

**A SOMATOTROPINA BOVINA RECOMBINAMENTO (rbST) NA
SUPEROVULAÇÃO DE FÊMEAS BOVINAS**
(Bovine somatotropin –rbST- on females bovines superovulation)

NAGANO, A.Y.; WEISS, R.R.; BÜCHELE, J.M.; MURADAS, P.R.; GRANEMANN, L.C.

RESUMO – No presente estudo, foi avaliada a ação da Somatotropina Bovina recombinante (rbST) sobre a superovulação nas fêmeas bovinas, bem como seus efeitos sobre a produção e o desenvolvimento embrionário. No estudo foram utilizadas ($n=8$) novilhas Blonde d'Aquitane, que foram superovuladas duas vezes como grupo controle, ou seja, sem rbST e duas vezes como grupo tratado com rbST, totalizando 32 colheitas, sendo 16 para cada delineamento experimental. A análise dos resultados teve como objetivo avaliar a produção de embriões, viáveis, degenerados e infertilizados, além das diferenças entre os estádios de desenvolvimento embrionário, onde foram evidenciadas diferenças significativas ($p<0,01$) para a produção de embriões totais e viáveis, ocorrendo contudo diferença significativa entre embriões degenerados ou infertilizados e entre estágios de desenvolvimento embrionário.

Palavras chave: rbST, superovulação, transferência de embrião, vacas.

ABSTRACT – At this present study, was evaluated the action of bovine recombinant somatotropin (rbST), on female bovines superovulation, and their effects in embryonic production and development. To at this study were used ($n=8$) heifers of breed Blonde d'Aquitane, they were superovulated twice like a control group and twice a treatment group with rbST, totalizing 32 collections or 16 for each experimental line. The analyze of the results had the objective to evaluate the total embryo production, the viable, degenerate, unfertilized ova and embryonic development stages. There are significant differences ($p<0,01$) for total and viable embryo production, but there aren't showed significant differences among degenerated or unfertilized ova, and embryonic development stage.

Key words: rbST, superovulation, embryo transfer, cows.

Introdução

O desenvolvimento da seleção e dos sistemas de produção animal foi a alavanca para o surgimento e o crescimento das biotecnologias de reprodução estudadas na Inglaterra a partir do século XIX (RODRIGUES, 2001). Em 1951, WILLET *et al.* reportaram o primeiro bezerro nascido através de transferência de embriões (TE). Neste período as grandes barreiras eram a ausência de procedimentos adequados para a estimulação ovariana, de técnicas eficientes para a colheita, transferência e a manutenção dos embriões fora do ambiente uterino.

Atualmente a indústria da reprodução animal no mundo, movimenta valores anuais em torno de cinco bilhões de dólares. Dentro deste contexto a TE é ferramenta que possibilita aumentar o potencial reprodutivo de fêmeas consideradas excepcionais, principalmente como instrumento para acelerar o progresso dos programas de seleção animal (RODRIGUES, 2001). O maior entrave dos programas de TE

continua sendo o elevado custo e a variabilidade da resposta ao tratamento superovulatório entre as doadoras. Apesar do intenso número de pesquisas desenvolvidas em diversos países ainda não existe um protocolo capaz de contornar este problema; entretanto, alguns protocolos que sincronizam o desenvolvimento da onda folicular têm se revelado especialmente úteis por facilitarem o manejo das doadoras e produzirem o mesmo número de embriões dos tratamentos tradicionais utilizados.

Vários estudos têm mostrado que a somatotropina bovina (rbST) tem a capacidade de aumentar o número de folículos recrutados e, portanto, de embriões viáveis após diferentes tratamentos superovulatórios.

O rbST ou hormônio do crescimento foi um dos primeiros fatores de crescimento produzidos em escala comercial com proteína recombinante (BAUMAN, 1999). A maior quantidade de receptores para o rbST é encontrada no fígado, onde é responsável pela produção de um fator de crescimento semelhante a insulina, o IGF-1.

Entretanto a maioria dos outros tecidos também responde ao rbST. Sobre o sistema reprodutor, o hormônio atua sobre os receptores do útero e ovário induzindo à produção de IGF-1 (LUCY, 2000).

Vacas selecionadas por apresentarem parto gemelar têm maior concentração sérica de IGF-1 e maior número de folículos antrais e secundários (CUSHMAN *et al.*, 2000). MOREIRA *et al.* (2002a) observaram que a rbST diminui o número de instruturas infertilizadas, melhora a taxa de sobrevivência embrionária e acelera o desenvolvimento embrionário. Por sua vez GONG *et al.* (1993) demonstraram que a rbST é capaz de aumentar a resposta superovulatória, em vacas tratadas com FSH durante cinco dias após a aplicação de 500mg de rbST.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influencia da rbST sobre a produção quantitativa e qualitativa de embriões.

Material e Métodos

Foram utilizadas oito novilhas da raça Blonde d'Aquitaine de uma propriedade no município de Três Barras – SC. As fêmeas foram divididas aleatoriamente em 2 grupos iguais, sendo superovulados 4 vezes cada um, com intervalo mínimo de 45 e máximo de 60 dias entre as superovulações. Na 1^a superestimulação ovariana, um dos grupos recebeu somatotropina bovina recombinante (rbST) e o outro não. Na seqüência, o grupo que recebeu rbST na 1^a vez não recebeu na 2^a, e os grupos se alternaram na 3^a e 4^a série, de modo que cada novilha serviu duas vezes de unidade experimental e duas vezes de grupo controle.

O protocolo se iniciou com um implante intraauricular de 1,9g de progesterona em um período aleatório do ciclo, denominado de dia zero; neste dia metade das doadoras (4 animais); recebeu 500mg de somatotropina bovina recombinante ™. No dia seguinte (Dia 1), todas as doadoras receberam 5mg de benzoato de estradiol. No Dia 5 as doadoras começaram a receber o hormônio folículo estimulante (FSH) divididos em 8 doses, decrescentes, aplicadas duas vezes ao dia por

4 dias consecutivos (40-30-30-20mg/bid). Na 5^a administração de FSH as doadoras receberam 500mcg de cloprosteno sódico e na 6^a aplicação de FSH foi retirado o implante de progesterona. As novilhas foram inseminadas 12 e 24h após o início do estro, ou 60 a 72h após a aplicação de PGF2α nas doadoras que não demonstraram cio. Foi usado sêmen de dois touros de fertilidade conhecida para as inseminações e todas as novilhas, dos dois grupos, foram inseminadas com o mesmo touro em cada repetição.

Sete dias após o estro, as novilhas foram submetidas às coletas de embriões e as estruturas foram avaliadas sob estereomicroscópio com aumento de 50-80 vezes e classificadas segundo critérios da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) (1998).

Embriões nos estádios 2 e 3 de desenvolvimento (2-12 células e mórula inicial, respectivamente), assim como os graus 3 e 4 de qualidade (pobres e mortos/degenerados, respectivamente) foram classificados coletivamente em degenerados. Somente embriões nos estádios 4 a 7 de desenvolvimento (mórula, blastocisto inicial, blastocisto e blastocisto expandido) e com grau 1 e 2 de qualidade (excelente/bom e regular) foram congelados e avaliados como embriões viáveis.

Após a colheita e avaliação os embriões viáveis foram colocados em um meio de congelamento comercial contendo 1,4M de etileno glicol, envasados em palhetas francesas de 0,25ml e após 10 minutos de tempo de exposição à solução crioprotetora foram transferidos para um aparelho de congelamento de embriões.

O delineamento estatístico utilizado o de blocos ao acaso com quatro repetições. Buscou-se diferenças estatísticas para os efeitos de tratamento com somatotropina bovina, número de colheitas e doadoras sobre a produção de embriões e o desenvolvimento embrionário bem como a expressão do estro nas doadoras superovuladas.

As análises estatísticas incluíram análise de variância (ANOVA) e coeficiente de variação. As diferenças de médias foram comparadas pelo teste de Tukey para o nível de 5%.

Resultados

Foi observada maior quantidade de embriões e ovócitos totais, assim como maior número de embriões viáveis nas colheitas conduzidas no grupo tratado com rbST. Os valores médios observados para o número total de ovócitos e embriões dos grupos tratados com rbST e controle, diferiam ao nível de 5%, assim como

os valores médios para o número de embriões viáveis em cada grupo. Entretanto o número de embriões degenerados e infertilizados não deferiu entre os grupos tratados e controles. O coeficiente de variação mostrou-se bastante elevado, sobretudo para o número de embriões degenerados e de infertilizados, demonstrando que a variação individual da resposta superovulatória é significativa (TABELA 1).

TABELA 1 – VALORES MÉDIOS, DESVIO PADRÃO, VALORES DE F E COEFICIENTE DE VARIAÇÃO REFERENTES AO NÚMERO TOTAL DE EMBRIÕES E OVÓCITOS COLHIDOS, EMBRIÕES VIÁVEIS, EMBRIÕES DEGENERADOS E INFERTILIZADOS PARA NOVILHAS DA RAÇA BLONDE D'AQUITAIN NO GRUPO DE TRATAMENTO COM rbST E NO GRUPO CONTROLE.

		Média	Desvio-padrão	Valor F	Coef. Variação
Total de Óvulos e Embriões	bST	10,25 ^a	2,5	9,273	33,41
	Controle	7,125 ^b	3,2		
Embriões Viáveis	bST	8,4375 ^c	2,0	13,281	32,71
	Controle	5,5 ^d	2,4		
Embriões Degenerados	bST	1,4375 ^e	0,7	2,623	73,53
	Controle	0,9375 ^e	0,9		
Infertilizados	bST	0,375 ^f	0,5	1,777	124,80
	Controle	0,6875 ^f	0,7		

^{a,b,c,d,e,f} letras diferentes na mesma coluna, indicam valores que diferem estatisticamente entre si ($p<0,05$).

Foram observadas diferenças ao nível de 5% pelo teste de Tukey para número total de embriões e ovócitos, embriões viáveis e infertilizados entre as

diferentes doadoras. Não foram observadas diferenças para o número de embriões degenerados, entre as doadoras (TABELA 2).

TABELA 2 – DIFERENÇAS DE MÉDIAS OBSERVADAS PELO TESTE DE TUKEY AO NÍVEL DE 5% PARA O NÚMERO TOTAL DE EMBRIÕES E ÓVULOS, EMBRIÕES VIÁVEIS E INFERTILIZADOS.

Novilhas	Média	Embriões viáveis		Óvulos Infertilizados	
		Novilha	Média	Novilha	Média
3	12.00 ^a	4	9.75 ^a	3	1.50
4	12.00 ^a	3	8.50 ^{ab}	4	1.00
2	8.75 ^{ab}	2	7.00 ^{ab}	2	0.50
7	8.75 ^{ab}	8	7.00 ^{ab}	5	0.50
8	8.00 ^{ab}	7	6.75 ^{ab}	6	0.25
5	7.50 ^{ab}	1	6.25 ^{ab}	7	0.25
1	6.75 ^b	5	6.25 ^{ab}	8	0.25
6	5.75 ^b	6	4.25 ^b	1	0.00

^{a,b} letras diferentes na mesma coluna indicam valores que diferem estatisticamente entre si ($p<0,05$).

A influência do rbST sobre o desenvolvimento embrionário pode ser observada na TABELA 3. Para o estádio de desenvolvimento embrionário os dados são apresentados em porcentagem e foram transformados em função logarítmica

($\text{Log}_{10} + 1$). O tratamento com rbST aumentou a proporção de embriões nos estádios de mórula e de blastocisto de maneira significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), mas não afetou a proporção de blastocisto e blastocisto expandido.

TABELA 3 – VALORES MÉDIOS PORCENTUAIS, DESVIO PADRÃO, VALORES DE F E COEFICIENTE DE VARIAÇÃO REFERENTES AOS ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO PARA NOVILHAS DA RAÇA BLONDE D'AQUITAINE TRATADAS COM rbST E CONTROLE.

		Média	Desvio-padrão	Valor	Coef. Variação
Mórula	bST	32,1 ^a	15,4	5,977	49,98
	Controle	22,7 ^b	34,5		
Blastocisto inicial	bST	37,8 ^c	13,3	5,443	30,80
	Controle	57,2 ^d	34,6		
Blastocisto	bST	25,3 ^e	13,6	6,508	61,23
	Controle	4,2 ^f	24,5		
Blastocisto expandido	bST	7,3 ^g	10,9	0,011	189,44
	Controle	5,3 ^g	7,8		

a,b,c,d,e,f,g letras diferentes na mesma coluna indicam valores que diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

Os coeficientes de variação são elevados, sobretudo para embriões degenerados demonstrando a grande variabilidade na resposta superovulatória, tanto no grupo tratado como no grupo controle, assim como nas diferentes colheitas da mesma doadora.

A terceira variável avaliada foi a taxa de detecção de estro nas novilhas doadoras, mas o resultado foi igual nos dois grupos (100% em ambos os casos), não sendo possível realizar a análise estatística, por não existir diferença entre os grupos.

Discussão

Semelhantemente ao que foi observado por GONG *et al.* (1993), KUEHNER *et al.* (1993), HERRLER *et al.* (1994) e GONG *et al.* (1996), o uso da rbST aumentou o número de total de embriões e ovócitos, além de embriões viáveis. Segundo GONG *et al.* (1996), o aumento do número de embriões colhidos após tratamento com FSH se deve ao aumento do número de pequenos folículos nos ovários induzido pelo tratamento com rbST. ROMERO *et al.* (1991) relataram que a produção de embriões após superovulação é diretamente proporcional ao número de pequenos folículos, com 3-6 mm de

diâmetro, presente nos ovários ao início do tratamento.

Neste experimento não foram encontradas diferenças significativas entre embriões degenerados e infertilizados, diferindo dos resultados de MOREIRA *et al.* (2002a), que atribuíram à rbST o aumento da taxa de fertilização e melhoria na qualidade dos embriões. LUCY *et al.* (1995) citam que o aumento da taxa de fertilização e melhoria na qualidade dos embriões pode ser efeito direto da rbST ou por aumento das concentrações de IGF-1.

Neste experimento a rbST afetou significativamente o desenvolvimento embrionário com aumento na proporção de mórulas e blastocistos, além da diminuição da proporção dos blastocistos iniciais, contrapondo-se aos relatos de MAFFILI *et al.* (2001), os quais relataram que o uso da rbST em conjunto à superovulação não aumenta a quantidade de embriões produzidos, mas melhora a sua qualidade e desenvolvimento. Segundo MOREIRA *et al.* (2002b) e MTANGO *et al.* (2003) a adição da somatotropina ao meio de cultura melhorou a taxa de clivagem e o desenvolvimento embrionário.

Como já citado por HAHN (1992), a variabilidade na resposta superovulatória em

bovinos é grande e mesmo nos experimentos com gêmeos idênticos, não mais do que 50% da variância pode ser explicada. O elevado grau de variabilidade inexplicável leva à hipótese que esta, tenha uma função biológica especial, suportando a seleção natural ao longo do tempo. No presente trabalho os efeitos do rbST sobre os estádios de desenvolvimento embrionário foram afetados em função da alta variabilidade da resposta, aumentando a distribuição dos embriões no estádio de mórula e de blastocisto, reduzindo porém no estádio de blastocisto inicial.

Quanto à manifestação do estro, LUCY (2001) relata que o menor número de vacas com maior intervalo entre partos está associado a uma menor manifestação do estro em vacas tratadas com rbST. Em outros relatos, a taxa de detecção de estro foi de 100% para as vacas controle e 57% nas vacas tratadas com rbST (KIRBY *et al.*, 1997). Entretanto neste trabalho não foi observada diferença significativa na taxa de manifestação do estro entre as vacas tratadas e controle.

Conclusão

A ação da somatotropina bovina: aumentou o número total de embriões e ovócitos e o número de embriões viáveis, mas não influenciou o número de embriões degenerados e infertilizados; alterou o desenvolvimento embrionário e não alterou a manifestação do estro em novilhas superovuladas.

Referências

- BAUMAN, D.E. Bovine somatotropin and lactation: from basic science to commercial application. **Domestic animal Endocrinology**, New York, v.17, p.101-116, 1999.
- CUSHMAN, R.A.; HELGPETH, V.S.; ECHTERNKAMP, S.E.; BRITT, J.H. Evaluation of microscopic and macroscopic follicles in cattle selected for twinning. **Journal of Animal Science**, Savoy, v.78, p.1564-1567, 2000.
- GONG, J.G.; BRAMLEY, T.A.; WILMUT, I.; WEBB, R. Effect of recombinant bovine somatotropin on the superovulatory response to pregnant mare serum gonadotropin in heifers. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.47, p.1141-1149, 1993.
- GONG, J.G.; BRAMLEY, T.A.; WILMUT, I.; WEBB, R. Pretreatment with recombinant bovine somatotropin enhances the superovulatory response to FSH in heifers. **Theriogenology**, New York, v.45, p.611-622, 1996.
- HAHN, J. Attempts to explain and reduce variability of superovulation. **Theriogenology**, New York, v.38, p.269-275, 1992.
- HERRLER, A.; EINSPANIER, R.; SCHAMS, D.; NIEMAN, H. Effect of recombinant bovine somatotropin on follicular IGF-1 contents and the ovarian response following superovulation treatment in dairy cows: A preliminary study. **Theriogenology**, New York, v.41, p.601-611, 1994.
- IETS. **Manual da sociedade internacional de transferência de embriões**. 3. ed. Illinois: Stringfellow, D.A. & Seidel, 1998.
- KIRBY, C.J.; SMITH, M.F.; KEISLER, D.H.; LUCY, M.C. Follicular function in lactating dairy cows treated with sustained-release bovine somatotropin. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.75, p.1461-1464, 1997
- KUEHNER, L.F.; RIEGER, D.; WALTON, J.S.; ZHAO, X.; JOHNSON, W.H. The effect of a depot injection of recombinant bovine somatotropin on follicular development and embryo yield in superovulation Holstein heifers. **Theriogenology**, New York, v.35, p.1003-1013, 1993.
- LUCY, M.C. Regulation of follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.83, p.1635-1647, 2000.
- LUCY, M.C. Expectativas de índices reprodutivos em vacas leiteiras tratadas com somatotropina bovina. In: CURSO NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 5., 2001, Uberlândia, **Anais...**, Uberlândia, 2001, p.47-55.
- LUCY, M.C.; TATCHER, W.W.; COLLIER, R.J.; SIMMEN, F.A.; KO, Y.; SAVID, J.D. Effects of somatotropin on the conceptus, uterus, and ovary during maternal recognition of pregnancy in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v.12, p.73-82, 1995.
- MAFFILI, V.V.; TORRES, C.A.A.; BORGES, A.M.; AMORIN, L.S. Efeitos da somatotropina bovina na resposta superovulatória e na taxa de clivagem de zigotos de camundongos (*Mus musculus*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.25, n.3, p.377-379, 2001.
- MOREIRA, F.; BADINGA, L.; BURNLEY, C.; TATCHER, W.W. Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. **Theriogenology**, New York, v.57, p.1371-1387, 2002a.

MOREIRA, F.; PAULA-LOPES, F.F.; HANSEN, P.J.; BADINGA, L.; THATCHER, W.W. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on development of vitro derived bovine embryos.

Theriogenology, New York, v.57, p.895-907, 2002b.

MTANGO, N.R.; VARISANGA, M.D.; DONG, Y.J.; RAJAMAHENDRAN, R.; SUZUKI, T. Growth factors and growth hormone enhance in vitro embryo production and post-thaw survival of vitrified bovine blastocysts. **Theriogenology**, New York, v.59, p.1393-1402, 2003.

RODRIGUES, J.L. Transferência de embriões bovinos: histórico e perspectivas atuais. **Revista Brasileira de Reprodução**, Belo Horizonte, v.25, p.102-107, 2001.

ROMERO, A.; ALBERT, J.; BRINK, Z.; WEBB, R. Numbers of small follicles in ovaries affects superovulation response in cattle. **Theriogenology**, New York, v.35, p.265-275, 1991.

WILLETT, E.L.; BLACK, W.G.; CASIDA, L.E.; STONE, W.H.; BUCKNER, P.J. Success of transplantation of a fertilized bovine ovum. **Science**, Washington, v.113, p.247, 1951.

Recebido para publicação: 30/06/2004

Aprovado: 15/10/2004