administração de cloprostenol nos dias 2 e 5 pós-parto não modifica a expressão de PTGR no endométrio de vacas Holstein-Zebu. Agradecimentos à FAPESP pelo suporte financeiro e CAPES pela bolsa

**Palavras-chave:** Prostaglandina; bovino; útero

SBTE 247 Biotecnologias de suporte: criopreservação, criobiologia, biologia molecular e “ômicas”

Número de submissão 1648

#### **A cinética das primeiras clivagens influencia o padrão de metilação de DNA de embriões bovinos**

Jéssica Ispada<sup>1</sup>; Kelly Annes<sup>2</sup>; Camila Bruna de Lima<sup>1</sup>; Roberta Ferreira Leite<sup>2</sup>; Marc-André Sirard<sup>3</sup>; Marcella Pecora Milazzotto<sup>2</sup>

1.Univeridade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil; 2.Univeridade Federal do ABC, Santo André, SP, Brasil; 3.Universite Laval, Quebec, Canadá.

A metilação do DNA é um mecanismo de controle epigenético essencial durante o desenvolvimento embrionário, direcionando a diferenciação das futuras linhagens celulares e prevenindo a regressão ao estado indiferenciado. Baseando-se no fato de que embriões com cinética de desenvolvimento diferentes apresentam divergências em relação à expressão gênica, este estudo visou caracterizar as disparidades entre embriões de desenvolvimento rápido e lento em relação ao status de metilação global do DNA. Para isto, CCOs provenientes de ovários de abatedouro foram submetidos a MIV por 22-24h, FIV utilizando sêmen sexado (fêmeas) por 18h e CIV por 7 dias. Após 40h da inseminação os embriões foram classificados como Rápidos (4 ou mais células) ou Lentos (2 ou 3 células), permanecendo em cultura até o estágio de blastocisto (40 blastocistos por grupo obtidos em 4 replicatas). Estes embriões foram analisados através do EmbryoGENE Methylation DNA Array (EDMA). Resumidamente, o DNA extraído foi fragmentado com a enzima de restrição MseI e os fragmentos foram extraídos utilizando digestão sensível à metilações e amplificação mediada por ligação em PCR (LMA-PCR). A hibridização foi realizada de acordo com o fabricante (Agilent Technologies). Foram consideradas como regiões

diferencialmente metiladas (DMRs) fragmentos que apresentaram diferenças de metilação com  $p < 0,05$  e  $\log_2$  (fold-change  $> 1,5$  absoluto entre os grupos). Das sondas utilizadas para microarray, 9082 foram expressas acima do background apenas em blastocistos rápidos (FBL), 20670 em blastocistos lentos (SBL) e 47713 observadas em ambos. FBL apresentaram 7976 DMRs e SBL apresentam 3608 DMRs. Enquanto embriões rápidos apresentam mais hipermetilações em DMRs distribuídas ao longo do genoma, como introns, exons, promotores e elementos de repetição, embriões lentos apresentam mais metilações de diferentes densidades (Alta-FBL: 17; SBL: 35; Média-FBL: 81; SBL: 143 e Baixa-FBL: 31; SBL: 68) concentradas em ilhas CpG independente do comprimento destas (Longas-FBL: 14; SBL: 41; Intermediárias-FBL: 79; SBL: 152 e Pequenas-FBL: 36; SBL: 53). Com o uso do Ingenuity Pathway Analysis foi possível identificar 25 vias com maior diferença de metilação do DNA em FBL e SBL. Estas vias incluem dano, reparo e replicação de DNA, desordem de desenvolvimento, morfologia celular, expressão gênica, modificações pos-transcricionais, doenças metabólicas, metabolismo de lipídeos, modificações pós-traducionais e desenvolvimento embrionário (33-35 genes observados em cada via). Foram também observadas diferenças de hipermetilações em genes relacionados a pluripotência (NANOG, OCT4), controle epigenético (DNMT3A, HDAC8, MECP2) e relacionados ao desenvolvimento embrionário (EGFR, FGF8, IGFR1). É possível concluir que o perfil de metilação do DNA é diferente entre embriões de cinéticas do desenvolvimento rápido e lento, podendo influenciar no seu fenótipo e resposta ao ambiente.

Agradecimento: Fapesp (2015/03381-0) e Isabelle Duffort

**Palavras-chave:** Metilação do DNA; embriões; epigenética

SBTE 248 Biotecnologias de suporte: criopreservação, criobiologia, biologia molecular e “ômicas”

Número de submissão 1676

#### **Efeito das células do cumulus durante a vitrificação de ovócitos ovinos**

Pedro Claudino Claudino dos Santos Neto<sup>1</sup>; Marcela Vilariño<sup>1</sup>; Martina Crispo<sup>2</sup>; Alejo Menchaca<sup>1</sup>

1.Fundación Irauy, Montevideo, Uruguai; 2.Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguai.

O objetivo foi avaliar o efeito da presença ou não das células do cumulus oophorus durante a vitrificação com o método Cryotop de ovócitos ovinos sobre a fertilização e desenvolvimento *in vitro*. Complexos cumulus ovócitos foram divididos em cinco grupos experimentais: um grupo controle que não foi submetido à vitrificação (GC; N=339), dois grupos de ovócitos imaturos vitrificados com (ImCCOs; N=188) ou sem (Imaturos; N=188) presença de células do cumulus, e outros dois grupos de ovócitos maturados e vitrificados com (MatCCOs; N=190) ou sem (Maturados; N=195) presença de tais células. A retirada das células poderia favorecer a realização da vitrificação em um menor volume de solução, aumento assim as taxas de resfriamento. Prévio a vitrificação, naqueles grupos assignados se realizou o desnudamento a partir da pipetagem sucessiva e cuidadosa. A vitrificação realizou-se mediante o método Cryotop que consistiu em passar os ovócitos por uma solução de equilíbrio (SE) que era composta por 7,5% de etilenoglicol (EG) e 7,5% de dimetilsulfóxido (DMSO) agregados em uma solução de manipulação (SM; meio TCM199 Hepes com 20% de soro fetal bovino) por 10 minutos. Logo foram passados a uma solução de vitrificação com 15% EG, 15% DMSO, SM e sacarose 0,5M por 90 segundos, acondicionados no dispositivo cryotop para imediatamente serem submergidos em nitrogênio líquido. Após a vitrificação foram reaquecidos a 37°C por 60 segundos em solução de reaquecimento (SM com 1M sacarose), passados a uma segunda de solução de diluição (SM com 0,5M sacarose) durante 3 minutos sendo posteriormente mantidos nas mesmas condições de cultivo *in vitro* que o grupo controle sem vitrificar até o dia 8 do desenvolvimento embrionário. Para a fertilização *in vitro* (Dia 0) se utilizou sêmen congelado selecionado pelo método swim up com  $1 \times 10^6$  de espermatozoides em gotas de 100µl (25-30 ovócitos) em meio SOF-Fert suplementado com soro de ovelha em estro, heparina e hipotaurina e cultivados a 39°C em 5% de CO<sub>2</sub> em atmosfera umidificada. Após 22 h, os zigotos foram cultivados em gotas de meio de desenvolvimento SOFaaBSA, com 5%CO<sub>2</sub>, 5%O<sub>2</sub> e 90%N<sub>2</sub> a 39°C com atmosfera umidificada até o Dia 8. A taxa de sobrevivência (embriões clivados/ovócitos vitrificados) as 48 h após a fertilização, taxa de desenvolvimento no Dia 6 (mórulas e blastocistos no Dia 6/total ovócitos) e a taxa de blastocistos Dia 8 (blastocistos no Dia 8/total ovócitos), e suas interações foram expressos como  $MEDIA \pm SEM$  e comparados mediante ANOVA com  $P < 0,05$ . Os resultados mostram que a taxa de sobrevivência as 48 h, taxa de desenvolvimento no Dia 6 e taxa de blastocistos no Dia 8 foram superiores no grupo controle comparados aos grupos em que se utilizou a vitrificação com presença ou não das células do cumulus, tanto em ovócitos imaturos como em aqueles maturados (Controle;  $72,6 \pm 7,1$ ;  $45,2 \pm 5,1$ ;  $34,6 \pm 5,2$ ; ImCCOs;  $15,7 \pm 5,0$ ;  $8,3 \pm 2,1$ ;  $8,1 \pm 3,1$ ; Imaturo;  $6,6 \pm 2,6$ ;  $3,0 \pm 1,2$ ;  $2,9 \pm 1,9$ ; MatCCOs;  $21,2 \pm 4,9$ ;  $11,8 \pm 4,5$ ;  $7,8 \pm 3,1$ ; Maturado;  $14,2 \pm 5$ ;  $8,7 \pm 4,4$ ;  $3,1 \pm 2,2$ ;  $P < 0,05$ ), respectivamente. Quando a presença ou não das células e o estagio ovocitário (Imaturo vs. Maturado) foram avaliados como efeito principal, nenhuma diferença foi encontrada em todas variáveis determinadas,  $P = NS$ . Estes resultados mostram que a vitrificação de ovócitos afetou negativamente a taxa de clivagem e o desenvolvimento embrionário, e um efeito que não foi influenciado pela presença ou ausência de células do cumulus durante a vitrificação.

**Palavras-chave:** Vitrificação; produção *in vitro*; ovócitos ovinos

SBTE 249 Biotecnologias de suporte: criopreservação, criobiologia, biologia molecular e “ômicas”

Número de submissão 1703

**Influência do touro na cinética de desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro* e na recuperação após vitrificação por Cryotop**

Ligiane Oliveira Leme<sup>1</sup>; Margot Alves Nunes Dode<sup>2</sup>

1.UNB, Brasília, DF, Brasil; 2.Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil.

Inúmeros trabalhos mostram que o touro utilizado na FIV influencia a produção de embriões e a cinética do seu desenvolvimento. Entretanto, pouco se sabe sobre a influência do macho na resposta na qualidade dos embriões PIV. Neste estudo, objetivou-se avaliar a taxa, a velocidade de desenvolvimento, bem como a resposta à criopreservação de blastocistos oriundos da FIV com sêmen de 5 touros Nelore (aqui designados T1, T2, T3, T4, T5). Um total de 7060 ovócitos de abatedouro, distribuídos em 23 repetições, foram submetidos à MIV, inseminados com concentração de  $1 \times 10^6$  espermatozoides/mL, co-incubados por 16-18 horas e colocados em CIV por 7 dias. Foram avaliadas as taxas de clivagem (D2) e blastocistos (D6, 144-156 horas pós inseminação). Em D6, os embriões em estágio de BL (blastocisto) foram retirados do CIV e divididos em dois grupos: controle (C), não submetido à criopreservação; e vitrificado (V), que foram submetidos à vitrificação pelo método Cryotop. Os embriões C e V voltaram ao CIV após a desvitrificação e foram avaliados 4 e 24 horas após o retorno à incubação quanto à re-expansão e desenvolvimento. Os dados foram analisados pelo teste Mann-Whitney (dados paramétricos) ou Tukey (dados não paramétricos), considerando  $P < 0,05$ . A taxa de clivagem (56,8%) e de blastocisto (18,8%) foi menor para o T2 ( $n=616$ ) do que os demais touros [T1 ( $n=1832$ , 81,7% e 28,9%), T3 ( $n=1779$ , 90,7% e 33,6%), T4 ( $n=2172$ , 82,4% e 36,5%) e T5 ( $n=661$ , 81,8% e 32,2%)]. Entretanto, a velocidade de desenvolvimento foi semelhante para todos os animais. Na avaliação da criotolerância, foi observado que às 4h após o aquecimento, a taxa de embriões degenerados foi semelhante em C e V para os T1 e T2, enquanto para os demais touros os V apresentaram maior taxa de embriões degenerados do que os C. Já às 24 horas pós-desvitrificação, para T2 e T5 a taxa de degenerados foi similar entre C e V, enquanto para os demais touros os V apresentaram maior taxa de degeneração do que os C. Além disso, a percentagem de embriões que evoluíram para o estágio de BX em 24 horas foi semelhante entre os V (58,5%) e C (76,5%) para o T2 e o T5 (65,1% e 67,9%, respectivamente) e inferior para os V em relação aos C nos touros T1, T3, T4. Esses resultados sugerem que a escolha do touro, além de afetar a produção e a cinética de desenvolvimento embrionário, também afeta a resposta à criopreservação. Ainda pode-se afirmar que os touros que produzem embriões mais crio-resistentes nem sempre são os que produzem maior taxa de embriões PIV.

**Palavras-chave:** Cryotop; cinética embrionária; embrião bovino