

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE MARINGÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS LIMPAS

FÁBIO MARCELO DE QUEIROZ

SUPERESTIMULAÇÃO OVARIANA COM FSH EM DOADORAS
DA RAÇA WAGYU SOBRE A POPULAÇÃO FOLICULAR
ANTRAL E A PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

MARINGÁ
2019

FÁBIO MARCELO DE QUEIROZ

SUPERESTIMULAÇÃO OVARIANA COM FSH EM DOADORAS
DA RAÇA WAGYU SOBRE A POPULAÇÃO FOLICULAR
ANTRAL E A PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

Dissertação apresentado ao Programa de
Pós-Graduação em Tecnologias Limpas
do Centro Universitário de Maringá, como
requisito parcial para obtenção do título de
Mestre em Tecnologias Limpas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Márcia Aparecida
Andreazzi

Co-orientador: Prof. Dr. Fábio Luiz Bim
Cavalieri

MARINGÁ
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Q3s

Queiroz, Fábio Marcelo de.

Superestimulação ovariana com FSH em doadoras da raça Wagyu sobre a população folicular antral e a produção *in vitro* de embriões / Fábio Marcelo de Queiroz. – Maringá-PR, 2019.

57 f. : il. color ; 30 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Marcia Aparecida Andreazzi.

Coorientador: Prof. Dr. Fábio Luiz Bim Cavalieri.

Dissertação (mestrado) – UNICESUMAR - Centro Universitário de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Limpas, 2019.

1. Aspiração folicular. 2. Ovulação bovina. 3. Biotécnicas da reprodução. 4. Fertilização *in vitro*. I. Título.

CDD – 636.2

FÁBIO MARCELO DE QUEIROZ

SUPERESTIMULAÇÃO OVARIANA COM FSH EM DOADORAS DA RAÇA WAGYU SOBRE A POPULAÇÃO FOLICULAR ANTRAL E A PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Tecnologias Limpas do Centro Universitário de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologias Limpas pela Comissão julgadora composta pelos membros:

Prof^a. Dr^a. Márcia Aparecida Andreazzi
Orientadora / UNICESUMAR.

Prof^a. Dr^a. Isabele Picada Emanuelli
Membro Interno /UNICESUMAR.

Prof. Dr. Anthony César de Souza Castilho
Membro Externo/ UNOESTE

Maringá, 25 de fevereiro de 2019.

A minha esposa Marcela, meus filhos
e a toda minha família que, com muito carinho e apoio,
não mediram esforços para que eu chegasse
até esta etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida e por todas oportunidades que tem me proporcionado.

Ao Centro Universitário de Maringá / UNICESUMAR, por ter-me possibilitado desenvolver este trabalho e pela concessão da bolsa institucional.

Ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Limpas do Centro Universitário de Maringá e todos os seus professores, pela oportunidade e ensinamentos proporcionados.

A prof. Dra. Marcia Aparecida Andreazzi, pela orientação dada, por toda ajuda durante o período do mestrado, por ter sido como uma mãe, sendo paciente e conselheira.

Ao prof. Dr. Fábio Luiz Bim Cavalieri, pela co-orientação dada, pela disponibilidade, consideração e ensinamento ao longo desta caminhada.

A minha família por sempre me incentivar, em especial a minha esposa Marcela por ser minha base e estar ao meu lado nos momentos mais difíceis.

Aos Médicos Veterinários Dyórgenes Mathaus e Pedro Baeza, por todos os ensinamentos e pela parceria.

Ao prof. Msc. Antônio Hugo Colombo, pela paciência, pelo respeito e por tudo o que você ensinou durante todo o tempo que eu acompanhei você.

Aos colaboradores da Fazenda Unicesumar/ BIOTEC: Dani, Lari, Fabiano, Luis, Sr. Ciço, Robinho, Tereza, Leila e os demais, pelas contribuições sempre que necessárias, pela amizade e pelos cafezinhos de todos os dias.

E a todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram, a minha gratidão.

"Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida.
Esses são os imprescindíveis."

Bertolt Brecht

Superestimulação ovariana com FSH em doadoras da raça Wagyu sobre a população folicular antral e a produção *in vitro* de embriões

RESUMO

A pecuária brasileira tem evoluído muito nos últimos anos, fato que posiciona o Brasil com o maior rebanho bovino comercial do mundo e segundo maior produtor, exportador e consumidor de carne bovina e o evidencia como país na produção de alimentos mundial. Por isso, pesquisadores desta cadeia produtiva vêm buscando tecnologias relacionadas a melhoria do manejo, sanidade, nutrição e reprodução, buscando aumentar a produção e, ao mesmo tempo tornar a agropecuária mais sustentável nos aspectos econômicos e ambientais. Na esfera reprodutiva, a superovulação é uma etapa importante no programa de transferência de embriões, pois estimula o desenvolvimento de um maior número de folículos, resultando em mais embriões viáveis e melhores taxas de gestação. Contudo, a taxa de desenvolvimento de blastocisto em oócitos colhidos é reduzida, por isso, a comunidade científica tem buscado aprimorar esta técnica por meio da associação entre superovulação e um período de *coasting*. Porém, pesquisas mostram resultados diferentes entre os *bos taurus* e *indicus*. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi investigar o efeito da superestimulação ovariana com FSH, buscando melhorar a competência dos oócitos de doadoras bovinas da raça Wagyu. Foram utilizadas 12 vacas da raça Wagyu, com idade entre 12 a 24 meses distribuídas aleatoriamente, em dois grupos, o Grupo 1: animais não estimulados com FSH e Grupo 2: animais estimulados com FSH. Foram avaliadas as variáveis foliculares, oocitárias e a produção embrionária. Com base nos resultados obtidos neste estudo, conclui-se que a superovulação associada ao *coasting* de FSH, melhorou a quantidade de folículos médios e grandes, contudo, a taxa de recuperação de oócitos e a taxa de blastocisto foi baixa. Desta forma, não se recomenda a superestimulação com FSH como estratégia reprodutiva para fêmeas bovinas doadoras de oócitos da raça Wagyu.

Palavras-chave: aspiração folicular; biotécnicas da reprodução; fertilização *in vitro*; superestimulação ovariana.

Ovarian overstimulation with FSH in Wagyu breeders on the antral follicular population and the in vitro production of embryos

ABSTRACT

Brazilian livestock farming has evolved a lot in recent years, a fact that positions Brazil as the largest commercial cattle herd in the world and second largest producer, exporter and consumer of beef and shows it as a country in the world food production. For this reason, researchers in this production chain have been searching for technologies related to the improvement of management, sanitation, nutrition and reproduction, seeking to increase production and, at the same time, make agriculture more sustainable in economic and environmental aspects. In the reproductive field, superovulation is an important step in the embryo transfer program, as it stimulates the development of a larger number of follicles, resulting in more viable embryos and better gestation rates. However, the rate of development of blastocyst in oocytes harvested is reduced, so the scientific community has sought to improve this technique through the association between superovulation and a period of coasting. However, research shows different results between *bos taurus* and *indicus*. Thus, the objective of the present study was to investigate the effect of ovarian super-stimulation with FSH, aiming to improve the competence of oocytes from Wagyu breeders. Twelve Wagyu cows aged 12 to 24 months were randomly assigned to two groups: Group 1: animals not stimulated with FSH and Group 2: animals stimulated with FSH. The follicular, oocyte and embryonic variables were evaluated. Based on the results obtained in this study, it was concluded that superovulation associated with FSH coasting improved the mean and large follicles, however, the oocyte recovery rate and the blastocyst rate were low. Thus, FSH overstimulation is not recommended as a reproductive strategy for Wagyu oocyte donor bovine females.

Keywords: follicular aspiration; reproductive biotechnology; in vitro fertilization; ovarian overstimulation.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS.....	15
2.1. Objetivo geral.....	15
3.2. Objetivos específicos.....	15
3. REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1. Pecuária e desenvolvimento sustentável	16
3.2. Fisiologia reprodutiva da fêmea bovina	18
3.3. Biotecnologias da reprodução	19
3.4. Superovulação e <i>coasting</i>	22
3.5. Bovinos da raça Wagyu	26
4. REFERÊNCIAS	27
5. ARTIGO: Protocolo de superovulação associada ao <i>coasting</i> de FSH em doadoras bovinas	34
Resumo	34
Abstract	35
Introdução	36
Materiais e métodos	38
Resultados e discussão	43
Conclusão	48
Referências	49
6. NORMAS DO ARTIGO	53
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	56
ANEXO	57

LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1. Fases do crescimento folicular: recrutamento, dependência de FSH; 19
Seleção e dominância, dependente de LH; Ovulação ou atresia, na
dependência da presença o não do pico pré-ovulatório de LH.....

LISTA DE TABELAS

Página

- Tabela 1. Efeito da superovulação com FSH sobre o número de folículos, eficiência da *ovum pick-up* (OPU) e da produção *in vitro* de embriões em doadoras Wagyu..... 44

1. INTRODUÇÃO

Os primeiros bovinos chegaram ao Brasil em 1533, em função do ciclo das grandes navegações (SILVA et al., 2012), e a introdução e propagação desta espécie se relacionou ao crescimento populacional. Atualmente, o Brasil é detentor do maior rebanho comercial de gado do mundo e ocupa o segundo lugar como maior produtor e exportador de carne bovina (ABIEC, 2018).

A cadeia produtiva do bovino de corte brasileiro tem como característica a diversificação na produção animal, sendo que, grande parte de criação é extensiva com padrões ineficientes de gestão, baixo investimento tecnológico e falta de padronização dos animais, por outro lado, a criação intensiva apresenta maior investimento tecnológico, melhor gestão e padronização dos animais (CARVALHO; ZEN, 2017).

O Brasil conta com um rebanho de, cerca de, 72 milhões de fêmeas bovinas em reprodução, que apresentam, em média, uma taxa de nascimento de 70% (ANUALPEC, 2016), dessa forma, verifica-se que 30% do rebanho estão sem produzir, pelo menos, um bezerro ao ano. Esse fato, associado às grandes extensões de terra disponíveis para a pecuária, evidencia o potencial para ocupação da terra e aumento da lotação de animais e, assim, aumentar a produção e tornar a cadeia produtiva bovina mais sustentável.

O termo sustentabilidade está presente em várias áreas, inclusive no setor agropecuário. A sustentabilidade é uma temática importante e vem sendo amplamente discutida em diferentes esferas, em função da importância que representa para o desenvolvimento das nações (BARBOSA, 2008). Brundtland (1987) definiu desenvolvimento sustentável como as formas de progresso que atendam às necessidades do presente sem comprometer a capacidade de as gerações futuras satisfazerem as suas necessidades.

Os componentes fundamentais para o desenvolvimento sustentável consistem em crescimento econômico, proteção ao meio ambiente e igualdade social. Por isso, várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas para melhorar os índices de desempenho dos rebanhos, visando tornar a agropecuária mais sustentável nos aspectos econômicos, sociais e ambientais (COLOMBO et al., 2017; BOTELHO, 2018; BURALI, 2018).

Neste sentido, atualmente, a bovinocultura brasileira emprega várias técnicas de manejo para aumentar os índices produtivos e, consequentemente, o rendimento financeiro. Neste cenário, profissionais pesquisam sobre seleção de rebanhos melhorados geneticamente, melhorias na sanidade e nutrição e também sobre o uso de biotécnicas da

reprodução animal, como protocolos de aspiração folicular (OPU), fertilização *in vitro* (FIV) e inseminação artificial em tempo fixo (IATF) (CARVALHO; ZEN, 2017).

Neves, Miranda e Tortorella (2010) afirmaram que a reprodução animal constitui-se num dos fatores de maior importância que afeta diretamente a eficiência e a rentabilidade dos sistemas produtivos e por isso, biotecnologias da reprodução animal estão sendo desenvolvidas e melhoradas com a finalidade de aumentar a eficiência reprodutiva e potencializar a produção de animais geneticamente superiores, fazendo com que se tenha o maior número de filhos em um curto período de tempo. Essas ações ratificam o emprego das biotécnicas como ferramenta na busca pelo desenvolvimento sustentável.

Com o advento das biotecnologias da reprodução, como a inseminação artificial (IA), os produtores brasileiros puderam utilizar touros com alto valor genético em seu plantel, porém somente nas décadas de 1970 e 1980, com o desenvolvimento dos esquemas de superovulação (SOV) e transferência de embriões (TE), a bovinocultura pode aumentar o número de bezerros oriundos de fêmeas de alto padrão genético (RODRIGUES, 2001; HASLER, 2014).

A SOV é um dos passos mais importantes no programa de TE em bovinos e tem como objetivo estimular, por meio da administração de hormônios, o desenvolvimento de múltiplos folículos até o estágio de ovulação (TIRAPPELLI et al., 2014) e resulta em maior número de embriões viáveis e melhores taxas de gestação (KELLY et al., 1997). Contudo, a taxa de desenvolvimento de blastocisto por oócitos colhidos é reduzida, por isso, a comunidade científica tem buscado aprimorar esta técnica por meio da associação entre superovulação e um período de *coasting* (NIVET et al., 2012; VIEIRA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2016).

O *coasting* é um período de ausência de FSH que simula as alterações fisiológicas naturais que ocorrem imediatamente antes ovulação (NIVET et al., 2012). Vários trabalhos (BLONDIN et al., 2012; NIVET et al., 2012; LABRECQUE et al., 2013; VIEIRA et al., 2014; SOMFAI et al., 2015) têm mostrado que seu emprego melhora qualidade na taxa de blastocistos, a competência oocitária, a taxa de folículos recuperados e a porcentagem de oócitos viáveis. Todavia, os resultados obtidos com o emprego dessa associação são diferentes entre animais *Bos indicus* quando comparado aos animais *Bos taurus* (SARTORI et al., 2016) evidenciando a necessidade de mais pesquisas a fim de elucidar a dimensão destas diferenças, inclusive entre raças, dentre elas a raça Wagyu, pelo aumento crescente no mercado nacional, cujos dados na literatura científicas são escassos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar a eficiência da superestimulação ovariana associada ao *coasting* de FSH em fêmeas bovinas doadoras de óócitos da raça Wagyu sobre a dinâmica folicular e sobre a produção *in vitro* de embriões.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a dinâmica folicular por aspiração folicular nos animais avaliados;
- Identificar, quantificar e classificar os ovócitos coletados;
- Executar a técnica de fertilização *in vitro* com os ovócitos viáveis obtidos;
- Avaliar as taxas de clivagem e de blastocisto;
- Discutir a eficiência da técnica como ferramenta capaz de contribuir para o aumento da taxa de lotação, favorecendo a sustentabilidade econômica e ambiental da cadeia produtiva bovina.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Pecuária e desenvolvimento sustentável

O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo e é o segundo maior produtor e consumidor de carne bovina (37,5 kg/habitante/ano), sendo que a região Centro-Oeste concentra 34,4% do efetivo nacional e a região sul regiões sul, 12,59% (ABIEC, 2018). Neste cenário, uma raça que tem apresentado destaque em função da qualidade da carne é a raça Wagyu, com um rebanho brasileiro de 3,5 mil cabeças.

Desta forma, observa-se que a pecuária brasileira tem evoluído e, principalmente em função da modernização dos sistemas de produção, pela organização da cadeia e pelos avanços nas biotecnologias da reprodução, refletindo na quantidade e qualidade de carne produzida (GOMES, 2017).

O Brasil tem se tornado referência mundial em produção de carne bovina com elevados índices de produtividade no campo, sendo que um dos principais fatores que influencia esse crescimento é a utilização de biotecnologias na genética, manejo de pastagem adequado e sanidade animal, transformando a pecuária nacional em uma atividade desenvolvida e promissora (CARVALHO; ZEN, 2010). De fato, as áreas de pastagens estão diminuindo e a produtividade animal está aumentando graças a intensificação da pecuária, boas práticas de manejo e melhoramento genético (GRPS, 2017).

Contudo, apesar dos altos índices de crescimento do setor, é primordial que a pecuária brasileira se atente às questões relacionadas à produção sustentável, buscando minimizar os impactos gerados pela cadeia produtiva ao meio ambiente. A mídia mundial tem destacado a necessidade em produzir animais de forma sustentável, reduzindo o desmatamento de florestas nativas, mantendo o equilíbrio ecológico e aumentando a taxa de lotação dos animais por hectare (LIMA FILHO et al., 2017).

O relatório “Nosso futuro comum” define desenvolvimento sustentável como um processo que atende as necessidades dos dias atuais sem comprometer a sobrevivência das gerações futuras (WCED, 1987). Ressalta-se que a preocupação com as formas de produção de alimentos, sobretudo a pecuária, vai ao encontro dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS), visto que, dentre os 17 objetivos, os objetivos 2 e 15 se relacionam diretamente aos temas que devem ser considerados na busca por uma pecuária sustentável (UNESCO, 2015).

Entre as metas listadas no ODS 2, destaca-se acabar com a fome e garantir o acesso, de todas as pessoas, a alimentos seguros, nutritivos e suficientes durante todo o ano; dobrar a produtividade agrícola; garantir sistemas sustentáveis de produção de alimentos e implementar práticas agrícolas resilientes, que aumentem a produtividade e a produção, que ajudem a manter os ecossistemas, que fortaleçam a capacidade de adaptação às mudanças climáticas, e que melhorem progressivamente a qualidade da terra e do solo e, entre as metas do ODS 15 observa-se proteger, recuperar e promover o uso sustentável dos ecossistemas terrestres, gerir de forma sustentável as florestas, combater a desertificação, deter e reverter a degradação da terra e deter a perda de biodiversidade (UNESCO, 2015).

Há tempos a bovinocultura é alvo de questionamentos relacionados às questões ambientais e de sustentabilidade, baseados na ocupação de grandes áreas territoriais e na liberação do gás metano pelos animais, apesar de que, Soussana, Tallec e Blanfort (2010) apontaram que em criações de bovinos alimentados com pastagens manejadas corretamente, as emissões de metano são neutralizadas pelas próprias forrageiras.

Contudo, o Brasil possui capacidade para suprir a demanda de alimentos sem aumentar as áreas de desmatamento, por meio da recuperação de pastagens degradadas e pelo aumento da capacidade de unidade animal por hectare (SILVA et al., 2016). Uma das ferramentas para o aumento nas taxas de lotação é o melhoramento genético, visto que reduz o ciclo de produção, maximiza o potencial produtivo e reprodutivo do rebanho, resultando no aumento da quantidade e qualidade de produtos cárneos brasileiros (MOREIRA et al., 2015), fatos que somados, resultam em maior sustentabilidade da cadeia produtiva.

Considerando a importância da pecuária na economia brasileira, destaca-se também como ferramenta fundamental na garantia da crescente e necessária expansão da produção dos rebanhos brasileiros, sobretudo de forma sustentável, o emprego das biotecnologias da reprodução. A aplicação de biotécnicas como a IA, IATF, TE e a Produção *in vitro* de Embriões (PIV), contribui com a produtividade e sustentabilidade na pecuária bovina, ao possibilitar, de maneira mais efetiva, a exploração de animais de valor genético superior (PELLEGRINO et al., 2016).

De fato, baseados na atual e necessária preocupação de vários segmentos produtivos com o desenvolvimento sustentável e, baseado na variedade de técnicas disponíveis atualmente, verifica-se que o emprego das biotecnologias da reprodução pode contribuir com a sustentabilidade e expansão da produção animal, tanto em nível nacional quanto internacional.

Um exemplo a ser considerado é o fato de que as biotécnicas permitem a exploração de animais de alto valor genético (PELLEGRINO et al., 2016), contudo, outras pesquisas tem sido conduzidas atinentes à preocupação econômica e ambiental do uso das biotécnicas da reprodução (COLOMBO et al., 2017; BOTELHO, 2018; BURALLI, 2018).

Em um estudo sobre a avaliação de biotécnicas da reprodução sob o foco ambiental, Colombo et al. (2017) analisaram o efeito das duas principais biotecnologias da reprodução animal, a IATF e TETF sobre a taxa de gestação, taxa de concepção e sexagem fetal em bovinos e comprovaram que, apesar das menores taxas de concepção e de gestação alcançadas com o emprego da TETF, esta biotécnica apresenta mérito sob o ponto de vista da sustentabilidade ambiental, visto que, permite a produção de descendentes de melhor qualidade genética e apresenta maiores resultados de gestação de sexados de machos, que, sabidamente, levam a uma maior produção de carne por hectare.

Botelho (2018) estudou sobre a busca por um manejo sustentável na indução da ciclicidade em receptoras de embriões equinos. Como estratégia hormonal para antecipação da estação de monta, a autora utilizou implantes intravaginais de progesterona em éguas com diâmetros foliculares maiores e menores que 20 mm e concluiu que o uso dos dispositivos de progesterona antecipou a primeira ovulação da estação de monta, mostrando que essa técnica pode tornar o manejo de fêmeas equinas mais eficiente e produtivo.

Com o intuito de estudar a utilização estratégica de dispositivo intravaginal de progesterona (P4) já utilizado (multiuso), na suplementação de receptoras de embriões no diestro, Buralli (2018) observou que o uso dos implantes reutilizáveis permitiu concentrar os protocolos de TETF, além de contribuir com a redução do descarte de resíduos, o que tornou esta biotecnologia da reprodução mais operacional, lucrativa e sustentável.

3.2. Fisiologia reprodutiva da fêmea bovina

Para se alcançar o sucesso na utilização das biotecnologias reprodutivas é fundamental conhecer a fisiologia reprodutiva dos machos e das fêmeas, permitindo observar todas as fases reprodutivas e possibilitando a elaboração dos protocolos de controle do ciclo estral, sendo utilizados na sincronização da ovulação ou no momento ideal para inseminação, objetivando diminuir os gastos no manejo reprodutivo (LIMA, 2017).

A vaca é um animal poliéstrico não estacional, com ciclo estral com duração de, em média, 21 dias e sua regulação é dada pela interação de hormônios secretados pela hipófise, hipotálamo, útero e ovários, sendo dividido em duas fases, a fase de crescimento folicular e fase lútea (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

A fase folicular ou estrogênica compreende o pró-estro, momento em que se tem a maturação folicular e pode durar até 3 dias, e o estro, que é marcado pela manifestação do cio, tendo, em média, 15 horas de duração. Já a fase luteínica ou progesterônica envolve o metaestro, marcado pela ovulação e formação do corpo lúteo e que dura de 3 a 4 dias, e o diestro, que é caracterizado pela atividade do corpo lúteo e secreção de progesterona (P4), finalizando com a regressão do corpo lúteo (CL) (OLIVEIRA et al., 2011).

O ciclo estral de vacas adultas ocorre por meio de ondas foliculares, denominadas onda 1 (onda periovulatória), onda 2 e onda 3, e cada onda está associada a um pico de Hormônio Folículo Estimulante (FSH) (MELLO et al., 2014).

Durante o ciclo estral de duas ondas foliculares, a onda 1 é anovulatória e a onda 2 é ovulatória, durante o ciclo estral de três ondas foliculares, as ondas 1 e 2 são anovulatórias e a onda 3 é ovulatória (GINTHER, 2018).

A emergência da primeira onda folicular ocorre no dia da ovulação, considerado o dia 0, independentemente do número de ondas durante todo o ciclo estral. A emergência da segunda onda ocorre no 9º ou 10º dia em animais com ciclos de duas ondas, e no 8º ou 9º dia em animais com ciclos de três ondas. Em ciclos de três ondas, a terceira onda emerge no 15º ou 16º dia (AERTS; BOLS, 2010). Essas ondas são divididas em quatro fases: emergência, seleção, dominância e atresia ou ovulação (ADAMS et al., 2008).

Assim, o ciclo estral de 21 dias nos bovinos existe somente como uma média entre ciclos de duas e três ondas (ADAMS et al., 2008), variando entre as subespécies, sendo duas a três ondas em fêmeas *Bos taurus* e até quatro ondas foliculares em um ciclo estral em fêmeas *Bos indicus* (MELLO et al., 2014). Ademais, pesquisas sugerem que oócitos oriundos de ovulações de terceira onda são mais férteis do que aqueles oriundos de ovulações de segunda onda, pois estes últimos são maiores e mais velhos (TOWNSON et al., 2002).

A emergência ou recrutamento da onda folicular é causada pela secreção do FSH pela hipófise, desencadeando o recrutamento de mais de vinte folículos antrais, com diâmetro médio de 3 mm para cada onda folicular, e perdura por, cerca de 3 dias (GREGORY et al., 2009; MELLO et al., 2014). O aumento contínuo do nível de FSH permite com que o folículo se desenvolva e sintetize estradiol (MELLO et al., 2014).

A seleção folicular refere-se à fase em que a concentração de FSH atinge o pico máximo fazendo com que o folículo selecionado cresça e exerça a dominância sobre os demais folículos da onda folicular, inibindo o crescimento e o recrutamento de novos folículos (MELLO et al., 2014). Após o término da fase de seleção e dominância folicular, o folículo dominante pode seguir por dois caminhos diferentes, atresia junto com os folículos subordinados por falta do pico pré-ovulatório de Hormônio Luteinizante (LH) ou se o folículo dominante for da segunda ou terceira onda folicular, ele poderá ovular (GREGORY et al., 2009) (Figura 1).

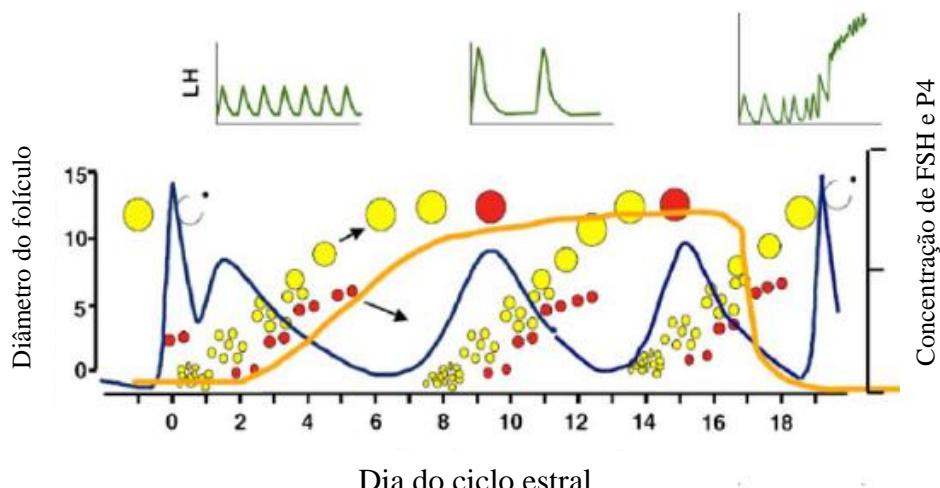


Figura 1. Fases do crescimento folicular: recrutamento, dependência de FSH; seleção e dominância, dependente de LH; ovulação ou atresia, na dependência da presença o não do pico pré-ovulatório de LH.

Fonte: Forde et al. (2011).

3.3. Biotecnologias da reprodução e sustentabilidade

A necessidade de aumentar a produção de alimentos com menor custo de produção, diminuindo os impactos ambientais fez com que as biotecnologias fossem utilizadas na agricultura e pecuária. Na pecuária, as biotecnologias vêm sendo utilizadas na nutrição, saúde animal, erradicação de doenças, aceleração da seleção genética e controle da reprodução (GUSMAO; SILVA; MEDEIROS, 2017).

O surgimento e desenvolvimento das biotecnologias reprodutivas foi impulsionado pelo ganho econômico decorrente do uso mais amplo de germoplasma superior (MOORE; THATCHER, 2006) e, em sua evolução, à medida que novas descobertas emergiram, novas perspectivas e aplicações foram propostas, testadas, refinadas e colocadas em prática (BERTOLINI; BERTOLINI, 2009).

Porém, para se alcançar o máximo proveito dos benefícios das tecnologias de reprodução assistida, deve-se ter ampla compreensão dos complexos mecanismos reprodutivos de machos e fêmeas, além de um rígido controle sobre o manejo geral e nutricional empregado e a saúde e genética do rebanho (BERTOLINI; BERTOLINI, 2009).

Ao longo das últimas décadas, as técnicas de reprodução animal estão sendo utilizadas para aumentar a produção de espécies de animais domésticos, e foram divididas em quatro gerações: a 1º geração compreende a IA e a criopreservação de gametas e embriões; a 2º geração inclui a SOV, a TE e a ultrassonografia (US); a 3º geração abrange a sexagem espermática e embrionária, aspiração folicular *in vivo* (Ovum pick up - OPU) e FIV e na 4º geração encontra-se a clonagem de embriões por transferência nuclear de células somáticas ou embrionárias, transgenia e biologia de células-tronco (BERTOLINI; BERTOLINI, 2009).

Dentre todas estas técnicas, as que mais se destacam são FIV e a produção *in vitro* de embriões (PIVE) que tem permitido a disseminação de embriões de alta qualidade, desempenhando um papel importante no melhoramento genético dos rebanhos (BLONDIN et al., 2012; VIEIRA, 2012; GUSMAO; SILVA; MEDEIROS, 2017).

A IA foi a primeira biotecnologia reprodutiva aplicada com sucesso no início do século XX e permite que os machos geneticamente superiores produzam mais descendentes do que seria possível por meio do acasalamento convencional. Já entre a década de 1930 e 1940 a maior descoberta foi a criopreservação de espermatozoides com glicerol e, mais recentemente, a transferência de embriões, que envolve a recuperação não-cirúrgica de embriões pré-implantados de uma fêmea e posterior transferência para fêmeas receptoras, permitindo que fêmeas geneticamente superiores produzam um maior número de descendentes (GODKE; SANSINENA; YOUNGS, 2014; MOORE; HASLER, 2017).

Com o advento de procedimento guiado por ultrassom para recuperação de oócitos de fêmeas vivas, juntamente com os avanços em *in vitro*, a maturação de oócitos, fertilização *in vitro* e cultivo *in vitro* de embriões, estão crescendo rapidamente e tem trazido resultados positivos (GODKE; SANSINENA; YOUNGS, 2014).

A produção *in vivo* e *in vitro* foram apontados como as biotecnologias mais notáveis em bovinos devido aos ganhos genéticos e produtivos nos rebanhos. Estas biotecnologias reprodutivas aliadas com programas de melhoramento genético surgiram como uma ferramenta estratégica para impulsionar a produção animal, resultando na

seleção genética, redução do intervalo entre gerações e melhoria na produtividade do rebanho (BLONDIN et al., 2012).

A PIVE é uma técnica em expansão que oferece amplas aplicações em escala comercial. Entretanto, existem desafios a serem superados, como a obtenção de oócitos capazes de completar a maturação, a fertilização bem sucedida, o alcance do estágio de blastocisto e o sucesso na transferência de embrião viável que resulte em uma progênie saudável (BLONDIN et al., 2012).

A implantação bem sucedida de um programa de PIVE depende de diversos fatores, como a genética do animal, pressão do vácuo durante a aspiração folicular, tipo de agulha durante a OPU e o número de folículos presentes (OLIVEIRA et al., 2016).

Com o decorrer dos anos a aspiração folicular foi evoluindo, uma vez que a técnica era desenvolvida em ovários de animais abatidos em frigoríficos, trazendo resultados insatisfatórios mas, com o desenvolvimento da aspiração folicular guiada por ultrassom a qualidade e a quantidade dos oócitos aumentaram, graças à utilização dos folículos que estavam envolvidos na dinâmica folicular (BONI, 2012).

De fato, o conhecimento da dinâmica folicular, através do uso da ultra-sonografia em tempo real, e o desenvolvimento dos meios que permitem controlar a onda folicular melhoram a utilização das biotecnologias da reprodução, como a IATF, a TE, a PIVE e os índices reprodutivos (BÓ, 2014).

3.4. Superovulação e *coasting*

A SOV é um dos passos fundamentais no programa de TE em bovinos e tem como objetivo estimular, por meio da administração de hormônios, o desenvolvimento de um maior número de folículos até o estágio no qual possam ovular (TIRAPELLI et al., 2014) resultando em um grande número de embriões viáveis e, consequentemente, melhores taxas de gestação após a transferência (KELLY et al., 1997).

Os protocolos de superovulação evoluíram muito nos últimos anos. O desenvolvimento de hormônios comerciais sintéticos da hipófise e prostaglandina na década de 1970 e, hormônios da hipófise parcialmente purificados e os dispositivos de progesterona nas décadas de 1980 e 1990, proporcionaram o desenvolvimento de diversos protocolos (BÓ; MAPLETOFT, 2014).

O sucesso da técnica de OPU-PIV é dependente do tamanho da população de folículos antrais e de diferentes fatores que influenciam, direta ou indiretamente, a eficácia da maturação, fertilização e cultura embrionária (SILVA et al., 2017).

O tamanho do folículo antral aspirado tem uma grande relevância, uma vez que a competência do oócito continua a aumentar à medida que o tamanho do folículo cresce e se aproxima da ovulação. Portanto, o diâmetro do folículo ovariano no momento da sessão de OPU é um dos critérios mais importantes usados para melhorar a eficácia dos sistemas de PIV (SILVA et al., 2017).

Os protocolos de superovulação e aspiração folicular em bovinos apresentam melhores resultados em animais *Bos indicus*, pois apresentam maior número de folículos antrais e, consequentemente, maior número de oóцитos recuperados, porcentagem de oóцитos viáveis, número e taxa de blastocistos quando comparado aos animais *Bos taurus* (SARTORI et al., 2016; SILVA et al., 2017).

Os principais hormônios empregados nos protocolos de superovulação são o Hormônio Folículo Estimulante (FSH) e a Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG) e, em menor escala, o Hormônio da Menopausa Humana (hMG) (GONÇALVES et al., 2011). Esses hormônios promovem o desenvolvimento e o crescimento dos folículos em codominância, sem que haja formação de apenas um folículo dominante, diminuindo o número de folículos que entrariam no processo de atresia (TIRAPPELLI et al., 2014).

Ongaratto et al. (2015) trabalharam com animais da raça Brangus e Angus e verificaram que a utilização de Benzoato de estradiol (BE) e progesterona (P4) para sincronizar a onda folicular, o uso de prostaglandina F2 α para evitar a presença de corpo lúteo (CL) e a superovulação com FSH melhoraram o número de COCs recuperados por OPU.

Ogata et al. (2016) testaram a eficiência da PIV em vacas Holandesas em início de lactação, administrando GnRH 48 horas antes da aspiração folicular (Protocolo Ovsynch), a fim de verificar se a utilização de gonadotrofinas aumentariam o tamanho dos folículos que poderiam ser selecionados no momento da OPU por operadores sem experiência e assim, aumentar a viabilidade dos folículos e a taxa de blastócitos. Os pesquisadores observaram maiores quantidades de COCs, melhores taxas de embriões e taxa de gestação, concluindo que esse método, combinado com a PIV, é uma ótima opção para indústria de embriões leiteiros.

Baruselli et al. (2012) conduziram experimentos na Argentina, utilizando doadoras Brangus e Angus, e avaliaram o efeito de diferentes tratamentos para sincronização de

onda folicular, superestimulação no número de oócitos e sua competência para se desenvolverem em blastocistos *in vitro*. Os autores apontaram que a PIVE melhorou quando a OPU foi realizada após a sincronização da emergência da onda folicular utilizando o tratamento com implante de P4 + E2 ou a ablação folicular. Outro resultado interessante reportado pelos pesquisadores foi o aumento da PIVE, após a utilização de quatro doses iguais duas vezes ao dia de FSH, iniciadas no momento da emergência da onda folicular e com a realização da OPU 24 horas após o último tratamento com FSH.

Somfai et al. (2015) afirmaram que a estimulação folicular pelo FSH melhora a competência de desenvolvimento de oócitos bovinos obtidos por OPU. Entretanto, os mesmos autores reportaram que os mecanismos exatos que acontecem nos oócitos afetados por esse tratamento são incertos e por isso, compararam oócitos maturados *in vitro*, obtidos no estágio imaturo de vacas por OPU com e sem estimulação com FSH, com aqueles obtidos por superestimulação e maturação *in vivo*, em termos de morfologia do citoesqueleto e padrões bioquímicos, após a fertilização *in vitro*. Os autores observaram maior tamanho dos fusos da metáfase nos oócitos obtidos pela OPU estimulada, fato que contribuiu potencialmente com a alta competência no desenvolvimento dos oócitos.

Bó, Rogan, Mapletoft (2018) testaram protocolos de superovulação em bovinos com doses únicas de FSH associadas com ácido hialurônico (0,5%, 1% e 2%) e observaram resultados positivos para esta associação. Estes resultados foram atribuídos à obtenção de níveis circulantes de FSH semelhantes aos níveis endógenos antes da emergência da onda folicular.

Protocolos de superovulação com FSH aumentam o número de folículos grandes e saudáveis em fase de crescimento, entretanto, a taxa de desenvolvimento de blastocisto em oócitos colhidos é reduzida, sendo sugerido um protocolo associado combinando a superovulação com um período de *coasting* (BLONDIN et al., 2002).

Coasting é uma técnica amplamente empregada tanto na reprodução humana quanto animal. O *coasting* é um período de ausência de FSH que simula as alterações fisiológicas naturais que ocorrem imediatamente antes ovulação, sendo frequentemente usado para prevenir a síndrome de hiperestimulação ovariana (OHSS) em mulheres (DELVIGNE; ROZENBERG, 2002).

Em animais, sobretudo em bovinos, o *coasting* é empregado para manipular o crescimento folicular. Durocher et al. (2006) apontou, em um estudo retrospectivo de 5 anos, que teve como objetivo determinar o protocolo de estimulação mais eficaz na produção de complexos cumulus-oócitos competentes, que vários tratamentos

superestimulatórios, envolvendo tipos diferentes de FSH em associação com diversos períodos de *coasting* não afetou a resposta ovariana ou as taxas de desenvolvimento embrionário. Contudo, trabalhos mais atuais tem mostrado que esta manipulação resulta em melhor competência oocitária (NIVET et al., 2012) e melhoria significativa nas taxas de blastocisto e de gestação (LABRECQUE et al., 2013).

Nivet et al. (2012) relataram que, em novilhas e vacas lactantes Holandesas, um ponto de melhoria na eficácia da PIV após a superestimulação está associado ao *coasting*.

Por isso, para sustentar a onda folicular, múltiplas injeções de FSH ao longo de 2 a 4 dias são administradas no animal e, ao final das injeções, a estimulação folicular é reduzida ou interrompida por 33 ou 48 horas, criando um período de *coasting*, que é o tempo decorrido entre a última aplicação de FSH e a OPU, que imita a dominância precoce *in vivo* (BLONDIN et al., 2002).

Vieira et al. (2014), avaliaram a eficácia da superestimulação com FSH suíno (p-FSH, Folltropin) associado a um período de *coasting* de 40 horas, em doadoras de oócitos holandesas, lactantes e não-lactantes, submetidas a um programa OPU e PIV, e observaram um aumento na eficiência da PIV e, nas doadoras não-lactantes observaram maior porcentagem de desenvolvimento de blastocistos *in vitro* e maior número de embriões por sessão de OPU. Labrecque et al. (2013) avaliaram diferentes tempos de *coasting* (20, 44, 68 e 92 horas) e obtiveram oócitos de qualidades distintas em cada período, mostrando que o tempo de *coasting* afeta diretamente a qualidade dos oócitos coletados.

Alguns estudos (BLONDIN et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2016) avaliaram o efeito do uso de FSH com subsequente *coasting* sobre a qualidade dos oócitos e produção de blastocisto e verificaram um efeito significativo no potencial de desenvolvimento do complexo cumulus-oóцитico (COC), levando os folículos as fases de pseudodominação ou atresia precoce fornecendo ao COC um ambiente ideal para adquirir a competência de desenvolvimento, resultando em mais folículos com sinais distintos de atresia folicular. Os autores afirmaram que esta associação resulta na eliminação dos folículos pequenos e aumenta a quantidade dos folículos médios e grandes, facilitando a remoção dos mesmos através da aspiração transvaginal, aumentando os níveis de FSH endógeno.

Segundo Blondin et al. (2012), a estratégia do *coasting* é uma ferramenta útil para melhorar a competência do oóцитico e produzir um maior número de oócitos competentes e homogêneos, uma vez que o período de *coasting* entre a última aplicação de FSH e o pico de LH é favorável para melhorar o desenvolvimento do oóцитico. Contudo, os mesmos autores reforçam que se o período de *coasting* for menor que o estipulado pela literatura, os

folículos não sofrerão diferenciação e se a retirada do FSH for feita por muito tempo, a diferenciação estará muito avançada, resultando em atresia devido ao contexto não ovulatório do corpo lúteo.

Queiróz et al. (2018) avaliaram a eficiência da superovulação folicular com FSH associada ao *coasting* em 16 fêmeas bovinas doadoras da raça Nelore e concluíram que o este protocolo não incrementou o número e a qualidade de CCOs totais e viáveis, as taxas de blastocisto e de eclosão.

3.5. Raça Wagyu

A raça Wagyu ou gado japonês chegou ao Japão vinda da Península Coreana no século II com o intuito de se obter sinergia entre o gado e a agricultura, especialmente no cultivo de arroz. Contudo, após a Segunda Guerra Mundial, os agricultores começaram a substituir os animais de tração por maquinários agrícolas. Desta forma, a criação de animais Wagyu se tornou específica para a produção de carne (SMITH, 2015; GOTOH et al., 2018).

No Japão, o manejo desses animais consiste no emprego de todos os cuidados básicos exigidos em sistemas intensivos, contudo, também são praticadas técnicas diferenciadas, como o uso de massagens e a adição de cerveja e até saquê em suas dietas, visando à qualidade da carne (GOTOH et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2017). De fato, a raça Wagyu destaca-se por apresentar um alto nível de marmoreio intramuscular, o que torna a carne macia, suculenta, saborosa, sendo mundialmente conhecida e com grande destaque na gastronomia internacional (GOTOH et al., 2018).

Segundo Bethlem (2014), os primeiros animais da raça Wagyu chegaram ao Brasil no ano de 1992 e desde então vem aumentando o número de criadores e a participação da carne no mercado gourmet. Segundo o autor, estima-se que há mais de 35 mil animais cruzados da raça e 5 mil animais puros distribuídos no território brasileiro divididos entre 50 criadores da raça.

Além das características relacionadas à qualidade da carne, a raça Wagyu também apresenta características reprodutivas positivas. Segundo Zanella (2018), observou-se, em bovinos da Raça Wagyu criados à campo, que tanto machos como fêmeas atingem a puberdade mais precocemente do que as raças europeias. Além disso, os machos apresentam maiores níveis de testosterona, maior produção espermática e maior libido, apesar da menor circunferência escrotal. Com relação às fêmeas, destaca-se a maior

facilidade de parto, o que resulta em menor incidência de partos distócitos, a precocidade sexual, a habilidade materna e a longevidade.

Entretanto, mais pesquisas devem ser conduzidas a fim de comprovar as características reprodutivas desta raça, sobretudo com relação à sua resposta mediante o emprego das biotécnicas da reprodução, e assim fomentar sua importância no cenário da produção de alimentos de origem animal.

4. REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES - ABIEC. Perfil da Pecuária no Brasil. Relatório Anual, 2017, São Paulo: ABIEC, 2018. 48 p.

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DA PECUÁRIA DE CORTE - ANUALPEC. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio Ltda., 2016.

ADAMS, G. P.; JAISWAL, R.; SINGH, J.; MALHI, P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. **Theriogenology**. v. 69, p. 72-80, 2008.

AERTS, J.M.J.; BOLS, P.E.J. Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part II: Antral development, exogenous influence and future prospects. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p.180-187, 2010.

BARUSELLI, P. S.; SA FILHO, M. F.; FERREIRA, R. M.; SALES, J. N. D. S.; GIMENES, L. U.; VIEIRA, L. M.; BÓ, G. A. Manipulation of follicle development to ensure optimal oocyte quality and conception rates in cattle. **Reproduction in domestic animals**, v. 47, n. 4, p. 134-141, 2012.

BETHLEM, I. V.; PALAMIM, L.; LIMA, R. A. S. A inserção da raça Wagyu no mercado brasileiro de carnes. **Animal Business Brazil**, Rio de Janeiro, v. 18, p. 6-8, 2014.

BLONDIN, P.; BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUNGU, H.; BARNES, F.; SIRARD, M. A. Manipulation of Follicular Development to Produce Developmentally Competent Bovine Oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 1, p. 38-43, 2002.

BLONDIN, P.; VIGNEAULT, C.; NIVET, A. L.; SIRARD, M. A. Improving oocyte quality in cows and heifers - What have we learned so far? **Animal Reproduction**, v.9, n. 3, p. 281-289, 2012.

BÓ, G. A.; MAPLETOFT, R. J. Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 38-48, 2014.

BÓ, G. A.; ROGAN, D. R.; MAPLETOFT, R. J. Pursuit of a method for single administration of pFSH for superstimulation in cattle: What we have learned. **Theriogenology**, v. 112, p.26-33, 2018.

BONI, R. Ovum pick-up in cattle: a 25 yr retrospective analysis. **Animal Reproduction Science**, v. 9, n. 3, p. 362-369, 2012.

BOTELHO, A.C.F.A. **Indução da ciclicidade em receptoras de embriões equinos: busca por um manejo sustentável**. 2018. Maringá, 45f. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Limpas) – Curso de Pós-graduação em Tecnologias Limpas, Centro Universitário de Maringá.

BRUNDTLAND, G. H. Our common future: the world commission on environment and development. **Oxford: Oxford University Press**, 1987. 383p.

BURALI, P.H.B. **Avaliação do uso de implantes reutilizáveis de progesterona sobre a taxa de gestação e resincronização de receptoras Nelore.** 2018. Maringá, 45f. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Limpas) – Curso de Pós-graduação em Tecnologias Limpas, Centro Universitário de Maringá.

CARVALHO, T. B.; ZEN, S. A cadeia de pecuária de corte no Brasil: evolução e tendências. **Revista iPecege**, v. 3, n. 1, p. 85-99, 2017.

CARVALHO, T. B.; ZEN, S. **Cadeia de pecuária de corte: perspectivas de produção e consumo no Brasil.** In. CONGRESSO SOBER – SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, XXXXVIII, 2010, Campo Grande. Anais...Campo Grande: Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, 2010, p. 1-19.

COLOMBO, A.H.B.; CAVALIERI, F.L.B.; ANDREAZZI, M.A.; MORESKI, D.A.B.; BOTELHO, A.C.F.A., SANTOS, J.M.G. avaliação de biotécnicas da reprodução sob o foco ambiental. **Archives of Veterinary Science**, v.22, n.1, p.81-89, 2017.

DA SILVA, J. C. B.; FERREIRA, R. M.; MATURANA FILHO, M.; DE REZENDE NAVES, J.; SANTIN, T.; PUGLIESI, G.; MADUREIRA, E. H. Use of FSH in two different regimens for ovarian superstimulation prior to ovum pick up and in vitro embryo production in Holstein cows. **Theriogenology**, v. 90, p. 65-73, 2017.

DIAS FILHO, M. B. Uso de Pastagens para a Produção de Bovinos de Corte no Brasil: Passado, Presente e Futuro. – Belém, PA. **Embrapa Amazônia Oriental**, p.42, 2016.

DELVIGNE, A.; ROZENBERG, S. A qualitative systematic review of coasting, a procedure to avoid ovarian hyperstimulation syndrome in IVF patients. **Human Reproduction Update**. v.8, v.3, p.291-296, 2002.

DUROCHER, J.; MORIN, N.; BLONDIN, P. Effect of hormonal stimulation on bovine follicular response and oocyte developmental competence in a commercial operation. **Theriogenology**. v.65, p.102-115, 2006.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Pesquisa genômica gera dados inéditos que poderão aumentar produtividade de gado Nelore**, 2016. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/noticia/13449556/pesquisa-genomica-gera-dados-ineditos-que-poderao-aumentar-produtividade-de-gado-nelore?link=agencia>. Acessado em 26/01/2019.

FRANCO, G. L.; FARIA, F. J. C.; D'OLIVEIRA, M. C. Interação entre nutrição e reprodução em vacas de corte. Belo Horizonte, **Informe Agropecuário**, v. 37, n. 292, p. 36-53, 2016.

FORDE, N.; BELTMAN, M. E.; LONERGAN, P.; DISKIN, M.; ROCHE, J. F.; CROWE, M. A. Oestrous cycles in Bos taurus cattle. **Animal Reproduction Science**. v. 124, n. 3-4, p. 163-169, 2011.

FURTADO, D. A.; TOZZETTI, D. S.; AVANZA, M. F. B.; DIAS, L. G. G. G. Inseminação artificial em tempo fixo em bovinos de corte. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 16, p. 1-25, 2011.

GIMENES, L. U.; FERRAZ, M. L.; FANTINATO-NETO, P.; CHIARATTI, M. R.; MESQUITA, L. G.; SÁ FILHO, M. F.; MEIRELLES, F. V.; TRINCA, L. A.; RENNÓ, F. P.; WATANABE, Y. F.; BARUSELLI, P. S. 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**, v. 83, n. 3, p. 385-393, 2015.

GINTHER, O. J. Variations in follicle-diameter deviation and a growth spurt in the dominant follicle at deviation in *Bos taurus* heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 188, p. 155-164, 2018.

GOMES, R. C.; FEIJÓ, G. L. D.; CHIARI, L. Evolução e qualidade da pecuária brasileira. **Embrapa gado de corte**. Disponível em <<https://www.embrapa.br/documents/10180/21470602/EvolucaoQualidadePecuaria.pdf/64e8985a-5c7c-b83e-ba2d-168ffaa762ad>> acessado em 25/01/2019.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEREDO, J. R.; FREITAS, V. J. Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal. São Paulo: ROCA, p. 408, 2011.

GOTOH, T.; TAKAHASHI, H.; NISHIMURA, T.; KUCHIDA, K.; MANNEN, H. Meat produced by Japanese Black cattle and Wagyu. **Animal Frontiers**, v. 4, n. 4, p. 46-54, 2014.

GOTOH, T.; NISHIMURA, T.; KUCHIDA, K.; MANNEN, K. The Japanese Wagyu beef industry: current situation and future prospects – a review. **Asian-Australasian Jornal of Animal Sciences**. v. 31, n. 7, p. 933, 2018.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE -. **Estatística da produção pecuária 2017**. Disponível em <https://ww2.ibge.gov.br/home/estatistica/pesquisas/calendario_2017.php> acessado em 05/02/2019.

LABRECQUE, R.; VIGNEAULT, C.; BLONDIN, P.; SIRARD, M.A. Gene expression analysis of bovine oocytes with high developmental competence obtained from FSH-stimulated animals. **Molecular Reproduction & Development**.v.80, p.428–40, 2013.

MELLO, R. R. C.; FERREIRA, J. E.; MELLO, M. R. B.; PALHANO, H. B. Aspectos da dinâmica folicular em bovinos. **Agropecuária científica no semiárido**. v. 10, n.4, p. 01-06, 2014.

MOORE, S. G.; HASLER, J. F. A 100-year review: reproductive technologies in dairy science. **Journal of dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 10314-10331, 2017.

MOREIRA, H. L.; BUZANSKAS, M. I. M.; MUNARI, D. P.; CANOVA, É. B.; LÔBO, R. B.; PAZ, C. C. P. D. Reproductive traits selection in Nelore beef cattle. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 39, n. 4, p. 355-362, 2015.

NEVES, J. P.; MIRANDA, K. L.; TORTORELLA, R. D.. Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.39, p.414-421, 2010.

NIVET, A. N.; BUNEL, A.; LABRECQUE, R.; BELANGER, J.; VIGNEAULT, C.; BLONDIN, P.; SIRARD, M. A. FSH withdrawal improves developmental competence of oocytes in the bovine model. **Reproduction**. v. 143, n. 2, p. 165-171, 2012.

OGATA, Y.; YU, G.; HIDAKA, T.; MATZUSHIGE, T. M. Effective embryo production from Holstein cows treated with gonadotropin-releasing hormone during early lactation. **Theriogenology**. v. 86, n. 6, p. 1421-1426, 2016.

OLIVEIRA, F. A.; TORRES, C. A. A.; PENITENTE FILHO, J. M. **Inseminação artificial em tempo fixo – protocolos e aplicação**. In: SEMANA DO FAZENDEIRO, LXXXII, Viçosa. Anais...Viçosa: Universidade federal de Viçosa 2011, p.1.

OLIVEIRA, F.; FREIRES, L.; DAS NEVES NETO, J. T.; BRAGA, I. A.; RAMOS, D. G. S. cadeia produtiva da carne bovina no Brasil. **Revista Interação Interdisciplinar** v. 01, n. 01, p.229-244, 2017.

OLIVEIRA, L. H.; SANCHES, C. P.; SEDDON, A. S.; VERAS, M. B.; LIMA, F. A.; MONTEIRO JR, P. L. J.; WILTBANK, M. C.; SARTORI, R. Short communication: Follicle superstimulation before ovum pick-up for in vitro embryo production in Holstein cows. **Science Association American Dairy**. v. 99, n. 11, p. 9307-9312, 2016.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS - ONU/ BRASIL. FAO: Se o atual ritmo de consumo continuar, em 2050 mundo precisará de 60% mais alimentos e 40% mais água. Disponível em < <https://nacoesunidas.org/fao-se-o-atual-ritmo-de-consumo-continuar-em-2050-mundo-precisara-de-60-mais-alimentos-e-40-mais-agua>> acessado em 20/01/2019.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A EDUCAÇÃO A CIÊNCIA E A CULTURA - UNESCO – Agenda de Desenvolvimento pós-2015 - UNESCO e os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável. Disponível em <<http://www.unesco.org/new/pt/brasilia/post-2015-development-agenda/>>, acessado em 20/01/2019.

ONGARATTO, F. L.; RODRIGUEZ-VILLAMIL, P.; TRIBULO, A.; BÓ, G. A. Effect of follicle wave synchronization and gonadotropin treatments on the number and quality of cumulus-oocyte complex obtained by ultrasound-guided ovum pick-up in beef cattle. **Animal Reproduction**. v. 12 n. 4, p. 876-883, 2015.

PELLEGRINO, C.A.G.; MOROTTI, F.; UNTURA, R.M.; PONTES, J.H.F.; PELLEGRINO, M.F.O.; CAMPOLINA, J.P.; SENEDA, M.M.; BARBOSA, F.A.; HENRY, M.. Use of sexed sorted semen for fixed-time artificial insemination or fixed-time embryo transfer of in vitro produced embryos in cattle. **Theriogenology**, v. 86, p. 888-893, 2016.

PERRY, G. Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. **IETS** 2015.

QUEIROZ, F.M.; BOTELHO, A.C.F.A.; CAVALIERI, F.L.B.; EMANUELLI, I.P.; ANDREAZZI, M.A. Study on superovulation with FSH coacting in bovine female. In: PROCEEDINGS OF THE 32ND ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN EMBRYO TECHNOLOGY SOCIETY (SBTE), XXXII. 2018, Florianópolis. Anais...Florianópolis: Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, 2018, p. 395.

RODRIGUES, J. L. Transferência de embriões bovinos - histórico e perspectivas atuais. **Revista Brasileira De Reprodução Animal**, v. 25, n. 2, p. 102-107, 2001.

SARTORI, R.; GIMENES, L. U.; MONTEIRO JR, P. L.; MELO, L. F; BARUSELLI, P. S.; BASTOS, M. R. Metabolic and endocrine differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* females that impact the interaction of nutrition with reproduction. **Theriogenology** v. 86, p. 32-40, 2016.

SILVA, M. C.; BOAVENTURA, V. M.; FIORAVANTI, M. C. S. História do povoamento bovino no Brasil central. **Revista UFG**. v. 1, n. 13, p. 34-41, 2012.

SILVA, R. O.; BARIONI, L. G.; HALL, J. A. J.; MATSUURA, M. F.; ALBERTINI, T. Z.; FERNANDES, F. A.; MORAN, D. Increasing beef production could lower greenhouse gas emissions in Brazil if decoupled from deforestation. **Nature Climate Change**, v. 6, n.1, p. 493-497, 2016.

SMITH, S. B.; GOTOH, T.; GREENWOOD, P. L. Current situation and future prospects for global beef production: overview of special issue. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 31, n. 7, p. 927, 2018.

SMITH, S. B. The Production of High-Quality Beef with Wagyu Cattle. **Production of wagyu beef**. p. 1-26. 2015.

SOMFAI, T.; MATOBA, S.; INABA, Y.; NAKAI, M.; IMAI, K.; NAGAI, T.; GESHI, M. Cytoskeletal and mitochondrial properties of bovine oocytes obtained by Ovum Pick-Up: the effects of follicle stimulation and in vitro maturation. **Animal Science Journal**, v. 86, n.12, p.970-980, 2015.

SOUSSANA, J. F.; TALLEC, T.; BLANFORT, V. Mitigating the greenhouse gas balance of ruminant production systems through carbon sequestration in grasslands. **Animal**, v. 4, n. 1, p. 334–350, 2010.

TIRAPELLI, A. C. N.; FERNANDES, C. A. C.; GIOSO, M. M.; VARAGO, F. C.; PALHÃO, M.; ROSSI, T. C.; GARCIA, J. A. D. Redução da resposta superovulatória de fêmeas bovinas superestimuladas com FSH em doses split. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 6, p. 1631-1637, 2014.

TOWNSON, D.H.; TSANG, P.C.W.; BUTLER, W.R.; FRAJBLAT, M.; GRIEL Jr, L.C.; JOHNSON, C.J.; MILVAE, R.A.; NIKSIC, G.M.; PATE, J.L.. Relationship of fertility to ovarian follicular waves before breeding in dairy cows. **Journal of Animal Science**, v.80, p.1053-1058, 2002.

VIEIRA, R. J. Biotécnicas aplicadas à reprodução bovina: generalidades. **Ciência Animal**, v. 22, n. 1, p. 55-65, 2012.

VIEIRA, L. M., RODRIGUES, C. A., CASTRO NETTO, A., GUERREIRO, B. M., SILVEIRA, C. R. A., MOREIRA, R. J. C., SÁ FILHO, M. F., BÓ, G. A., MAPLETOFT, P. S., BARUSELLI, P. S. Superstimulation prior to the ovum pick-up to improve in vitro embryo production in lactating and non-lactating Holstein cows. **Theriogenology**, v. 82, n.2, p. 318-324, 2014.

ZANELLA, R. **Raça Wagyu**. Portal do Agronegócio. Disponível em <<http://ruralpecuaria.com.br/tecnologia-e-manejo/racas-gado-de-corte/raca-wagyu.html>> acessado em 20/01/2019.

5. ARTIGO

SUPERESTIMULAÇÃO OVARIANA COM FSH EM DOADORAS BOVINAS DA RAÇA WAGYU IMPACTA A DINÂMICA FOLICULAR, MAS NÃO MELHORA A QUANTIDADE DE EMBRIÕES

(*Ovarian superstimulation with FSH in Wagyu breed bovine donors impacts follicular dynamics but does not improve the amount of embryos*)

RESUMO

O aumento da população mundial gera a necessidade de aumentar a produção de alimentos de origem vegetal e animal. No Brasil, a pecuária tem evoluído, demonstrando o importante papel mundial do país na produção de alimentos. Desta forma, pesquisadores desta cadeia produtiva vêm buscando tecnologias relacionadas à produção e reprodução, sobretudo, ao uso das biotecnologias da reprodução, visando aumentar a produção nas diferentes raças bovinas. Deste modo, o objetivo desta pesquisa foi investigar a eficiência da superestimulação ovariana com FSH em fêmeas bovinas doadoras de óócitos da raça Wagyu sobre a dinâmica folicular e sobre a produção *in vitro* de embriões. Foram utilizados 12 animais da raça Wagyu, com idade entre 12 a 24 meses, distribuídas aleatoriamente, num delineamento crossover, em dois grupos: Grupo 1= animais não estimulados com FSH e Grupo 2: animais estimulados com FSH. Foram avaliadas as variáveis foliculares, oocitárias e a produção embrionária. Observou-se que a superestimulação ovariana nas fêmeas bovinas doadoras de óócitos da raça Wagyu com FSH melhorou a quantidade de folículos médios e grandes, mas reduziu a taxa de recuperação de óócitos e, apesar da melhor porcentagem de

oócitos viáveis, não houve melhora na quantidade de embriões produzidos *in vitro*.

Palavras-chave: aspiração folicular; biotécnicas da reprodução; blastocisto; folículo antral.

ABSTRACT

The increase of the world population generates the need to increase the production of food of vegetal and animal origin. In Brazil, livestock farming has evolved, demonstrating the important role of the country in the production of food. In this way, researchers of this productive chain have been looking for technologies related to production and reproduction, above all, to the use of reproduction biotechnologies, seeking to increase the production of different bovine breeds. Thus, the objective of this research was to investigate the efficacy of ovarian FSH super-stimulation in bovine Wagyu oocyte donor females on follicular dynamics and *in vitro* embryo production. Twelve Wagyu animals, aged 12 to 24 months, randomly distributed in a crossover design were used in two groups: Group 1 = animals not stimulated with FSH and Group 2: animals stimulated with FSH. The follicular, oocyte and embryonic variables were evaluated. It was observed that ovarian overstimulation in Wagyu oocyte donor cows with FSH improved the mean and large follicles but reduced the rate of oocyte recovery and, despite the best percentage of viable oocytes, there was no improvement in the amount of embryos produced *in vitro*.

Keywords: follicular aspiration; reproductive biotechnology; blastocyst; antral follicle.

INTRODUÇÃO

A Organização das Nações Unidas (ONU, 2017) estima um aumento na população mundial, alcançando em 2030, 8,6 bilhões de pessoas e em 2050, 9,8 bilhões. Por isso, para suprir a necessidade mundial de alimentos para a população até 2050, deverá ocorrer um aumento de 60% na produção. Desta forma, pesquisadores de várias cadeias produtivas, incluindo a da carne bovina, tem estudado tecnologias relacionadas à melhoria do manejo, sanidade, nutrição e reprodução (COLOMBO et al., 2017; BOTELHO, 2018; BURALI, 2018), buscando aumentar o número de animais e/ou a taxa de lotação das pastagens, e assim, aumentar a produção de carne por área.

As biotecnologias da reprodução animal podem contribuir positivamente com este cenário. Com o advento da inseminação artificial (IA), os produtores puderam utilizar touros com alto valor genético, e com o desenvolvimento dos esquemas de superovulação (SOV) e transferência de embriões (TE), a bovinocultura pode aumentar o número de bezerros oriundos de fêmeas de alto padrão genético (RODRIGUES, 2001; HASLER, 2014). Já a aspiração folicular guiada por ultrassonografia possibilitou o aumento do número de gestações de animais com alto valor genético e também, estudos avaliando vários protocolos hormonais foram desenvolvidos buscando melhorar os índices reprodutivos dos animais (HASLER, 2014).

Objetivando contribuir ainda mais com o aumento da produção *in vitro* de embriões, um protocolo que tem sido estudado é a SOV utilizando FSH (Hormônio Folículo Estimulante) seguida ou não de *coasting*, que é um período de ausência de FSH, em doadoras bovinas.

Segundo Vieira et al. (2014), tratamentos empregando estimulação com FSH podem promover o desenvolvimento de múltiplos folículos nos ovários e melhorar o rendimento dos embriões em doadoras da raça Holandesa e assim, tornar mais efetiva a produção *in vitro* de embriões (PIVE) por *ovum pick-up* (OPU). Contudo, os resultados das pesquisas divergem quanto ao uso do FSH, com ou sem *coasting*, nas diferentes subespécies (*Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*) e raças (SARTORI et al., 2016; SILVA et al., 2017).

Estudos que envolvam os efeitos benéficos da superestimulação com FSH, como a maior proporção de folículos de tamanho médio e grande, associados ao uso e subsequente retirada de gonadotrofina (*coasting*), buscando melhorar a competência dos óócitos e aumentar a taxa de gestação são fundamentais, especialmente em bovinos da raça Wagyu, cujas pesquisas são escassas.

O gado Wagyu inclui quatro raças japonesas: Preto, Castanho, Shorthorn e Polled (GOTOH et al., 2018) e a raça Preta tem se adaptado em várias regiões do Brasil, apresentando importância econômica em função do bom rendimento, produção e comercialização de carne nobre com extremo marmoreio. Esta raça apresenta características de produção positivas como, tamanho mediano, precocidade sexual, atingindo a maturidade sexual em até 11 meses, tanto para fêmeas quanto para os machos, boa habilidade materna e facilidade de parto, longevidade, rusticidade e temperamento dócil (UCHIDA et al., 2002).

Deste modo, o objetivo desta pesquisa foi investigar a eficiência da superestimulação ovariana com FSH em fêmeas bovinas doadoras de óócitos da raça Wagyu sobre a dinâmica folicular e sobre a produção *in vitro* de embriões.

MATERIAL E MÉTODO

O experimento foi realizado na Fazenda Escola – BIOTEC, do Centro de Ensino Superior de Maringá/ UNICESUMAR, Maringá, Paraná, Brasil (23°25'S, 51°57'W e altitude de 550 metros), entre os meses de março a junho de 2018. As biotécnicas empregadas nesta pesquisa foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Centro Universitário de Maringá / UNICESUMAR, sob protocolo N° 004/2018.3.

Foram utilizadas 12 fêmeas da raça *Wagyu*, com idade entre 12 a 24 meses, peso médio de 350 Kg, doadoras de oócitos de um programa comercial, sem anormalidades aparentes no trato reprodutivo, conforme determinado pelo exame ginecológico e ultrassonográfico. Os animais foram mantidos em piquetes de braquiária (*Brachiaria brizantha* cv MG-5), com suplementação mineral e água *ad libitum*, sendo submetidas ao manejo higiênico-sanitário adotado na propriedade.

Os animais foram divididos, aleatoriamente, num delineamento crossover, em dois grupos:

Grupo 1 (G1): controle - animais não estimulados com hormônio = o protocolo experimental das vacas do grupo Grupo 1 consistiu em definir um D0, um dia aleatório do ciclo, baseado na rotina comercial, no Dia 8 foi realizada a aspiração folicular, a lavagem, a classificação dos oócitos e a maturação *in vitro* (MIV), no Dia 9, a fecundação *in vitro* (FIV) e no Dia 10, o cultivo *in vitro* (CIV) (Figura 1).

Grupo 2 (G2): superestimulação com FSH = o protocolo experimental das vacas do grupo Grupo 2 consistiu de, no D0, um dia aleatório do ciclo, baseado

na rotina comercial, foi realizada a sincronização da onda folicular com implante de P4 transvaginal (CIDR®; Zoetis, São Paulo, SP), aplicação de 2,0 mg de benzoato de estradiol (BE) (ESTROGIN®; Biofarm, Jaboticabal, SP) + 2,0 mg PGF2 α (LUTALYSE®, Zoetis, São Paulo, SP), e 72 horas após a introdução do implante de P4, nos dias D4, D5 e D6 foi empregado um protocolo de superestimulação (SOV) com aplicações consecutivas de FSH intramuscular (Pluset®, Hertape Calier, Brasil), 170UI/dia/animal e, após decorridas 48 horas da última aplicação de FSH, no Dia 8 foi feita a retirada do implante de P4, a aspiração folicular guiada por ultrassom, a lavagem, a classificação dos oócitos e a MIV, em seguida, no Dia 9 foi realizada a FIV, e no Dia 10, o CIV (Figura 1).

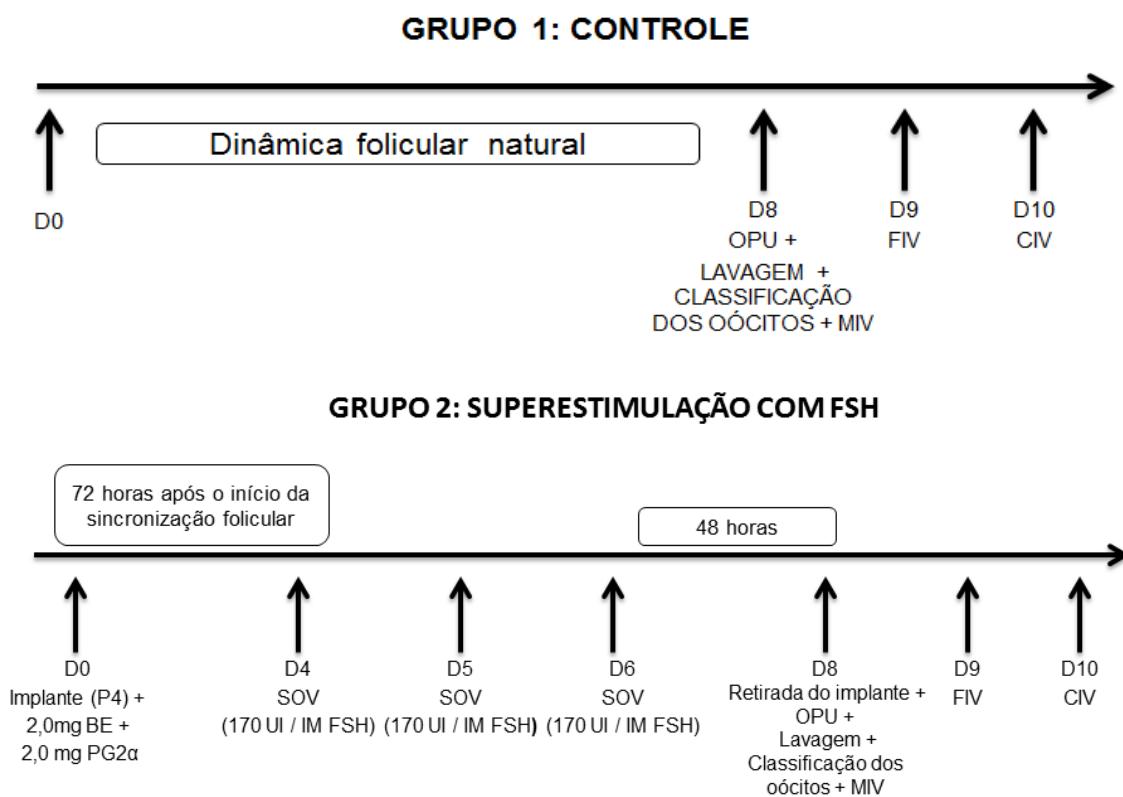


Figura 1. Protocolo experimental do Grupo 1 – controle - Dia 8: aspiração folicular, lavagem, classificação dos oócitos e maturação *in vitro*; Dia 9: fecundação *in vitro*; Dia 10: cultivo *in vitro*. Protocolo experimental do Grupo 2 – Superestimulação com FSH - D0: sincronização da onda folicular com implante de P4 transvaginal, aplicação de 2,0mg de benzoato de estradiol + 2,0mg PGF2 α ; D4, D5 e D6: protocolo de superovulação com FSH 170UI/dia/animal; D8: retirada do implante, aspiração folicular guiada por ultrassom, lavagem e classificação oócitos e maturação *in vitro*; D9: fecundação *in vitro*; D10: cultivo *in vitro*.

A definição da aplicação de três doses consecutivas de FSH e o período de 48 horas de intervalo foi baseado em Blondin et al. (2012).

No momento da aspiração os folículos ovarianos foram identificados e o diâmetro (mm) determinado por meio de ultrassom (ALOKA SSD-500) e classificados pelo tamanho em três categorias: de 3 a 5 mm (folículos pequenos), de 6 a 8 mm (folículos médios) e iguais ou superiores a 9 mm (folículos grandes) (FERREIRA et al., 2004).

Para realizar o procedimento de aspiração folicular foi utilizado o ultrassom (ALOKA SSD-500®) com transdutor microconvexo de 5 mHz (UST 974-5), ajustado a uma guia de aspiração folicular específica para o sistema reprodutor de bovinos. Foi utilizada uma agulha 20G conectada a um tubo de Falcon de 50 mL através de um sistema de aspiração (Cook VBOA 18L®). A pressão de vácuo foi obtida por intermédio de uma bomba (Cook V-MAR 5000®), ajustada entre 38 e 45 mmHg, permitindo um fluxo de 12mL de meio/minuto. Os ovócitos foram aspirados com uma solução contendo 2,0% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Nutricell®, Campinas, SP, Brasil), 25UI/mL de heparina sódica e 98,0% de PBS (Nutricell®, Campinas, SP, Brasil).

No momento da aspiração folicular foi realizada uma anestesia epidural baixa com 5mL de lidocaína a 2% (Pearson®, São Paulo/ SP, Brasil) para diminuir os movimentos peristálticos e o desconforto no animal, após a administração da lidocaína o animal teve a vulva lavada e limpa com papel toalha. Foi inserido o transdutor até o fundo de saco vaginal e com a manipulação dos ovários através do reto, buscou-se a melhor visualização dos mesmos na tela do ultrassom. Os folículos foram posicionados na linha de punção indicada na tela do ultrassom e aspirados, de forma aleatória, não seguindo ordem de tamanho, através da

agulha e da bomba de vácuo, o mesmo procedimento foi realizado em todos folículos visíveis em ambos os ovários. Após o término da aspiração o sistema de vácuo foi limpo com o meio de recebimento dos oócitos e as agulhas utilizadas foram descartadas.

Para a lavagem e seleção dos oócitos, o material aspirado foi transferido para o filtro de colheita de embriões e lavado com o mesmo meio utilizado para aspiração. Os sedimentos restantes no filtro foram transferidos para placa de *Petri* e foi realizada a busca, contagem e a classificação dos oócitos como viáveis e inviáveis. Foram considerados viáveis (grau I, II e III) aqueles que apresentaram a presença de *cumulus* e ooplasma homogêneos, e inviáveis (grau IV) aqueles desnudos ou picnóticos, heterogêneos e com vesículas apoptóticas (DE LOOS et al., 1989).

A MIV foi realizada em TCM199 com sais de Earles (Gibco®), glutamina (Sigma® cod.: G8540) e NaHCO₃ (Mallinckrodt®), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Nutricell®, Campinas, SP, Brasil), 22µg/mL piruvato (Biochemical® cod.: 44094), 50µg de gentamicina (Sigma® cod.: G1272), 0,5µg de FSH/mL (Bioniche®), 50µg de LH/mL (Bioniche®) e 1µg de estradiol/mL (Sigma® cod.: E2758), mantidos em estufa, a 39°C, 5% de CO₂ em ar com máxima umidade, durante 22 a 24 horas. Os oócitos foram colocados em micropipetas de 90µL de meio de maturação cobertas por óleo mineral.

Após 22 a 24 horas, foi realizada a FIV em 100µL de meio TALP suplementado com 10µg/mL de heparina (Sigma® cod.: H3149), 22µL/mL de piruvato (Biochemical® cod.: 44094), 50 µg/mL de gentamicina (Sigma® cod.: G1272), albumina sérica bovina-BSA (sem ácidos graxos) (Sigma® cod.: A3311), solução de PHE 2µM de penicilina (Sigma® cod.: P4875), 1µM de hipotaurina

(Sigma® cod.: H1384) e 0,25µM de epinefrina (Sigma® cod.: E4250). O sêmen sexado de touro Wagyu foi descongelado em banho-maria a 35ºC. Para seleção dos espermatozoides móveis e remoção de diluidores e de plasma seminal, foi realizada centrifugação em gradiente Percoll (90 e 45%), durante 20 minutos. Foram utilizados 1×10^6 espermatozoides/mL, e os oócitos foram transferidos para as microgotas (20 oócitos/gota), onde permaneceram por 15 a 18 horas, a 39ºC, em atmosfera com 5% de CO₂ em ar.

Após 15 horas da FIV, os zigotos foram cultivados *in vitro* (CIV), no meio SOF (*Synthetic Oviduct Fluid*) suplementado com SFB (Nutricell®, Campinas, SP, Brasil), em incubadora, com atmosfera gasosa contendo 20% CO₂ em ar, com máxima umidade.

Após 48 horas de CIV, foi avaliada a taxa de clivagem e realizada a renovação do meio de cultivo. Nesse período, quando ocorreu a clivagem, foi observado o desenvolvimento embrionário com duas, quatro e oito células.

O efeito da superestimulação com FSH sobre as variáveis foliculares, oocitárias e de produção embrionária foi analisado pelo modelo linear generalizado, incluindo o efeito principal do tratamento (Superestimulação com FSH *versus* Controle) e demais fontes de variação. Na presença de um efeito significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey Diferenças nas taxas de recuperação oocitária, de oócitos viáveis e de blastocistos (Superestimulação com FSH *versus* Controle) foram analisadas pelo modelo de regressão logística binária incluindo o mesmo efeito de tratamento e demais fontes de variação. Em ambos os modelos, todos os efeitos e interações possíveis foram consideradas. Para análise descritiva, os dados quantitativos estão apresentados como média (M) e erro padrão (SE) e os dados qualitativos

como porcentagem (%). Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa estatístico Minitab®, versão 18.1. O nível de significância para rejeitar H₀ (a hipótese nula) foi de 5%, portanto, um nível de significância ≤ 0,05 foi considerado para indicar um efeito das variáveis categóricas e suas interações.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nos resultados obtidos, observou-se que a superestimulação com FSH elevou o número de folículos médios e grandes ($p<0,005$) e, consequentemente, melhorou o número total de folículos (Tabela 1).

Tabela 1 – Efeito da superestimulação ovariana com FSH sobre o número de folículos pequenos, médios e grandes, eficiência da *ovum pick-up* (OPU) e da produção *in vitro* de embriões em doadoras bovinas da raça Wagyu.

Variáveis	Grupo 1 (n=12)	Grupo 2 (n=12)	Valor de p
Número de folículos pequenos (M±EPM)	16,2 ± 1,5	5,1 ± 1,0	< 0,0001
Número de folículos médios (M±EPM)	4,4 ± 0,6	16,4 ± 3,5	0,017
Número de folículos grandes (M±EPM)	1,0 ± 0,5	10,4 ± 1,6	< 0,0001
Média geral do número de folículos (M±EPM)	21,6 ± 1,9	31,8 ± 3,2	0,013
Número de óocitos totais (M±EPM)	17,4 ± 2,9	12,2 ± 2,5	0,180
Taxa de recuperação (%, n/N)	81,0 (192/237)	38,3 (134/350)	< 0,0001
Número de óocitos viáveis (M±EPM)	13,0 ± 2,3	10,2 ± 2,3	0,232
% de óocitos viáveis (%, n/N)	74,5 (143/192)	83,6 (112/134)	0,047
Número de embriões (M±EPM)	3,0 ± 0,7	2,4 ± 0,6	0,330
Taxa de blastocisto (%, n/N)	23,1 (33/143)	23,2 (26/112)	0,979

M±EP: média e mais ou menos erro padrão da média; Grupo 1: controle; Grupo 2: superestimulação com FSH.

Corroborando nossos achados, Goodhand et al. (1999) também observaram que o uso de FSH aumentou o número e o diâmetro médio dos folículos disponíveis para punção. De fato, Ribeiro et al. (2011) apontaram que a superestimulação hormonal aumenta o número de folículos com diâmetro adequado para a aspiração, ou seja, superior a 6mm.

Contudo, apesar deste aumento no número de folículos médios e grandes, foi observada uma redução na taxa de recuperação oocitária (81,0 vs 38,3%) ($p<0,0001$).

Entretanto, existem relatos contraditórios na literatura quanto à taxa de recuperação em função do tamanho do folículo. Goodhand et al. (1999) apontaram que, apesar do FSH aumentar o número e o diâmetro médio dos folículos disponíveis para punção, o número de oócitos recuperados são variados. Ribeiro et al. (2011) afirmaram que a superestimulação hormonal aumenta o número de folículos de tamanho adequado para a aspiração e a taxa de recuperação. Chagas et al. (2014) afirmaram que folículos pequenos apresentam menor taxa de recuperação em comparação aos de tamanho médio e grande. Ongaratto et al. (2015) trabalharam com animais da raça Brangus e Angus e verificaram que a utilização de benzoato de estradiol, progesterona para sincronizar a onda folicular, de PGF2 α para evitar a presença de corpo lúteo e a superovulação com FSH melhoraram o número de *complexos cumulus oócito* (COCs) recuperados por OPU. Outros estudos (BLONDIN et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2016) relataram que associação entre FSH e *coasting* elimina os folículos pequenos e aumenta a quantidade dos folículos médios e grandes, facilitando a aspiração.

Contudo, ressalta-se que, estes dados divergem parcialmente com os resultados deste estudo, pois apesar do maior tamanho dos folículos, a taxa de recuperação foi menor. Semelhante aos achados deste estudo, Lonergan et al. (1994) também verificaram uma menor recuperação de oócitos em situações com predominância de folículos grandes no momento da aspiração. Atribui-se a baixa taxa de recuperação encontrada neste estudo à raça e as perdas na cavidade

abdominal. Pesquisas mostram que existem diferenças na taxa de recuperação em função da espécie, mostrando que os protocolos de superovulação e aspiração folicular em *Bos indicus* apresentam melhores resultados, pois apresentam maior número de folículos antrais e, consequentemente, maior número de oócitos recuperados quando comparado aos animais *Bos taurus* (SARTORI et al., 2016; SILVA et al., 2017), como é o caso da raça Wagyu deste estudo. Já o maior tamanho dos folículos na OPU pode resultar em maior probabilidade de perda dos COCs na cavidade peritoneal ou em maior dificuldade em aspirá-lo, apesar de que Ribeiro et al. (2011) afirmaram ser mais fácil aspirar folículos maiores em função da melhor visualização no ultrassom.

Os resultados também mostraram que o tratamento com FSH melhorou a porcentagem de oócitos viáveis (74,5 vs 83,6%). Com relação ao número de oócitos totais e viáveis recuperados, Barbosa et al. (2013) observaram a produção de embriões em vacas da raça Nelore e reportaram que número médio de oócitos aspirados variou entre 26,58 a 44,08. Silva et al. (2017) avaliaram dados reprodutivos de doadoras de oócitos bovinos indianas e taurinas submetidas a aspiração folicular guiada por ultrassom. Os autores analisaram os dados de campo de 734 aspirações foliculares e observaram uma média, entre as raças, de $31,85 \pm 16,65$ oócitos por aspiração, sendo $25,32 \pm 13,80$ viáveis, com destaque para o maior número de oócitos aspirados e viáveis para as doadoras da raça Nelore, uma raça india.

Desta forma, pondera-se que, apesar da superioridade na porcentagem de oócitos viáveis observada no grupo tratado com FSH, o número de oócitos totais (G1: $17,4 \pm 2,9$; G2: $12,2 \pm 2,5$) e viáveis (G1: $13,0 \pm 2,3$; G2: $10,2 \pm 2,3$) obtidos nesta pesquisa independente do tratamento, foram menores do que os reportados pela

literatura para outras raças, sobretudo as indianas, estando em conformidade com os relatos de que *Bos indicus* apresentam maior número de oócitos recuperados em comparação aos animais *Bos taurus* (SARTORI et al., 2016; SILVA et al., 2017).

Além disso, os resultados também mostraram que apesar do tratamento com FSH ter melhorado a porcentagem de óocitos viáveis, não ocorreu aumento no número de embriões, mostrando produção embrionária equivalente entre os dois grupos avaliados (3,0 vs 2,4).

Ao contrário dos achados desta pesquisa, Ribeiro et al. (2011) apontaram que a superestimulação hormonal aumenta o número e o tamanho dos folículos e aumenta o número de embriões. Baruselli et al. (2012) também apontaram aumento na PIVE em experimento com doadoras Brangus e Angus tratadas com quatro doses iguais de FSH, duas vezes ao dia, iniciadas no momento da emergência da onda folicular e com a realização da OPU 24 horas após o último tratamento com FSH. Outros trabalhos tem mostrado que a superestimulação com FSH, associada ao *coasting*, melhora a competência oocitária (NIVET et al., 2012), as taxas de blastocisto e de gestação (LABRECQUE et al., 2013), aumenta a eficiência da PIV e a porcentagem de desenvolvimento de blastocistos *in vitro* e número de embriões por sessão de OPU (VIEIRA et al., 2014).

Portanto, mesmo com o intervalo de 48 horas entre a última aplicação do FSH e a OPU utilizado nesta pesquisa e com a maior porcentagem de oócitos viáveis, não foi possível aumentar o número de embriões.

Pondera-se que a viabilidade dos oócitos é somente um indicativo da competência oocitária, baseado em sua morfologia, indicando a capacidade do oóцит para assegurar o desenvolvimento embrionário após a fecundação

(SIRARD, 1989). Além disso, sabe-se que na produção *in vivo* de embriões bovinos, aproximadamente 80% do oócitos ovulados desenvolvem-se até blastocisto, enquanto na PIVE, somente 40% atingem esse estágio (LONERGAN; FAIR, 2008). Pesquisadores (RIZOS et al., 2002; BERTAGNOLLI et al., 2004) apontam que o ambiente de maturação *in vitro* (MIV) influencia essa baixa taxa. Experimentos verificaram que oócitos obtidos de maturação *in vivo*, após estímulo com FSH e GnRH, são mais competentes em se desenvolver até blastocistos do que os maturados *in vitro* (VAN DE LEEMPUT et al., 1999; HUMBLOT et al., 2005), sugerindo que a MIV deve determinar condições subótimas para o desenvolvimento de oócitos imaturos (PEREIRA et al., 2010).

CONCLUSÕES

A superestimulação ovariana em fêmeas bovinas doadoras de oócitos da raça Wagyu com FSH melhorou a quantidade de folículos médios e grandes mas reduziu a taxa de recuperação de oócitos e, apesar da melhor porcentagem de oócitos viáveis, não houve melhora na quantidade de embriões produzidos *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- BARBOSA, C.P.; TONIOLLO, G.H.; GUIMARÃES, E. C. Produção *in vitro* de embriões de bovinos da raça Nelore oriundos de ovócitos de ovários com e sem corpo lúteo. **Ciência Animal Brasileira**, v.14, n.1, p.81-90, 2013.
- BARUSELLI, P. S.; SA FILHO, M. F.; FERREIRA, R. M.; SALES, J. N. D. S.; GIMENES, L. U.; VIEIRA, L. M.; BÓ, G. A. Manipulation of follicle development to ensure optimal oocyte quality and conception rates in cattle. **Reproduction in domestic animals**, v. 47, n. 4, p. 134-141, 2012.
- BERTAGNOLLI, A.C.; GONÇALVES, P.B.D.; GIOMETTI, I.C.; COSTA, L.F.S.; OLIVEIRA, J.F.C.; GONÇALVES, I.D.V.; BARRETO, K.P.; EMANUELLI, I.P.; BORGES, L.F.K. Interação entre células do *cumulus* e atividade da proteína

quinase C em diferentes fases da maturação nuclear de oócitos bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, p.488-496, 2004.

BLONDIN, P.; BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUNGU, H.; BARNES, F.; SIRARD, M. A. Manipulation of Follicular Development to Produce Developmentally Competent Bovine Oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 1, p. 38-43, 2002.

BOTELHO, A.C.F.A. **Indução da ciclicidade em receptoras de embriões equinos: busca por um manejo sustentável**. 2018. Maringá, 45f. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Limpas) – Curso de Pós-graduação em Tecnologias Limpas, Centro Universitário de Maringá.

BURALI, P.H.B. **Avaliação do uso de implantes reutilizáveis de progesterona sobre a taxa de gestação e ressincronização de receptoras Nelore**. 2018. Maringá, 45f. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Limpas) – Curso de Pós-graduação em Tecnologias Limpas, Centro Universitário de Maringá.

CHAGAS, V. M., SILVA, M. A.; VIDAL, E.; MARTINS, J. H.; SANTOS, C.S.; AGUIAR, H.M.V.S.B.; BARROS, C.H.S.C.; CHAVES, R.M.; TORRES-JÚNIOR, J. Fatores anatomo-fisiológicos que afetam a qualidade oocitária em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.34, p.34-38, 2014.

COLOMBO, A.H.B.; CAVALIERI, F.L.B.; ANDREAZZI, M.A.; MORESKI, D.A.B.; BOTELHO, A.C.F.A., SANTOS, J.M.G. avaliação de biotécnicas da reprodução sob o foco ambiental. **Archives of Veterinary Science**, v.22, n.1, p.81-89, 2017.

DE LOOS, F.; VAN VLIET, C.; VAN MAURIK, P.; KURIP, T.A. Morphology of immature bovine oocytes. **Gamete Research**, v.24, p.197–204, 1989.

FERREIRA, A.M.; VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L. S. A.; SÁ, W. F.; PEREIRA, P.A.C. População folicular ovariana durante o ciclo estral em vacas da raça Gir. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.6, 689-1694, 2004.

GOODHAND, K.L.; WATT, R.G.; STAINES, M.E.; HUTCHINSON, J.S.; BROADBENT, P.J. *In vivo* recovery and *in vitro* embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. **Theriogenology**, v.51, p.951-961, 1999.

GOTOH, T.; NISHIMURA, T. KUCHIDA, K.; MANNEN, H. The Japanese Wagyu beef industry: current situation and future prospects - A review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**. v. 31, n.7, p.933-950, 2018.

HASLER, J. F. Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal Theriogenology, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 152-169, 2014.

HUMBLOT, P.; HOLM, P.; LONERGAN, P.; WRENZYCKI, C.; LEQUARRÉ, A.S.; JOLY, C.G.; HERRMANN, D.; LOPES, A.; RIZOS, D.; NIEMANN, H.; CALLESEN, H. Effect of stage of follicular growth during superovulation on developmental competence of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.63, p.1149-1166, 2005.

LABRECQUE, R.; VIGNEAULT, C.; BLONDIN, P.; SIRARD, M.A. Gene expression analysis of bovine oocytes with high developmental competence obtained from FSH-stimulated animals. **Molecular Reproduction & Development**. v.80, p.428–40, 2013.

LONERGAN, P.; MONAGHAN, P.; RIZOS, D.; BOLAND, M.P.; GORDON, I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence

following maturation, fertilization, and culture in vitro, **Molecular Reproduction & Development**, v.37, p. 48-53, 1994.

NIVET, A. N.; BUNEL, A.; LABRECQUE, R.; BELANGER, J.; VIGNEAULT, C.; BLONDIN, P.; SIRARD, M. A. FSH withdrawal improves developmental competence of oocytes in the bovine model. **Reproduction**. v. 143, n. 2, p. 165-171, 2012.

OLIVEIRA, L. H.; SANCHES, C. P.; SEDDON, A. S.; VERAS, M. B.; LIMA, F. A.; MONTEIRO JR, P. L. J.; WILTBANK, M. C.; SARTORI, R. Short communication: Follicle superstimulation before ovum pick-up for in vitro embryo production in Holstein cows. **Science Association American Dairy**. v. 99, n. 11, p. 9307-9312, 2016.

ONGARATTO, F. L.; RODRIGUEZ-VILLAMIL, P.; TRIBULO, A.; BÓ, G. A. Effect of follicle wave synchronization and gonadotropin treatments on the number and quality of cumulus-oocyte complex obtained by ultrasound-guided ovum pick-up in beef cattle. **Animal Reproduction**. v. 12 n. 4, p. 876-883, 2015.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS - ONU/ BRASIL. **FAO: Se o atual ritmo de consumo continuar, em 2050 mundo precisará de 60% mais alimentos e 40% mais água**. Disponível em < <https://nacoesunidas.org/fao-se-o-atual-ritmo-de-consumo-continuar-em-2050-mundo-precisara-de-60-mais-alimentos-e-40-mais-agua>> acessado em 20/05/2019.

PEREIRA, M.M.; COSTA, F.Q.; OLIVEIRA, A.P.; SERAPIÃO, R.V.; MACHADO, M.A.; VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A. Quantificação de transcritos maternos em oócitos bovinos submetidos a diferentes condições de maturação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.6, p.1394-1400, 2010.

RIBEIRO, L.V.P.; RIGOLON, L.P.; CAVALIERI, F.L.B.; SEKO, M.B.; MARTINEZ, A.C.; RIBEIRO, M.G.; MARTINS, R.R.; ÁVILA, M.R.; DE CONTI, J.B. Recuperação de oócitos e produção in vitro de embriões de vacas estimuladas com FSH ou ECG. **Archivos de zootecnia**. V.60, n. 232, p.1021-1029, 2011.

RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction and Development**, v.61, p.234-248, 2002.

RODRIGUES, J. L. Transferência de embriões bovinos - histórico e perspectivas atuais. **Revista Brasileira De Reprodução Animal**, v. 25, n. 2, p. 102-107, 2001.

SARTORI, R.; GIMENES, L. U.; MONTEIRO JR, P. L.; MELO, L. F; BARUSELLI, P. S.; BASTOS, M. R. Metabolic and endocrine differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* females that impact the interaction of nutrition with reproduction. **Theriogenology** v. 86, p. 32–40, 2016.

SILVA, B.L.; BEGA, A.M.; LUCIA, R.F.S.; GONÇALES JÚNIOR, W.A; MARTINEZ, A.C. Avaliação de taxa de recuperação de oócitos em programas de OPU comercial. In. **26º ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 6º ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA JÚNIOR.XXVI**. 2017, Maringá. **Anais ...Maringá: Universidade Estadual de Maringá**, 2017. p.1-4.

SIRARD, M. A.; FLORMAN, H. M.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; BARNES, F. L.; SIMS, M. L.; FIRST, N. L. Timing of nuclear progression and protein synthesis

necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v.40, n.6, 1257-1263, 1989.

UCHIDA, H.; KOBAYASI, J.; INOUE, T.; SUZUKI, K.; OIKAWA, T. Current Level of Reproductive Performances in Japanese Black Cows. **Asian Australasian Journal of Animal Sciences**. v. 15, n. 8, p.1098-1102, 2002.

VAN DE LEEMPUT, E.E.; VOS, P.L.A.M.; ZEINSTRA, E.C.; BEVERS, M.M.; VAN DER WEIJDEN, G.C.; DIELEMAN, S.J. Improved in vitro embryo development using in vivo matured oocytes from heifers superovulated with a controlled preovulatory LH surge. **Theriogenology**, v.52, p.335-349, 1999.

VIEIRA, L. M., RODRIGUES, C. A., CASTRO NETTO, A., GUERREIRO, B. M., SILVEIRA, C. R. A., MOREIRA, R. J. C., SÁ FILHO, M. F., BÓ, G. A., MAPLETOFT, P. S., BARUSELLI, P. S. Superstimulation prior to the ovum pick-up to improve in vitro embryo production in lactating and non-lactating Holstein cows. **Theriogenology**, v. 82, n.2, p. 318-324, 2014.

6. NORMAS DO ARTIGO

DIRETRIZES PARA AUTORES

INSTRUÇÃO AOS AUTORES

O periódico **ARCHIVES OF VETERINARY SCIENCE (AVS)** é publicado trimestralmente, sob orientação do seu Corpo Editorial, com a finalidade de divulgar artigos completos e de revisão relacionados à ciência animal sobre os temas: clínica, cirurgia e patologia veterinária; sanidade animal e medicina veterinária preventiva; nutrição e alimentação animal; sistemas de produção animal e meio ambiente; reprodução e melhoramento genético animal; tecnologia de alimentos; economia e sociologia rural e métodos de investigação científica. A publicação dos artigos científicos dependerá da observância das normas editoriais e dos pareceres dos consultores "ad hoc". Todos os pareceres têm caráter sigiloso e imparcial, e os conceitos e/ou patentes emitidos nos artigos, são de inteira responsabilidade dos autores, eximindo-se o periódico de quaisquer danos autorais. A submissão de artigos deve ser feita diretamente na página da revista (www.ser.ufpr.br/veterinary). Mais informações são fornecidas na seção "Informações sobre a revista".

APRESENTAÇÃO DOS ARTIGOS

Para agilizar a tramitação e publicação de seu artigo, recomendamos fortemente que as normas sejam obedecidas, inclusive para as referências

1. Digitação: O artigo com no máximo vinte e cinco páginas deverá ser digitado em folha com tamanho A4 210 x 297 mm, com margens laterais direita, esquerda, superior e inferior de 2,5 cm. As páginas deverão ser numeradas de forma progressiva no canto superior direito. Deverá ser utilizado fonte arial 12 em espaço duplo; em uma coluna. Tabelas e Figuras com legendas serão inseridas diretamente no texto e não em folhas separadas.

2. Identificação dos autores e instituições (máximo 6 autores por artigo): Todos os dados referentes a autores devem ser inseridos exclusivamente nos metadados no momento da submissão online. Não deve haver nenhuma identificação dos autores no corpo do artigo enviado para a revista. Os autores devem inclusive remover a identificação de autoria do arquivo e da opção Propriedades no Word, garantindo desta forma o critério de sigilo da revista.

3. Tabelas: Devem ser numeradas em algarismo arábico seguido de hífen. O título será inserido na parte superior da tabela em caixa baixa (espaço simples) com ponto final. O recuo da segunda linha deverá ocorrer sob a primeira letra do título. (Ex.: Tabela 1 – Título.). As abreviações devem ser descritas em notas no rodapé da tabela. Estas serão referenciadas por números sobrescritos (1,2,3). Quando couber, os cabeçalhos das colunas deverão possuir as unidades de medida. Tanto o título quanto as notas de rodapé devem fazer parte da tabela, inseridos em "linhas de tabela".

4. Figuras: Devem ser numeradas em algarismo arábico seguido de hífen. O título será inserido na parte inferior da figura em caixa baixa (espaço simples) com ponto final. O recuo da segunda linha deverá ocorrer sob a primeira letra do título (Ex.: Figura 1 – Título). As designações das variáveis X e Y devem ter iniciais maiúsculas e unidades entre parênteses. São admitidas apenas figuras em preto-e-branco. **Figuras coloridas terão as despesas de clicheria e impressão a cores pagas pelo autor.** Nesse caso deverá ser solicitada ao Editor (via ofício) a impressão a cores.

NORMAS EDITORIAIS

Artigo completo - Deverá ser inédito, escrito em idioma português (nomenclatura oficial) ou em inglês. O artigo científico deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Material e Métodos; Resultados; Discussão; Conclusão; Agradecimento(s) (quando houver); Nota informando aprovação por Comitê de Ética (quando houver); Referências.

Artigo de Revisão - Os artigos de revisão deverão ser digitados seguindo a mesma norma do artigo científico e conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; Agradecimento(s) (quando houver); Referências. **A publicação de artigos de revisão fica condicionada à relevância do tema, mérito científico dos autores e disponibilidade da Revista para publicação de artigos de Revisão.**

ESTRUTURA DO ARTIGO

TÍTULO - em português, centralizado na página, e com letras maiúsculas. Logo abaixo, título em inglês, entre parêntesis e centralizado na página, com letras minúsculas e itálicas. Não deve ser precedido do termo título.

RESUMO - no máximo 1800 caracteres incluindo os espaços, em língua portuguesa. As informações devem ser precisas e sumarizar objetivos, material e métodos, resultados e conclusões. O texto deve ser justificado e digitado em parágrafo único e espaço duplo. Deve ser precedido do termo “Resumo” em caixa alta e negrito.

PALAVRAS-CHAVE – inseridas abaixo do resumo. Máximo de cinco palavras em letras minúsculas, separadas por ponto-e-vírgula, em ordem alfabética, retiradas exclusivamente do artigo, não devem fazer parte do título, e alinhado a esquerda. Não deve conter ponto final. Deve ser precedido do termo “Palavras-chave” em caixa baixa e negrito.

ABSTRACT - deve ser redigido em inglês, refletindo fielmente o resumo e com no máximo 1800 caracteres. O texto deve ser justificado e digitado em espaço **duplo**, em parágrafo único. Deve ser precedido do termo “Abstract” em caixa alta e negrito.

KEY WORDS - inseridas abaixo do abstract. Máximo de cinco palavras em letras minúsculas, separadas por ponto-e-vírgula, em ordem alfabética, retiradas exclusivamente do artigo, não devem fazer parte do título em inglês, e alinhado a esquerda. Não precisam ser traduções exatas das palavras-chave e não deve conter ponto final. Deve ser precedido do termo “Key words” em caixa baixa e negrito.

INTRODUÇÃO – abrange também uma breve revisão de literatura e, ao final, os objetivos. O texto deverá iniciar sob a primeira letra da palavra “Introdução” (escrita em caixa alta e negrito), com recuo da primeira linha do parágrafo a 1,0 cm da margem esquerda.

MATERIAL E MÉTODOS - o autor deverá ser preciso na descrição de novas metodologias e adaptações realizadas nas metodologias já consagradas na experimentação animal. Fornecer referência específica original para todos os procedimentos utilizados. Não usar nomes comerciais de produtos. O texto deverá iniciar sob a primeira letra do termo “Material e Métodos” (escrito em caixa alta e negrito), com recuo da primeira linha do parágrafo a 1,0 cm da margem esquerda.

RESULTADOS (O item Resultados e o item Discussão podem ser apresentados juntos, na forma RESULTADOS e DISCUSSÃO, ou em itens separados)

o texto deverá iniciar sob a primeira letra da palavra “Resultados” (escrita em caixa alta e negrito), com recuo da primeira linha do parágrafo a 1,0 cm da margem esquerda. Símbolos e unidades devem ser listados conforme os exemplos: Usar **36%**, e não 36 % (não usar espaço entre o no e %); Usar **88 kg**, e não 88Kg (com espaço entre o no e kg, que deve vir em minúsculo); Usar **42 mL**, e não 42 ml (litro deve vir em L **maiúsculo**, conforme padronização internacional); Usar **25oC**, e não 25 oC (sem espaço entre o no e oC); Usar **(P<0,05)** e não (p < 0,05); Usar **r² = 0,89** e não r²=0,89; Nas tabelas inserir o valor da probabilidade como “valor de P”; Nas tabelas e texto utilizar média ± desvio padrão (15,0 ± 0,5). Devem ser evitadas abreviações não-consagradas, como por exemplo: “o T3 foi maior que o T4, que não diferiu do T5 e do T6”. Este tipo de redação é muito cômodo para o autor, mas é de difícil compreensão para o leitor. Escreva os resultados e apresente suporte com dados. Não seja redundante incluindo os mesmos dados ou resultados em tabelas ou figuras.

DISCUSSÃO - o texto deverá iniciar sob a primeira letra da palavra “Discussão” (escrita em caixa alta e negrito), com recuo da primeira linha do parágrafo a 1,0 cm da margem esquerda. Apresente a sua interpretação dos seus dados. Mostre a relação entre fatos ou generalizações reveladas pelos seus resultados. Aponte exceções ou aspectos ainda não resolvidos. Mostre

como os seus resultados ou interpretações concordam com trabalhos previamente publicados ou discordam deles, mas apresente apenas trabalhos originais, evitando citações de terceiros. Discuta os aspectos teóricos e/ou práticos do seu trabalho. Pequenas especulações podem ser interessantes, porém devem manter relação factual com os seus resultados. Afirmações tais como: "Atualmente nós estamos tentando resolver este problema..." não são aceitas. Referências a "dados não publicados" não são aceitas. Conclua sua discussão com uma curta afirmação sobre a significância dos seus resultados.

CONCLUSÕES - preferencialmente redigir a conclusão em parágrafo único, baseada nos objetivos. Devem se apresentar de forma clara e sem abreviações. O texto deverá iniciar sob a primeira letra da palavra "Conclusão" (escrita em caixa alta e negrito), com recuo da primeira linha do parágrafo a 1,0 cm da margem esquerda.

AGRADECIMENTOS - os agradecimentos pelo apoio à pesquisa serão incluídos nesta seção. Seja breve nos seus agradecimentos. Não deve haver agradecimento a autores do trabalho. O texto deverá iniciar sob a primeira letra da palavra "Agradecimento" (escrita em caixa baixa).

NOTAS INFORMATIVAS - quando for o caso, antes das referências, deverá ser incluído parágrafo com informações e número de protocolo de aprovação da pesquisa pela Comissão de Ética e ou Biossegurança. (quando a Comissão de Ética pertencer à própria instituição onde a pesquisa foi realizada, deverá constar apenas o número do protocolo).

REFERÊNCIAS - o texto deverá iniciar sob a primeira letra da palavra "Referências" (escrita em caixa alta e negrito). Omitir a palavra bibliográficas. Alinhada somente à esquerda. Usar como base as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT (NBR 10520 (NB 896) - 08/2002). Devem ser redigidas em página separada e ordenadas alfabeticamente pelo(s) sobrenome(s) do(s) autor(es). Os destaques deverão ser em NEGRITO e os nomes científicos, em ITÁLICO. NÃO ABREVIAR O TÍTULO DOS PERIÓDICOS. Indica-se o(s) autor(es) com entrada pelo último sobrenome seguido do(s) prenome(s) abreviado (s), exceto para nomes de origem espanhola, em que entram os dois últimos sobrenomes. Mencionam-se os autores separados por ponto e vírgula. Digitá-las em espaço simples e formatá-las segundo as seguintes instruções: no menu FORMATAR, escolha a opção PARÁGRAFO... ESPAÇAMENTO...ANTES...6 pts. **Exemplo de como referenciar:**

ARTIGOS DE PERIÓDICOS:

(citar os 3 primeiros autores seguido de "et al.")

JOCHLE, W.; LAMOND, D.R.; ANDERSEN, A.C. et al. Mestranol as an abortifacient in the bitch. *Theriogenology*, v.4, n.1, p.1-9, 1975.

Livros e capítulos de livro. Os elementos essenciais são: autor(es), título e subtítulo (se houver), seguidos da expressão "In:", e da referência completa como um todo. No final da referência, deve-se informar a paginação. Quando a editora não é identificada, deve-se indicar a expressão *sine nomine*, abreviada, entre colchetes [s.n.]. Quando o editor e local não puderem ser indicados na publicação, utilizam-se ambas as expressões, abreviadas, e entre colchetes [S.I.: s.n.].

REFERÊNCIA DE LIVROS (*in totum*):

BICHARD, S.J.; SHERDING, R.G. **Small animal practice**. Philadelphia : W.B. Saunders, 1997. 1467 p.

REFERÊNCIA DE PARTES DE LIVROS: (Capítulo com autoria)

SMITH, M. Anestrus, pseudopregnancy and cystic follicles. In: MORROW, D.A. **Current Therapy in Theriogenology**. 2.ed. Philadelphia : W.B. Saunders, 1986, Cap.x, p.585-586.

REFERÊNCIA DE PARTES DE LIVROS: (Capítulo sem autoria)

COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In_____. **Sampling techniques**. 3.ed. New York : John Wiley, 1977. Cap.4., p.72-90.

OBRAS DE RESPONSABILIDADE DE UMA ENTIDADE COLETIVA: A entidade é tida como autora e deve ser escrita por extenso, acompanhada por sua respectiva abreviatura. No texto, é citada somente a abreviatura correspondente. Quando a editora é a mesma instituição responsável pela autoria e já tiver sido mencionada, não é indicada.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY - AOAC. **Official methods of analysis.** 16.ed. Arlington: AOAC International, 1995. 1025p.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA - UFV. **Sistema de análises estatísticas e genéticas - SAEG.** Versão 8.0. Viçosa, MG, 2000. 142p.

REFERÊNCIA DE TESE/DISSERTAÇÃO/MONOGRAFIA:

BACILA, M. **Contribuição ao estudo do metabolismo glicídico em eritrócitos de animais domésticos.** 1989. Curitiba, 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná.

REFERÊNCIA DE PUBLICAÇÕES EM CONGRESSOS:

KOZICKI, L.E.; SHIBATA, F.K. Perfil de progesterona em vacas leiteiras no período do puerpério, determinado pelo radioimunoensaio (RIA). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, XXIV., 1996, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Sociedade Goiana de Veterinária, 1996, p. 106-107.

RESTLE, J.; SOUZA, E.V.T.; NUCCI, E.P.D. et al. Performance of cattle and buffalo fed with different sources of roughage. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 4., 1994, São Paulo. **Proceedings...** São Paulo: Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos, 1994. p.301-303.

REFERÊNCIA DE ARTIGOS DE PERIÓDICOS ELETRÔNICOS: Quando se tratar de obras consultadas *on-line*, são essenciais as informações sobre o endereço eletrônico, apresentado entre os sinais < >, precedido da expressão “Disponível em: xx/xx/yyyy” e a data de acesso do documento, precedida da expressão “Acesso em: xx/xx/yyyy.”

PRADA, F.; MENDONÇA Jr., C. X.; CARCIOFI, A. C. [1998]. Concentração de cobre e molibdênio em algumas plantas forrageiras do Estado do Mato Grosso do Sul. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.35, n.6, 1998. Disponível em: <http://www.scielo.br/> Acesso em: 05/09/2000.

MÜELLER, Suzana Pinheiro Machado. A comunicação científica e o movimento de acesso livre ao conhecimento. Ciência da Informação, Brasília, v. 35, n. 2, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-19652006000200004&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 13/05/2007.

REBOLLAR, P.G.; BLAS, C. [2002]. **Digestión de la soja integral em ruminantes.** Disponível em: http://www.ussoymeal.org/ruminant_s.pdf. Acesso em: 12/10/2002.

SILVA, R.N.; OLIVEIRA, R. [1996]. Os limites pedagógicos do paradigma da qualidade total na educação. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA URPe, 4., 1996, Recife. **Anais eletrônico...** Recife: Universidade Federal do Pernambuco, 1996. Disponível em: <http://www.propesq.ufpe.br/anais/anais.htm> Acesso em: 21/01/1997.

CITAÇÃO DE TRABALHOS PUBLICADOS EM CD ROM: Na citação de material bibliográfico publicado em CD ROM, o autor deve proceder como o exemplo abaixo:

EUCLIDES, V.P.B.; MACEDO, M.C.M.; OLIVEIRA, M.P. Avaliação de cultivares de *Panicum maximum* em pastejo. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 36., 1999, Porto Alegre. **Anais...** São Paulo: Gmosis, 1999, 17par. CD-ROM. Forragicultura. Avaliação com animais. FOR-020.

INSTITUTO BRASILEIRO DE INFORMAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA. **Bases de dados em Ciência e Tecnologia.** Brasília, n. 1, 1996. CD-ROM.

E-mail Autor, < e-mail do autor. “Assunto”, Data de postagem, e-mail pessoal, (data da leitura)

Web Site Autor [se conhecido], “Título”(título principal, se aplicável), última data da revisão [se conhecida], < URL (data que foi acessado)

FTP Autor [se conhecido] “Título do documento”(Data da publicação) [se disponível], Endereço FTP (data que foi acessado)

CITAÇÕES NO TEXTO: As citações no texto deverão ser feitas em caixa baixa. Quando se tratar de dois autores, ambos devem ser citados, seguido apenas do ano da publicação; três ou mais autores, citar o sobrenome do primeiro autor seguido de et al. obedecendo aos exemplos abaixo:

Silva e Oliveira (1999)

Schmidt et al. (1999)

(Silva et al., 2000)

Archives of Veterinary Science

Setor de Ciências Agrárias

Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

Rua dos Funcionários, 1540 80035-050 - Curitiba - Paraná - Brasil

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos neste estudo, conclui-se que a superovulação associada ao *coasting* de FSH, melhorou a quantidade de folículos, contudo, reduziu a taxa de recuperação de complexos cumulus-oócitos, revelando que esta técnica não foi capaz de contribuir com a sustentabilidade da cadeia produtiva bovina.

Desta forma, não se recomendada este protocolo como estratégia reprodutiva para fêmeas bovinas doadoras de oócitos da raça Wagyu.

ANEXO 1.



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE MARINGÁ



PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E EXTENSÃO

DIRETORIA DE PESQUISA/COBAC

PARECER

USO EXCLUSIVO COBAC			
PROTOCOLO Nº	004/2018	PARECER	004/2018.3
PROTOCOLADO EM:	21/11/2018	ESPÉCIE ANIMAL:	Bovino
SEXO:	F	IDADE APROXIMADA:	1-2 anos
QUANTIDADE:	15	PESO APROXIMADO:	350 Kg

I – IDENTIFICAÇÃO

() PROJETO DE ENSINO (X) PROJETO DE PESQUISA () PROJETO DE EXTENSÃO () PLANO DE AULA

II – PESQUISADOR RESPONSÁVEL

Prof. Dr. Fabio Luiz Bim Cavalieri

III – INSTITUIÇÃO/DEPARTAMENTO

UNICESUMAR/Ciências Biológicas e da Saúde

IV – TÍTULO DO PROJETO

Protocolo de superovulação associada ao coasting de FSH em doadoras de óócitos para produção in vitro de embriões

V – CONSIDERAÇÕES DO PARECERISTA

1. Reescrever resumo do projeto focando nos objetivos e procedimentos experimentais (OK)
2. Justificar (análise estatística) o número amostral (12 animais). Sugiro que seja incluído no item 9.4 o cálculo amostral e uma referência bibliográfica (OK)
3. Indicar número de animais por área (item 9.6) (OK)
4. Indicar tipo de estresse (estresse de contenção?) no item 10.1; (OK)
5. Indicar corretamente a dose (item 10.2); (OK)
6. Justificativa de ausência de analgésico dever ser justificado por referência científica (item 10.4); (OK)
7. Alterar cronograma de atividades; (OK)

VI – SITUAÇÃO

(X) APROVADO

() PENDENTE

() REPROVADO

De acordo,

Data Reunião: 04/12/2018

Coordenador do CEUA

DIRETORIA DE PESQUISA
COBAC – Comitê de Bioética do Cesumar
Av. Guedner, nº 1610 Bl. 7 Térreo Fone/Fax: (0**44) 3027-6360 Ramal 345
CEP 87050-390 – Maringá – Paraná
e-mail: cobac@cesumar.br site: www.cesumar.br/pesquisa