

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

Tratamentos hormonais e seus efeitos sobre a produção de embriões bovinos
in vivo e in vitro

Monique Mazzarollo Frata

Pelotas, 2021

Monique Mazzarollo Frata

**Tratamentos hormonais e seus efeitos sobre a produção de embriões bovinos
*in vivo e in vitro***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Bernardo Garziera Gasperin

Coorientador: Arnaldo Diniz Vieira

Pelotas, 2021

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

F845t Frata, Monique Mazzarollo

Tratamentos hormonais e seus efeitos sobre a produção de embriões bovinos *in vivo* e *in vitro* / Monique Mazzarollo Frata ; Bernardo Garziera Gasperin, orientador ; Arnaldo Diniz Vieira, coorientador. — Pelotas, 2021.

48 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. Embrião. 2. TE. 3. CCOs. 4. PIVE. 5. MOET. I. Gasperin, Bernardo Garziera, orient. II. Vieira, Arnaldo Diniz, coorient. III. Título.

CDD : 636.2089

Monique Mazzarollo Frata

Tratamentos hormonais e seus efeitos sobre a produção de embriões bovinos *in vivo*
e *in vitro*

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 21/06/2021

Banca examinadora:

Prof. Dr. Bernardo Garziera Gasperin (Orientador)
Doutor em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria

Dr^a. Lígia Margareth Cantarelli Pegoraro
Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Marcos Henrique Barreta
Doutor em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria

Dr. Werner Giehl Glanzner
Doutor em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria

Agradecimentos

Sou imensamente grata à vida, cada oportunidade vivida possibilitou que eu chegasse até aqui;

Obrigada aos companheiros de jornada que possibilitaram a realização deste trabalho:

Meu orientador, professor Bernardo Garziera Gasperin, demais professores, pós-graduandos e graduandos do ReproPel;

Ao meu companheiro Wagner Marques de Lima e demais colegas da empresa Biotec Serviços de Apoio À Pecuária;

A minha família que sempre foi minha base e me incentivou prosseguir nos estudos;

A minha filha Giovana Frata de Lima, que veio ao mundo durante a realização deste mestrado e no início de um novo projeto profissional, ensinando-me que *“Filhos não são uma distração que nos impedem de fazer um trabalho importante. Eles são o trabalho importante”* (C. S. Lewis).

A todos, meu sincero obrigado.

Resumo

FRATA, Monique Mazzarollo. **Tratamentos hormonais e seus efeitos sobre a produção de embriões bovinos *in vivo* e *in vitro***. 2021. 48f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

A transferência de embriões (TE) permite a multiplicação de fêmeas geneticamente superiores, contribuindo com o aumento da eficiência na produção de alimentos. Porém, tanto a produção *in vivo* quando a *in vitro* ainda necessitam de melhorias. No primeiro estudo, o objetivo foi identificar se a uma única administração de PGF na inseminação artificial (IA) após a superovulação (SOV) melhora as taxas de fecundação e produção embrionária. Vacas doadoras de embriões (n=35) participaram de duas SOV (n=70) sendo que, em cada ciclo, a metade não foi tratada (controle; n=35) e as demais receberam PGF (482µg de cloprostenol; n=35) no momento da primeira IA. No dia da coleta de embriões, registrou-se o número, estágio de desenvolvimento e qualidade das estruturas. As medianas (IC 95%) dos grupos controle e PGF foram, respectivamente, 12 (10-18) e 15 (12-18) estruturas totais; 9 (7-11) e 7 (6-10) embriões viáveis; 1 (0-1) e 1 (1-3) embriões degenerados; e 1 (0-3) e 2 (0-5) oócitos (P>0,05). Conclui-se que uma única administração de PGF no momento da primeira IA não afeta a produção embrionária de vacas superovuladas. No segundo estudo, o objetivo foi avaliar o efeito de um tratamento hormonal injetável para sincronização da onda folicular de doadoras *Bos taurus*, sobre a concentração de progesterona (P4), número e qualidade dos complexos cumulus oócito (CCOs) recuperados por aspiração folicular (OPU) e eficiência da produção *in vitro* de embriões (PIVE). Vacas *Bos taurus* (n=11) foram submetidas a quatro sessões de OPU (n=44), sendo que no dia zero (D0), a metade foi alocada no grupo controle (não sincronizada; n=22) ou no tratamento (2 mg de benzoato de estradiol; 150 µg de D-cloprostenol; e 300 mg de progesterona injetável; n=22) e no dia 6 (D6) ocorreu a OPU. Não houve diferença (P>0,05), nas medianas (IC 95%) de estruturas totais e viáveis, sendo respectivamente, 12 (6-15) e 10 (9-19) CCOs totais; 5,5 (5-8) e 6 (5-9) CCOs viáveis; e a taxa de produção de embriões foi 28% (21-46%) para o controle e 33% (22-45%) para o tratamento (P>0,05). Observou-se diferença (P<0,05) apenas na concentração média de progesterona no D6, sendo 2,8±0,8 e 1,1±0,2 ng/mL, para os grupos controle e tratamento, respectivamente. Nas condições deste estudo, conclui-se que este tratamento hormonal para sincronização pré-aspiração não melhorou os parâmetros analisados, não sendo recomendada sua aplicação. Novos estudos são necessários para melhorar a produção *in vivo*, e aumentar o número e qualidade das estruturas aspiradas para produção *in vitro* de embriões bovinos.

Palavras-chave: Embrião; TE; CCOs; PIVE; MOET

Abstract

FRATA, Monique Mazzarollo. **Hormonal treatments and their effects on bovine embryo production *in vivo* and *in vitro***. 2021. 48f. Dissertation (Master degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

Embryo transfer (ET) allows the multiplication of genetically superior females, contributing to increased efficiency in food production. However, both in *in vivo* and *in vitro* embryo production systems there is still place for improvement. In the first study the objective was to identify if a single PGF administration at the time of artificial insemination (AI) improves fertilization and embryo production rates. Embryo donor cows (n=35) were submitted to superovulation (SOV) twice (n=70). In each round, half of the cows were not treated (control; n=35) or treated with PGF (482µg cloprostenol; n=35) at the time of the first AI. The number, stage of development and quality of embryos were recorded on the day of embryo recovery. The medians (CI 95%) for control and PGF groups were, respectively, 12 (10-18) and 15 (12-18) total structures; 9 (7-11) and 7 (6-10) viable embryos; 1 (0-1) and 1 (1-3) degenerated embryos; and 1 (0-3) and 2 (0-5) oocytes (P>0.05). In conclusion, a single PGF treatment at the time of the first AI does not affect the embryo production of superovulated cows. In the second study the objective was to evaluate the effect of an injectable hormonal treatment to synchronize the follicular wave of *Bos taurus* donors on progesterone (P4) concentration, number and quality of cumulus-oocyte complexes (COCs) recovered by ovum pick up (OPU) and *in vitro* embryo production (IVP) efficiency. *Bos taurus* cows (n=11) were submitted to four OPU sessions (n=44). On day zero (D0) the cows were allocated to control (not synchronized) or treated group (2 mg of estradiol benzoate; 150 µg of D-cloprostenol; and 300 mg of injectable progesterone). On day 6 (D6) the OPU procedures were performed. There was no difference (P>0.05) between control and treatment, in the medians (CI 95%) of total and viable structures, being, respectively, 12 (6-15) and 10 (9-19) total oocytes; 5.5 (5-8) and 6 (5-9) viable oocytes; the rate of embryo production was 28% (21-46%) for control and 33% (22-45%) for treatment. A significant difference (P<0.05) was observed in the concentration of progesterone on D6, being 2.8±0.8 and 1.1±0.2 ng/mL for control and treated groups, respectively. In conclusion, under the conditions of this study, the hormonal treatment for pre-aspiration synchronization did not improve the analyzed parameters, consequently, its application is not recommended. New studies are necessary to improve *in vivo* embryo production and to increase the number and quality of aspirated structures for bovine *in vitro* embryo production.

Keywords: Embryo; ET; COCs; IVP; MOET

Lista de Figuras

Artigo 1: Administração de uma dose de prostaglandina F2 α no momento da inseminação artificial em vacas superovuladas não afeta a produção embrionária

Figura 1 – Desempenho de fêmeas bovinas superovuladas tratadas ou não com PGF no momento da primeira IA.....24

Artigo 2: Progesterona sérica, produção oocitária e embrionária de vacas *Bos taurus* submetidas a um tratamento hormonal injetável para sincronização da onda folicular

Figura 1 – Desempenho de fêmeas *Bos taurus* submetidas (Tratado) ou não (Cont) a um tratamento hormonal pré-aspiração folicular. 40

Figura 2 – Taxa de clivagem para cada touro utilizado na FIV.....41

Figura 3 – Concentração de progesterona (P4) nos dias 0 (D0) e 6 (D6) em animais suplementados (Tratado) ou não (Cont) com o protocolo hormonal injetável (P4i+BE+PGF).....42

Sumário

1 Introdução	11
2 Objetivos.....	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos específicos	14
3 Artigos	15
3.1 Artigo 1	15
3.2 Artigo 2	26
4 Considerações Finais	43
Anexos.....	48

1 Introdução

O uso comercial de tecnologias de reprodução assistida em bovinos, como a transferência de embriões (TE), é bem estabelecido mundialmente, devido ao seu aperfeiçoamento ao longo de cinco décadas. Desde o início da aplicação comercial na década de 1970, quando a coleta e transferência de embriões era feita cirurgicamente, muitos avanços ocorreram. Dentre eles, a coleta transcervical e TE não cirúrgica, até o desenvolvimento de dispositivos vaginais de progesterona que aliados ao estrógeno e prostaglandina F2 α (PGF) permitiram diminuir o intervalo entre as superovulações (SOV) sem a necessidade de aguardar o cio natural das doadoras. Novos protocolos de SOV com FSH em formulação de longa liberação também permitiram melhorar a eficiência no manejo de SOV, sem aumentar a produção embrionária (revisado por Hasler, 2014).

No entanto, apesar de rebanhos bem manejados obterem uma boa taxa de sucesso, os protocolos de SOV ainda apresentam variações na resposta, onde a taxa de recuperação embrionária é afetada por excessivas ovulações e há redução da responsividade aos repetidos tratamentos. Além disso, a pesquisa nesta área apresenta elevado custo e, conseqüentemente, há pouco avanço no conhecimento. Assim, as pesquisas acadêmicas podem beneficiar a área comercial, que se estagnou há anos, obtendo em média de 5 a 7 embriões recuperados por lavado uterino em doadoras *Bos taurus* (revisado por Hasler, 2012).

Já a produção *in vitro* de embriões (PIVE) permaneceu quase que exclusivamente como uma tecnologia de pesquisa, pouco utilizada na indústria da TE na década de 1980. Inicialmente a PIVE era utilizada apenas em doadoras com problemas de fertilidade, que já não respondiam à SOV. Já nos anos 2000 a PIVE começou a substituir a SOV no Brasil, principalmente devido à grande produção de oócitos por doadoras *Bos indicus*, sem a necessidade do tratamento com FSH, que representa um elevado custo. A tecnologia do sêmen sexado impulsionou ainda mais a PIVE, tornando o Brasil um fornecedor mundial de genética zebuína (revisado por Hasler, 2014 e Rodrigues, 2014).

Atualmente a PIVE é a biotécnica mais utilizada no mundo, sendo em 2019 reportada a produção de 1.031.769 embriões bovinos (72,7%). No mesmo período, apenas 387.769 (27,3%) embriões foram produzidos *in vivo*, através da SOV. Nos últimos anos, a indústria de embriões tendeu diminuir a produção *in vivo*, em contraste com o aumento da PIVE (Viana, 2019). No entanto, segundo a experiência adquirida na prestação de serviço, observou-se que para maximizar os resultados, ao invés de concorrerem entre si, ambas técnicas podem ser utilizadas na mesma fazenda. Cabe avaliar os objetivos a serem alcançados e os indivíduos para direcionar a técnica de produção de embriões mais adequada ao momento.

A produção de embriões *in vivo* possui a vantagem da consistência nos resultados, maior viabilidade e criotolerância dos embriões, além do baixo custo de produção relacionado a infraestrutura necessária. Porém a alta variação individual e a baixa repetibilidade na resposta à SOV são características a serem melhoradas (Mikkola et al, 2020). Em algumas situações, taxas de fecundação insatisfatórias podem estar ligadas à resposta superovulatória, devido a alterações na maturação oocitária, pouca sincronia das ovulações, ambiente hormonal inadequado, que altera o transporte de gametas e maior perda de sêmen retrógrado pelo aumento de muco durante o estro. Portanto, a taxa de fecundação pode ser melhorada nos protocolos de superestimulação com FSH (Carvalho et al., 2013).

Recentemente foi demonstrado que o uso de múltiplas administrações de PGF no período periovulatório aumenta as taxas de fecundação e de desenvolvimento embrionário em búfalas superovuladas (Carvalho et al., 2020). Além disso, a PGF foi capaz de induzir a ovulação em bovinos (Leonardi et al., 2012; Castro et al., 2018).

Apesar das evidências de que o tratamento com PGF no período periovulatório pode estimular a ovulação e/ou melhorar a fecundação em vacas e búfalas, respectivamente, até o presente momento, não foram avaliados os efeitos do tratamento com PGF no momento da inseminação artificial em vacas superovuladas. Portanto, formulou-se a hipótese de que o tratamento com PGF no momento da primeira IA em vacas superovuladas aumenta a taxa de fecundação e, conseqüentemente, o número de embriões viáveis obtidos.

Ao contrário da SOV, a PIVE possibilita obtenção de embriões não só de fêmeas vazias, mas também pré-púberes, no primeiro trimestre de gestação, com anormalidades adquiridas do trato reprodutivo, que não respondem à SOV e até *post mortem* (Ferré et al., 2020). No entanto, além da variabilidade individual, em geral, o desempenho de vacas *Bos taurus* é inferior ao das *Bos indicus* (Gimenes et al., 2015; Fernandes et al., 2014).

Apesar de doadoras *Bos taurus* apresentarem menor número de folículos recrutados, há indícios de que a indução da emergência de uma nova onda folicular antes da aspiração folicular (OPU) pode ser benéfica, aumentando o número e qualidade dos complexos cumulus oócito (CCOs) recuperados e de embriões produzidos (Fernandes et al., 2014). Uma forma de sincronizar a emergência da onda folicular é com a aspiração (OPU) dos folículos antrais, combinada com aplicação de PGF, o que induz uma nova onda folicular em 1,5 dias.

Porém, essa abordagem não é prática, pois requer equipamento e mão de obra qualificada além da necessidade de deslocamento até a fazenda. Portanto, o controle farmacológico do ciclo estral de doadoras de oócitos pré-aspiração poderia representar uma alternativa mais viável comercialmente.

Considerando os hormônios disponíveis para a sincronização da onda folicular, a progesterona inibe a liberação de LH prevenindo a ovulação e suprimindo o estro, mas não inibe a liberação de FSH. Já o tratamento com estrógeno induz a atresia de folículos dependentes de FSH através da supressão desta gonadotrofina, resultando na emergência de uma nova onda folicular em 3 a 5 dias (MAPLETOFT et al., 2018). O tratamento com PGF induz a luteólise e, se realizado alguns dias antes da OPU, pode diminuir o tamanho do corpo lúteo e, conseqüentemente, a aspiração de sangue que obstrui o sistema de OPU e dificulta a busca das estruturas aspiradas.

Ainda, em fêmeas *Bos taurus* é bem estabelecido que a superestimulação com FSH aumenta significativamente a taxa de recuperação de oócitos em relação a fêmeas não estimuladas (Ferré et al., 2020). Porém é necessário considerar o custo-benefício, visto que os protocolos disponíveis (Demetrio et al., 2020) utilizam doses de FSH similares às utilizadas na SOV para produção *in vivo*.

Portanto, formulou-se a hipótese de que o tratamento com progesterona injetável (P4i) de longa ação associada a benzoato de estradiol (BE) e D-cloprostenol (PGF), para a sincronização da onda folicular, aumenta a quantidade e qualidade dos CCOs aspirados e a produção de embriões em vacas *Bos taurus*.

É importante ressaltar que o sucesso das técnicas de produção *in vivo* e *in vitro* de embriões depende de diversos fatores ligados ao animal (raça, idade, paridade, lactação, população folicular e histórico reprodutivo), o manejo (nutrição, método de sincronização, gonadotrofina e sêmen) e ambiente (clima, estação e sistema de manejo), não somente a técnica e método utilizado (Mikkola et al, 2020).

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar o uso de tratamentos hormonais para melhorar a produção de embriões bovinos *in vivo* e *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

1) Identificar o efeito de uma única administração de PGF (482µg de cloprostenol sódico) no momento da primeira IA, após a SOV, sobre as taxas de fecundação e produção embrionária em vacas;

2) Avaliar o efeito de um tratamento hormonal injetável (300 mg de progesterona injetável, 2 mg de benzoato de estradiol e 150 µg de D-cloprostenol) para a sincronização de uma nova onda folicular em vacas *Bos taurus*, sobre a concentração de P4, número e qualidade dos oócitos obtidos por OPU e produção de embriões *in vitro*.

3 Artigos

3.1 Artigo 1

**Administração de uma dose de prostaglandina F_{2α} no momento da
inseminação artificial em vacas superovuladas não afeta a produção
embrionária**

Monique Mazzarollo Frata, Wagner Marques de Lima, Danylo Cintra Medeiros Lima,
Dênis Halinski da Silveira, Thomaz Lucia Jr., Rogério Ferreira, Bernardo Garziera
Gasperin

Será submetido à revista Ciência Rural

Administração de uma dose de prostaglandina F2 α no momento da inseminação artificial em vacas superovuladas não afeta a produção embrionária

A single prostaglandin F2 α treatment at the time of artificial insemination does not affect embryo production

Monique Mazzarollo Frata^{1,2}, Wagner Marques de Lima^{1,2}, Danylo Cintra Medeiros Lima², Dênis Halinski da Silveira², Thomaz Lucia Jr.¹, Rogério Ferreira³, Bernardo Garziera Gasperin¹

NOTA

RESUMO

A prostaglandina F2 α (PGF) pode induzir a ovulação, melhorar a concepção em vacas, além da fecundação e produção de embriões em búfalas, mas o efeito em vacas superovuladas é desconhecido. Objetivou-se identificar se uma aplicação de PGF no momento da inseminação artificial (IA) após a superovulação (SOV) melhora as taxas de fecundação e produção embrionária. Vacas doadoras de embriões (n=35) participaram de duas SOV (n=70) sendo que, em cada ciclo, a metade não foi tratada (controle; n=35) e as demais receberam uma dose de PGF (482 μ g de cloprostenol; n=35) no momento da primeira IA. No dia da coleta de embriões, registrou-se o número, estágio de desenvolvimento e qualidade das estruturas. As medianas (IC 95%) dos grupos controle e PGF foram, respectivamente, 12 (10-18) e 15 (12-18) estruturas totais; 9 (7-11) e 7 (6-10) embriões viáveis; 1 (0-1) e 1 (1-3) embriões degenerados; e 1 (0-3) e 2 (0-5) oócitos (P>0,05). Conclui-se que uma única administração de PGF no momento da primeira IA não afeta a produção embrionária de vacas superovuladas.

Palavras-chave: transferência de embrião; fecundação; reprodução; vaca; MOET;

¹ Laboratório de Reprodução Animal, Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, Capão do Leão, RS, Brasil. ² Biotec Serviços de Apoio À Pecuária, Protásio Alves, RS, Brasil. ³ Faculdade de Zootecnia, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Campus Universitário, 89815-630, Chapecó, SC, Brasil. * Autor para correspondência. E-mail: bggasperin@gmail.com

ABSTRACT

The treatment with prostaglandin F₂ α (PGF) induces ovulation, increases conception rates in cows, the rates of fertilization and embryo production in buffaloes, however the effect on superovulated cows is unknown. Thus, the objective of this study was to identify if a single PGF administration at the time of artificial insemination (AI) improves fertilization and embryo production rates. Embryo donor cows (n=35) were submitted to superovulation (SOV) twice (n=70). In each round, half of the cows were non treated (control; n=35) or treated with PGF (482 μ g cloprostenol; n=35) at the time of the first AI. The number, stage of development and quality of embryos were recorded on the day of embryo recovery. The medians (CI 95%) for control and PGF groups were, respectively, 12 (10-18) and 15 (12-18) total structures; 9 (7-11) and 7 (6-10) viable embryos; 1 (0-1) and 1 (1-3) degenerated embryos; and 1 (0-3) and 2 (0-5) oocytes (P>0.05). In conclusion, a single PGF treatment at the time of the first AI does not affect the embryo production of superovulated cows.

Key words: embryo transfer; fecundation; reproduction; cow; MOET;

A indução de múltiplas ovulações e transferência de embriões (MOET) contribui para difundir a genética de fêmeas zootecnicamente superiores. Apesar de eficiente em rebanhos bem manejados, a técnica apresenta limitações quanto à variabilidade na resposta à SOV, que afeta tanto o número de folículos ovulatórios, quanto a recuperação de oócitos (OOC) ao final do processo. Esta última pode ser devido à ovulação de oócitos de baixa viabilidade, a dispersão das ovulações e/ou a alteração no transporte dos gametas (MAPLETOFT et al., 2015). Isso implica negativamente na produção de embriões transferíveis, com consequente aumento de custo na preparação de receptoras que não são aproveitadas.

Atualmente, nos protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em bovinos, são utilizados indutores de ovulação, como o estradiol (E2), o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e seus análogos. Já na SOV, os análogos de GnRH são mais

utilizados, sendo essenciais para obter adequada taxa de fecundação. Além dos já citados, há evidências de que a PGF possui um efeito indutor da ovulação em bovinos (LEONARDI et al., 2012). Embora os mecanismos envolvidos não foram esclarecidos, foi possível utilizar a PGF em substituição ao E2, mantendo os índices reprodutivos na IATF de vacas (CASTRO et al., 2018). Recentemente foi demonstrado que o uso de PGF no período periovulatório aumenta as taxas de fecundação e de desenvolvimento embrionário em búfalas superovuladas (CARVALHO et al., 2020). Portanto, objetivou-se identificar o efeito de uma única administração de PGF no momento da primeira IA, após a SOV, sobre as taxas de fecundação e produção embrionária em vacas.

Doadoras de embriões *Bos taurus* e *Bos taurus* x *Bos indicus* (n=35), hospedadas no centro de coletas e processamento de embriões (CCPE) Biotec/RS, foram submetidas a um protocolo de SOV com estro base. Brevemente, as vacas tiveram seus ciclos estrais sincronizados (11 dias antes do estro = D -11), mediante a inserção de um dispositivo intravaginal (DIV) com 1g de progesterona (P4) e administração de 2mg de benzoato de estradiol (BE). No D -4 administrou-se 482 µg de cloprostenol (PGF) e removeu-se o DIV no D -2, afim de que as doadoras manifestassem o estro base para SOV no D0. A SOV teve início entre 9 e 11 dias após o estro (D0), mediante avaliação ginecológica para selecionar as doadoras que apresentassem um corpo lúteo (CL) > 1 cm de diâmetro e realizar a ablação de folículos > 8 mm (LIMA et al., 2007). Além disso, cada fêmea teve sua dose de FSH determinada individualmente (160 a 260mg; Folltropin, Vetoquinol), de acordo com sua fisiologia e desempenho em programas anteriores. No primeiro dia da SOV foi iniciada a aplicação de oito doses decrescentes de FSH com intervalo de 12 h. Juntamente com a sexta e sétima dose de FSH, foi administrada PGF para induzir a lise do CL e redução nos níveis de P4. Realizou-se a detecção do estro para aplicação de 50µg de acetato de gonadorelina (GnRH) a fim de melhorar a sincronização das ovulações. Às 12 e 24 horas após a aplicação

do GnRH ocorreram as IAs. As vacas do grupo controle (n=35) não foram tratadas, enquanto as vacas do grupo PGF (n=35) receberam uma administração de 482µg (2 mL) de cloprostenol sódico (Estron; Tecnopec) imediatamente antes da primeira IA. Portanto, cada doadora foi submetida a duas SOV e participou de ambos os grupos, totalizando 70 coletas de embriões. A coleta foi realizada 7 dias após o estro e foram registrados dados referentes às estruturas recuperadas (número, estágio de desenvolvimento e qualidade) para comparação entre os grupos. Os dados não apresentaram distribuição normal e, portanto, foi utilizada análise não paramétrica. Como cada doadora participou de ambos os tratamentos, a hipótese de que a PGF afeta as variáveis dependentes foi testada pelo teste de Wilcoxon para dados pareados. As análises foram realizadas com o programa Prism 8 e foi adotado como nível de significância $P < 0,05$.

Não houve diferença entre os tratamentos ($P > 0,05$) em nenhum parâmetro avaliado (Figura 1). As medianas (IC 95%) dos grupos controle e PGF foram, respectivamente, 12 (10-18) e 15 (12-18) para estruturas totais, 9 (7-11) e 7 (6-10) para embriões viáveis. As taxas de produção embrionária também não diferiram, sendo observado 78% (61-85%) para controle e 61% (43-83%) para PGF. Os dados obtidos foram semelhantes aos presentes na literatura (LIMA et al., 2007; GARCIA GUERRA et al., 2012; WILEY et al., 2019). As medianas de embriões congelados para os grupos controle (8; 5-9) e PGF (6; 2-10), não diferiram, e foram similares ao estudo de WILEY et al. (2019). O número de embriões degenerados não diferiu entre os grupos, sendo 1 (0-1) e 1 (1-3), para controle e PGF, respectivamente.

Em outros trabalhos, o número de oócitos (OOC) variou em média de 5,6 a 5,8 (GARCIA GUERRA et al., 2012; WILEY et al., 2019), enquanto obtivemos as medianas de apenas 1 (0-3) para controle e 2 (0-5) para PGF. Não houve diferença na taxa de OOC, sendo observado 9% (0-23%) para controle e 9% (0-43%) para PGF. Em búfalas superovuladas tratadas com PGF, foi demonstrado um incremento significativo na taxa de fecundação e de

embriões viáveis (CARVALHO et al., 2020). Cabe ressaltar que a taxa de recuperação embrionária em bubalinos é inferior à de bovinos e, portanto, a ausência de efeito no presente estudo pode estar relacionada com o fato de que a maioria das estruturas foram fecundadas, inclusive no grupo controle. Além disso, no estudo em bubalinos foram administradas quatro doses de PGF a cada 12 h, iniciando no momento da indução da ovulação, o que certamente ampliou o período de ação da PGF. Já no presente estudo, a PGF foi administrada no momento da primeira IA, baseado na hipótese de que poderia antecipar as ovulações induzidas pelo GnRH e/ou facilitar o transporte de espermatozoides da primeira IA.

Em nossa hipótese inicial, esperava-se que o grupo PGF teria maior sincronia de ovulações e/ou efeito positivo no transporte de gametas, resultando em menor proporção de oócitos, logo, maior número de embriões viáveis. Porém MORRISON et al. (1988) também não encontraram efeito da PGF no momento da IA em vacas, sobre o número de espermatozoides nos ovidutos e taxa de prenhez, que somado aos nossos resultados, contradizem a hipótese. Um estudo recente em vacas superovuladas afirma que, embora a PGF esteja associada à ovulação em bovinos, os níveis de prostaglandina E2 (PGE) no fluido folicular durante a ovulação são superiores (484.21 ng/mL) aos de PGF (101.01 ng/mL). Assim, sugere-se que a PGE é mais relevante para ovulação e formação do CL, como mediador parácrino do pico de LH em bovinos (BERISHA et al., 2019).

AMBROSE et al. (2015) observaram incremento na concepção em vacas tratadas com PGF no momento da IATF apenas no início da lactação, em vacas com possível balanço energético negativo (BEN), enquanto não houve efeito em fêmeas a partir da metade da lactação. Ainda, não houve diferença nas taxas de prenhez e manutenção da gestação quando foi aplicado PGF, GnRH ou PGF + GnRH no momento da IATF em vacas leiteiras (MOHAMMADI et al., 2019). Conforme descrito na literatura, o tratamento com PGF pode ser útil na IA de vacas em que fatores de estresse possam afetar a ovulação (BEN, estresse

térmico), mas não tem benefício em fêmeas com desempenho reprodutivo adequado (LOPEZ-GATIUS et al., 2004), como no presente estudo. Em conclusão, uma única administração de PGF no momento da primeira IA não afeta a produção embrionária de vacas superovuladas.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Edital PRONEX 12/2014, 16/2551-0000494-3). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) e CNPq (Chamada Universal MCTIC/CNPq: 424308/2018-5).

COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

CEEA Universidade Federal de Pelotas (Registro 57360).

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSE

Não há conflitos de interesse a declarar.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Os autores contribuíram igualmente para o manuscrito.

REFERÊNCIAS

- AMBROSE, D. J., et al. Low-dose natural prostaglandin F₂alpha (dinoprost) at timed insemination improves conception rate in dairy cattle. **Theriogenology**, v.83, n.4, p.529-34. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25434776>>. Acesso em: May 3, 2021. doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.10.034.
- BERISHA, B., et al. Prostaglandins in Superovulation Induced Bovine Follicles During the Preovulatory Period and Early Corpus Luteum. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v.10, p.467. 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31354631>>. Acesso em: May 3, 2021. doi: 10.3389/fendo.2019.00467.

CARVALHO, J. G. S., et al. Administration of PGF2alpha during the periovulatory period increased fertilization rate in superovulated buffaloes. **Theriogenology**, v.145, p.138-143. 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31757482>>. Acesso em: May 3, 2021. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.11.010.

CASTRO, N. A., et al. Use of prostaglandin F2alpha as ovulatory stimulus for synchronizing dairy cattle. **Res Vet Sci**, v.118, p.151-154. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29453074>>. Acesso em: May 3, 2021. doi: 10.1016/j.rvsc.2018.01.010.

GARCIA GUERRA, A., et al. Lengthening the superstimulatory treatment protocol increases ovarian response and number of transferable embryos in beef cows. **Theriogenology**, v.78, n.2, p.353-60. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22494674>>. Acesso em: May 3, 2021. doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.02.010.

LEONARDI, C. E., et al. Prostaglandin F2alpha promotes ovulation in prepubertal heifers. **Theriogenology**, v.78, n.7, p.1578-82. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22925644>>. Acesso em: May 3, 2021. doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.06.030.

LIMA, W. M., et al. Improved superovulatory response in beef cattle following ovarian follicular ablation using a simplified transvaginal device. **Anim Reprod Sci**, v.100, n.3-4, p.364-70. 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17156950>>. Acesso em: May 3, 2021. doi: 10.1016/j.anireprosci.2006.10.023.

LOPEZ-GATIUS, F., et al. Reproductive performance of lactating dairy cows treated with cloprostenol at the time of insemination. **Theriogenology**, v.62, n.3-4, p.677-89. 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15226022>>. Acesso em: May 3, 2021. doi: 10.1016/j.theriogenology.2003.11.014.

MAPLETOFT, R., et al. In vitro and in vivo embryo production in cattle superstimulated with FSH for 7 days. **Animal Reproduction**, v.12, n.3, p.383-388. 2015. Disponível em:

<[http://www.cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v12/v12n3/pag383-388%20\(AR747\).pdf](http://www.cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v12/v12n3/pag383-388%20(AR747).pdf)>. Acesso em: May 3, 2021. Doi

MOHAMMADI, A., et al. Effect of prostaglandin F2alpha and GnRH administration at the time of artificial insemination on reproductive performance of dairy cows. **Vet Res Forum**, v.10, n.2, p.153-158. 2019. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31338149>>. Acesso em: May 3, 2021. doi: 10.30466/vrf.2018.87502.2136.

MORRISON, D. G., et al. Effect of prostaglandin F2 α at insemination on sperm cell numbers and pregnancy rate in beef cattle. **Theriogenology**, v.30, n.1, p.109-118. 1988. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0093691X88902683>>. Acesso em: May 3, 2021. doi: 10.1016/0093-691x(88)90268-3.

WILEY, C., et al. Effects of endogenous progesterone during ovarian follicle superstimulation on embryo quality and quantity in beef cows. **Theriogenology**, v.129, p.54-60. 2019.

Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30818252>>. Acesso em: May 3, 2021. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.01.024.

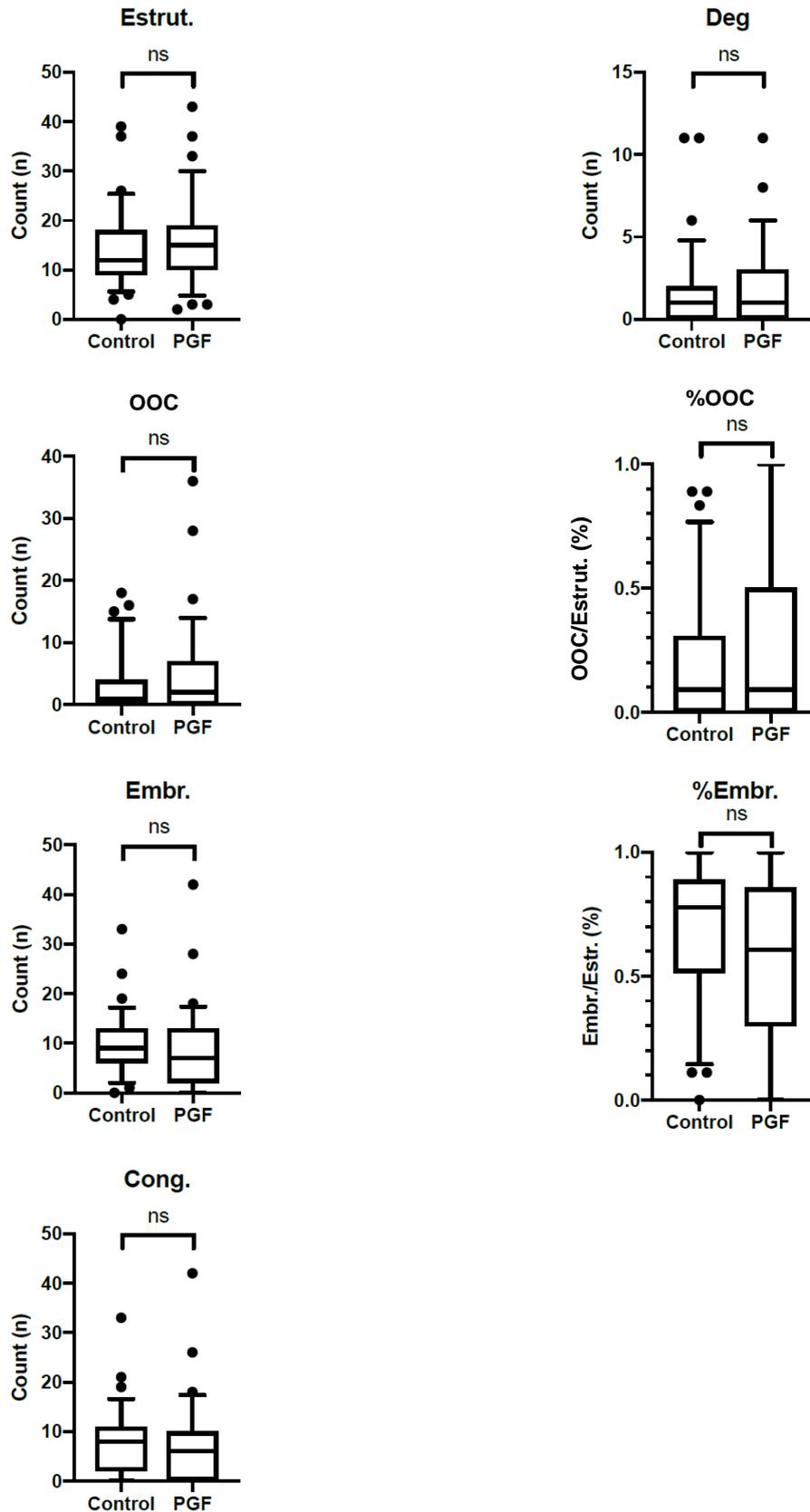


Figura 1 – Desempenho de fêmeas bovinas superovuladas tratadas ou não com uma aplicação PGF no momento da primeira IA. A caixa representa os dados incluídos no 2º e 3º quartil e a linha horizontal no interior da caixa representa a mediana e separa os dois quartis centrais.

As linhas acima e abaixo das caixas representam os percentis 90 e 10, respectivamente. Os pontos indicam as unidades experimentais acima do percentil 90 ou abaixo do percentil 10.

Control = grupo controle;

PGF = grupo tratado com PGF;

Estrut. = estruturas totais recuperadas;

Deg. = embriões degenerados recuperados;

OOC = oócitos recuperados;

Emb. = embriões recuperados;

Cong. = embriões congelados.

3.2 Artigo 2

Progesterona sérica, produção oocitária e embrionária de vacas *Bos taurus* submetidas a um tratamento hormonal injetável para sincronização da onda folicular

Monique Mazzarollo Frata, Wagner Marques de Lima, Danylo Cintra Medeiros Lima, Dênis Halinski da Silveira, Nathália Wacholz Knabah, Paulo Bayard Dias Gonçalves, Rogério Ferreira, Arnaldo Diniz Vieira, Bernardo Garziera Gasperin

Será submetido à revista Ciência Rural

Progesterona sérica, produção oocitária e embrionária de vacas *Bos taurus* submetidas a um tratamento hormonal injetável para sincronização da onda folicular

Serum progesterone, oocyte and embryo production of *Bos taurus* cows submitted to an injectable hormonal treatment for follicular wave synchronization

Monique Mazzarollo Frata^{1,2}, Wagner Marques de Lima^{1,2}, Danylo Cintra Medeiros Lima², Dênis Halinski da Silveira², Nathália Wacholz Knabah², Paulo Bayard Dias Gonçalves³, Rogério Ferreira⁴, Arnaldo Diniz Vieira¹, Bernardo Garziera Gasperin¹

RESUMO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) apresenta melhor desempenho em *Bos indicus* do que em *Bos taurus*, logo, deve-se buscar meios de aprimorar a produção de embriões em taurinos. Portanto, o objetivo foi avaliar o efeito de um tratamento hormonal injetável para sincronização da onda folicular de doadoras *Bos taurus*, sobre a concentração de progesterona (P4), número e qualidade dos complexos cumulus oócito (CCOs) recuperados por aspiração folicular (OPU) e eficiência da PIVE. Vacas *Bos taurus* (n=11) foram submetidas a quatro sessões de OPU (n=44 procedimentos), sendo que no dia zero (D0), a metade foi alocada no grupo controle (não sincronizada; n=22) ou no tratamento (2 mg de benzoato de estradiol; 150 µg de D-cloprostenol; e 300 mg de progesterona injetável; n=22) e no dia 6 (D6) ocorreu a OPU. Nos resultados obtidos não houve diferença (P>0,05) entre controle e tratamento, nas medianas (IC 95%) de estruturas totais e viáveis, sendo respectivamente, 12 (6-15) e 10 (9-19) CCOs totais; 5,5 (5-8) e 6 (5-9) CCOs viáveis; e a taxa de produção de embriões foi 28% (21-46%) para controle e 33% (22-45%) para tratamento (P>0,05). Observou-se diferença (P<0,05) apenas na concentração média de progesterona no D6, sendo 2,8±0,8 ng/mL e 1,1±0,2 ng/mL, para os grupos controle e tratamento, respectivamente.

¹ Laboratório de Reprodução Animal, Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, Capão do Leão, RS, Brasil; ² Biotec Serviços de Apoio à Pecuária, Protásio Alves, RS, Brasil; ³ Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiana, RS, Brasil; ⁴ Faculdade de Zootecnia, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Chapecó, SC, Brasil. * Autor para correspondência. E-mail: bernardo.gasperin@ufpel.edu.br

Nas condições deste estudo, conclui-se que este tratamento hormonal para sincronização pré-aspiração não melhorou os parâmetros analisados, portanto, sua aplicação não é recomendada.

Palavras-chave: PIVE, vacas, progesterona injetável, CCOs, embrião

ABSTRACT

The *in vitro* embryo production (IVP) has better performance in *Bos indicus* than *Bos taurus*. Thus, it is necessary to evaluate alternatives to improve embryo production in *Bos taurus*. Therefore, the objective was to evaluate the effect of an injectable hormonal treatment to synchronize the follicular wave of *Bos taurus* donors on progesterone (P4) concentration, number and quality of cumulus-oocyte complexes (COCs) recovered by ovum pick up (OPU) and IVP efficiency. *Bos taurus* cows (n=11) were submitted to four OPU sessions (n=44 procedures). On day zero (D0) the cows were allocated to control (not synchronized) or treated group (2 mg of estradiol benzoate; 150 µg of D-cloprostenol; and 300 mg of injectable progesterone). On day 6 (D6) the OPU procedures were performed. There was no difference (P>0.05) between control and treatment, in the medians (CI 95%) of total and viable structures, being, respectively, 12 (6-15) and 10 (9-19) total oocytes; 5.5 (5-8) and 6 (5-9) viable oocytes; the rate of embryo production was 28% (21-46%) for control and 33% (22-45%) for treatment. A significant difference (P<0.05) was observed in the concentration of progesterone on D6, being 2.8±0.8 and 1.1±0.2 ng/mL for control and treated groups, respectively. In conclusion, based on the conditions of this study, this hormonal treatment for pre-aspiration synchronization did not improve the analyzed parameters, consequently, its application is not recommended.

Key words: IVP, cows, injectable progesterone, COCs, embryo

INTRODUÇÃO

As biotecnologias aplicadas à reprodução de bovinos permitem acelerar a multiplicação de indivíduos geneticamente superiores, tornando a produção de alimentos mais

eficiente. Para tal, utiliza-se a produção de embriões e a manipulação do ciclo estral das fêmeas (HANSEN, 2014). A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é a mais utilizada no mundo, sendo em 2019 reportada a produção de 1.031.769 (72,7%) embriões bovinos pela técnica. No mesmo período, apenas 387.769 (27,3%) embriões foram produzidos *in vivo*, através da superovulação (SOV). Nos últimos anos, a indústria de embriões tendeu diminuir a produção *in vivo*, em contraste com o aumento da PIVE (VIANA, 2019).

Porém, existe diferença no desempenho da PIVE entre raças zebuínas e taurinas, onde a recuperação de oócitos viáveis é superior nas primeiras e, conseqüentemente, maior é a produção de embriões (FERNANDES et al., 2014). No sul do Brasil, onde o clima é temperado, são criadas raças *Bos taurus* e seus sintéticos, cuja qualidade da carne atende um nicho de mercado diferenciado. Esta região é importante na produção e seleção de reprodutores para cruzamento com *Bos indicus*, conferindo adaptação ao clima tropical do país (FERRAZ & FELICIO, 2010).

Apesar de doadoras *Bos taurus* apresentarem menor número de folículos recrutados, há indícios de que a sincronização da emergência de uma onda folicular antes da aspiração folicular (OPU) pode ser benéfica, aumentando o número e qualidade dos complexos cumulus oócito (CCOs) recuperados e de embriões produzidos (FERNANDES et al., 2014). Portanto, formulou-se a hipótese de que o tratamento com progesterona injetável (P4i) de longa ação associada a benzoato de estradiol (BE) e D-cloprostenol (PGF), para a sincronização da onda folicular, aumenta a quantidade e qualidade dos CCOs aspirados e a produção de embriões em vacas *Bos taurus*.

O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de um tratamento hormonal injetável para a sincronização da onda folicular em vacas *Bos taurus*, sobre a concentração sérica de P4, número e qualidade dos CCOs obtidos por OPU e produção de embriões *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais, tratamentos e OPU

O experimento ocorreu de abril a julho de 2020, no município de Protásio Alves, Rio Grande do Sul, Brasil, no Centro de Coleta e Processamento de Embriões (CCPE) da Biotec Serviços de Apoio à Pecuária (28°40'37.97"S; 51°30'21.64"O). Foram utilizadas 11 vacas não gestantes das raças Hereford e Aberdeen Angus, com escore corporal entre 7 e 8 (EVERSOLE et al., 2009). Os animais permaneceram em pastagem de centeio forrageiro e suplementadas com sal mineral reprodução *ad libitum*.

No dia zero (D0), as doadoras passaram por avaliação ginecológica, sendo contabilizado o número de folículos e a presença ou não de corpo lúteo (CL). Após, os animais foram aleatoriamente alocados em dois grupos: controle (sem sincronização) ou tratamento (sincronização da onda folicular), que consistiu na aplicação de 2 mg de benzoato de estradiol – BE (Ric-BE®, Tecnopec Ltda, Brasil), 150 µg de D-cloprostenol – PGF (Croniben®, Biogenesis-Bagó, Argentina) e 300 mg de progesterona injetável – P4i (Sincrogest® Injetável, Ourofino, Brasil) e, no sexto dia (D6), ocorreu a OPU. Todas as fêmeas participaram de ambos os grupos, sendo submetidas a quatro sessões de OPU, com 30 dias de intervalo, totalizando 44 procedimentos (n=22/grupo). Também foi coletado sangue no D0 e no D6 para dosagem de progesterona (P4), pela técnica de quimiluminescência (ADVIA Centaur; Siemens; Ref. 01586287; sensibilidade 0.21 µg/L) em laboratório comercial, com coeficientes inter- e intra-ensaio inferiores a 12%.

A cada sessão de OPU, as vacas receberam anestesia epidural com lidocaína 2% e higienização da região perianal. Utilizou-se ultrassom DP-20 vet (Mindray Bio-Medical Electronics, China) equipado com uma probe microconvexa de 5 MHz adaptada à guia de aspiração folicular (Watanabe Tecnologia Aplicada, Brasil). Os folículos foram puncionados por agulha 20 G (Jelco Plus®, Cirúrgica Fernandes, Brasil) acoplada ao sistema para

aspiração folicular com rolha (Watanabe Tecnologia Aplicada, Brasil) e tubo cônico de 50 mL, que continha meio de lavagem aquecido a 37° C. Esse meio era composto por DMPBS (Reprodux Laboratórios LTDA, Brasil), 0,3% de soro fetal bovino (Nutricell, Brasil) e 10 UI/mL de heparina sódica (5000 IU/5mL, Hemofol®, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos, Brasil). A bomba de vácuo (modelo BV-003, Watanabe Tecnologia Aplicada, Brasil) foi ajustada para uma taxa de fluxo de 12-14 mL de H₂O/min.

Produção in vitro de embriões

Após a OPU, o aspirado do tubo cônico foi depositado em filtro de oócitos (Watanabe Tecnologia Aplicada, Brasil) para lavagem com o meio citado acima e transferido para placa de 60 mm para a busca em estereomicroscópio. As estruturas encontradas foram classificadas segundo DE LOOS et al. (1989). Apenas CCOs grau 1, 2, 3 e desnudos foram para a maturação *in vitro* (MIV). Para a PIVE, utilizou-se meios comerciais (Cenatte Embriões LTDA, Brasil). Brevemente, foram colocados até 20 CCOs em tubos de 2 mL com 400 µL de meio de MIV e cobertos por óleo mineral, permanecendo de 22 a 24h em incubadora com temperatura de 38,5°C, atmosfera com 5,5% de CO₂ e umidade saturada.

Em seguida, realizou-se a fecundação *in vitro* (FIV), transferindo até 20 CCOs para gotas de 40 µL de meio FIV em placa de 35 mm coberta por óleo mineral. Utilizou-se sêmen convencional descongelado em banho maria a 37°C por 30 segundos, proveniente de três touros com fertilidade conhecida na rotina da central, de acordo com os acasalamentos estipulados pelos proprietários das doadoras. O sêmen foi centrifugado através de gradiente de mini Percoll 45-90% (800 uL) a 600 × g por 6 min. Em seguida, descartou-se o sobrenadante, ressuspendeu-se o pellet de sêmen em meio de FIV (1 mL) que foi novamente centrifugado a 600 × g por 3 min. Desprezou-se o sobrenadante novamente e a motilidade seminal foi estimada sob microscopia óptica. Então, a concentração espermática foi ajustada para 1x10⁶ espermatozoides/mL, inseminando-se com 5 a 10 uL de sêmen. Os CCOs permaneceram em

co-cultivo com os espermatozoides por 18 a 22h, nas mesmas condições ambientais da MIV.

Posteriormente, os prováveis zigotos foram desnudados por pipetagens e passados para gotas de 100 μ L de meio de cultivo *in vitro* (CIV), em placas de 35 mm cobertas por óleo mineral, onde permaneceram por 7 dias. O cultivo foi feito em incubadora a 38,5°C, em atmosfera com 5,5% de CO₂, 5% de O₂, balanço de N₂ e umidade saturada. No terceiro dia após a fecundação foi avaliada a taxa de clivagem e no sétimo dia a taxa de embriões (mórula, blastocisto inicial, blastocisto e blastocisto expandido).

Análise estatística

O número de folículos totais no dia da OPU e a concentração sérica de P4 apresentaram distribuição normal, e as médias de cada tratamento foram comparadas pelo teste T para amostras não pareadas. As demais variáveis dependentes não apresentaram distribuição normal e as medianas foram comparadas, entre os distintos fatores (tratamentos ou touro), por análise não paramétrica utilizando o teste de Mann-Whitney.

RESULTADOS

A hipótese de que a indução de uma nova onda folicular previamente à OPU aumentaria o número de CCOs viáveis e, portanto, melhoraria a produção embrionária, não foi confirmada. Conforme os dados obtidos, a média de folículos aspirados não diferiu entre os grupos ($P>0,05$), equivalendo a $14,7\pm 1,7$ no grupo controle e $14,1\pm 1,6$ no tratamento. Também não houve diferença entre os grupos nas medianas (IC 95%) de estruturas recuperadas por OPU, sendo para controle e tratamento, 12 (6-15) e 10 (9-19) CCOs totais; 5,5 (5-8) e 6 (5-9) CCOs viáveis, respectivamente (Figura 1).

Na PIVE não foi observado efeito na taxa de clivagem/CCOs cultivados entre o controle, 58% (50-71%) e tratamento, 65% (50-80%). A produção de embriões também não diferiu, sendo obtidas taxas de embriões/CCOs cultivados de 28% (21-46%) e 33% (22-55%) para controle e tratamento, respectivamente. A taxa de embriões/clivados foi 50% (IC 95%

32-75% para controle e 36-75% para grupo tratado) em ambos os grupos (Figura 1). Não houve efeito significativo do touro utilizado sobre as taxas de clivagem ($P>0,05$; Figura 2).

Em relação ao perfil hormonal das doadoras (Figura 3), houve diferença ($P<0,05$) nos níveis de P4 apenas no D6, quando o controle apresentou $2,8\pm 0,8$ ng/mL e o tratamento $1,1\pm 0,2$ ng/mL, devido ao uso do D-Cloprostenol no D0. Também é possível observar no D0 a variação nas concentrações de P4, tanto nas fêmeas sincronizadas (tratamento) como nas não tratadas (controle), demonstrando que estavam em fases aleatórias do ciclo estral.

DISCUSSÃO

No presente estudo, a utilização de um protocolo hormonal baseado na administração de P4i, BE e PGF, para sincronização da onda pré-aspiração folicular, não repercutiu em melhora na quantidade de estruturas aspiradas e na eficiência da PIVE. Em geral, os benefícios da sincronização da onda folicular são questionáveis, devido às inúmeras variáveis envolvidas, como raças, protocolos e intervalos de OPU testados.

Por exemplo, no estudo de GIMENES et al. (2015), após a sincronização hormonal da onda folicular (D0) não houve efeito do momento da OPU (dia 5, 7 ou 9) na média de folículos visualizados, CCOs viáveis recuperados e embriões produzidos. Porém, o grupo genético teve efeito, sendo que *Bos indicus* apresentou maior média de folículos visualizados ($38,8 \pm 3,0$), CCOs totais ($35,2 \pm 4,8$) e viáveis ($24,7 \pm 3,5$) por OPU em relação a *Bos taurus* ($23,1\pm 2,6$; $13,8\pm 1,8$ e $7,1\pm 1,1$ respectivamente) e *Bubalus bubalis* ($18,1\pm 1,4$; $14,7\pm 1,9$ e $7,9\pm 0,9$ respectivamente). Assim como no presente estudo, outros autores não observaram benefícios do tratamento hormonal na OPU-PIVE em fêmeas Wagyu utilizando apenas benzoato de estradiol (ZAMAI et al., 2021), e em fêmeas mestiças *Bos taurus x Bos indicus* (RAMOS et al., 2010), utilizando diferentes combinações de implantes contendo progestágenos, administração de PGF e benzoato de estradiol.

Diversos autores sugerem a indução hormonal de uma nova onda folicular aliada à

estimulação com FSH em taurinos. FERNANDES et al. (2014) realizaram OPU sem pré-tratamento (G1), com sincronização hormonal da onda folicular, utilizando apenas benzoato de estradiol (G2) e com sincronização da onda folicular, mais estímulo com 75 UI de FSH (G3). Em *Bos taurus*, os tratamentos G2 e G3 não diferiram, respectivamente, no total de CCOs recuperados ($11,9 \pm 1,2$ e $14,3 \pm 1,3$), mas foram superiores a G1 ($7,08 \pm 0,8$). Em relação aos CCOs viáveis a diferença foi significativa, sendo G3 ($11,9 \pm 1,1$) superior a G2 ($8,4 \pm 0,9$), que foi superior a G1 ($5,4 \pm 0,6$). No entanto, a taxa de embriões não diferiu entre G2 e G3 ($29,6 \pm 1,9\%$ e $24,5 \pm 1,7\%$ respectivamente), sendo inferior no G1 ($19,5 \pm 1,9\%$). Quando vacas *Bos indicus* foram submetidas aos mesmos tratamentos, G2 e G3 foram superiores a G1 ($P < 0,05$) em todos os parâmetros. Porém, ao contrário do observado em *Bos taurus*, não houve diferença entre G2 e G3.

Em vacas Aberdeen Angus, a indução de uma nova onda folicular e aplicação de 160 mg de FSH resultou em aumento significativo ($P < 0,05$) de folículos aspirados (tratamento = $14,1 \pm 1,0$; controle = $8,5 \pm 0,6$). Também houve incremento no número de CCOs totais (tratamento = $8,5 \pm 0,6$; controle = $6,4 \pm 0,7$) e viáveis (tratamento = $5,5 \pm 0,5$; controle = $3,7 \pm 0,5$), porém a taxa de blastocistos não diferiu (ONGARATTO et al., 2020). Nota-se que, mesmo sem a estimulação com FSH, os resultados do presente estudo foram superiores ao citado anteriormente.

Além disso, o protocolo de estimulação de FSH empregado por DEMETRIO et al. (2020) em vacas holandesas, consistiu basicamente na administração de 245 UI de FSH em vacas lactantes e 175 UI para novilhas e vacas secas, divididas em 5 aplicações a cada 12 horas. Neste trabalho, optou-se por não testar a estimulação, pois as doses de FSH descritas na literatura foram próximas das doses utilizadas para SOV em vacas holandesas em nossa rotina (cerca de 320 UI para lactantes, 240 UI para secas e 180 UI para novilhas). Atualmente, o custo do FSH é o principal fator limitante na SOV, além da necessidade de aplicação de FSH

duas vezes ao dia, que vai contra a vantagem de um único manejo (dia da OPU) necessário para a PIVE.

Segundo GARCIA GUERRA et al. (2012), a sincronização hormonal teve efeito significativo em doadoras Nelore com grande número de folículos antrais (≥ 25) no total de CCOs recuperados e número de embriões produzidos, mas não melhorou os parâmetros de doadoras com poucos folículos (≤ 15). Mesmo quando estas doadoras foram aspiradas em fases aleatórias do ciclo estral, o desempenho de vacas com grande população folicular foi superior às outras.

É possível que, em fêmeas *Bos taurus* sincronizadas, não é observado um efeito pronunciado pelo fato desses animais naturalmente apresentarem menor número de folículos antrais. Além disso, em nossa rotina as doadoras são selecionadas pelo mérito genético, e não pelo desempenho na PIVE. Caso contrário, seria possível melhorar a produção embrionária com as estratégias disponíveis.

Em um estudo anterior, fêmeas que receberam tratamento hormonal com E2, P4 e PGF no D0 (2 mg de BE; 0,5 mg de PGF; 50 mg de P4i) e OPU no D6, apresentaram apenas 7,1% de CLs, enquanto vacas que tiveram todos os folículos visíveis aspiradas e foram tratadas com PGF (0,5 mg de PGF) no D0, com OPU no D3, apresentaram 35,7% de CL. A ausência de CL facilita a visualização e punção folicular, diminuindo também a aspiração de sangue devido à perfusão capilar do CL (BACELAR et al., 2010).

Neste estudo não foi observada diferença na proporção de CL no dia da OPU (54% em ambos os grupos). Porém, como os níveis séricos de P4 no grupo tratamento foram inferiores ao controle, sugere-se que a funcionalidade do CL foi afetada. Embora o tamanho do CL não tenha sido avaliado, é possível inferir que as vacas sincronizadas possuíam CLs menores, devido ao processo de regressão morfológica que inicia aproximadamente 24 h após o tratamento com PGF (ROVANI et al., 2017).

Assim como sugerido no estudo de BACELAR et al. (2010), o uso de P4i representa uma alternativa aos implantes de P4, que podem causar algum grau de irritação vaginal, aumentando a produção de muco, que quando aspirado pode obstruir o sistema de aspiração. Porém, a utilização de P4i para sincronização da onda pré-aspiração folicular não repercutiu em melhora na quantidade de estruturas aspiradas.

Conforme a literatura mencionada anteriormente, o protocolo hormonal pré-aspiração pode influenciar a quantidade e qualidade de CCOs obtidos. Porém, o resultado da produção embrionária depende de todas as etapas da PIVE. No presente estudo, foram obtidas taxas de, aproximadamente, 30% de desenvolvimento embrionário, sendo que são consideradas satisfatórias taxas de blastocistos de 30 a 40% (WRENZYCKI, 2016).

CONCLUSÃO

A sincronização da onda folicular antes da OPU com BE, PGF e P4i, não melhorou a qualidade oocitária e produção *in vitro* de embriões em vacas *Bos taurus*, portanto este tratamento não é indicado. Estudos futuros são necessários para avaliar a viabilidade de outras estratégias para aumentar o número e qualidade das estruturas aspiradas de vacas taurinas.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Edital PRONEX 12/2014, 16/2551-0000494-3). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) e CNPq (Chamada Universal MCTIC/CNPq: 424308/2018-5).

COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

CEEA Universidade Federal de Pelotas (Registro 57360).

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSE

Não há conflitos de interesse a declarar.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Os autores contribuíram igualmente para o manuscrito.

REFERÊNCIAS

BACELAR, D., et al. Incremento na obtenção de oócitos em novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*) tratadas com progesterona injetável e benzoato de estradiol. **Semina: Ciências**

Agrárias, v.31, p.163-172. 2010. Disponível em:

<<https://www.redalyc.org/pdf/4457/445744095015.pdf>>. Acesso em May 3, 2021. doi.

DE LOOS, F., et al. Morphology of immature bovine oocytes. **Gamete Res**, v.24, n.2, p.197-

204. 1989. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2793058>>. Acesso em

May 3, 2021. doi: 10.1002/mrd.1120240207.

DEMETRIO, D. G. B., et al. How can we improve embryo production and pregnancy

outcomes of Holstein embryos produced in vitro? (12 years of practical results at a California dairy farm). **Animal Reproduction**, v.17. 2020. Disponível em:

<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-31432020000300503&nrm=iso)

[31432020000300503&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-31432020000300503&nrm=iso)>. Acesso em May 3, 2021. doi. 10.1590/1984-3143-AR2020-

0053

EVERSOLE, D., et al. Body condition scoring beef cows. **Virginia Cooperative Extension**

2009. Disponível em <<https://vtechworks.lib.vt.edu/handle/10919/74359>>. Acesso em May 3,

2021. doi.

FERNANDES, C., et al. Hormonal protocols for in vitro production of Zebu and taurine

embryos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.49, p.813-817. 2014. Disponível em:

<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2014001000813&nrm=iso)

[204X2014001000813&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2014001000813&nrm=iso)>. Acesso em Acesso em May 3, 2021. doi.10.1590/S0100-

204X2014001000008

FERRAZ, J. B.; P. E. FELICIO. Production systems--an example from Brazil. **Meat Sci**, v.84, n.2, p.238-43. 2010. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20374781>>. Acesso em May 3, 2021. doi:

10.1016/j.meatsci.2009.06.006.

GARCIA GUERRA, A., et al. Lengthening the superstimulatory treatment protocol increases ovarian response and number of transferable embryos in beef cows. **Theriogenology**, v.78, n.2, p.353-60. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22494674>>.

Acesso em May 3, 2021. doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.02.010.

GIMENES, L. U., et al. 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.385-93. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25447149>>.

Acesso em May 3, 2021. doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.09.030.

HANSEN, P. J. Current and future assisted reproductive technologies for mammalian farm animals. **Adv Exp Med Biol**, v.752, p.1-22. 2014. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24170352>>. Acesso em May 3, 2021. doi:

10.1007/978-1-4614-8887-3_1.

ONGARATTO, F. L., et al. Effect of FSH treatment on cumulus oocyte complex recovery by ovum pick up and in vitro embryo production in beef donor cows. **Animal reproduction science**, v.214, p.106274. 2020. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32087924>>. Acesso em May 3, 2021. doi:

10.1016/j.anireprosci.2020.106274.

RAMOS, A. F., et al. Effect of follicular wave synchronization on in vitro embryo production in heifers. **Animal reproduction science**, v.117, n.3-4, p.201-7. 2010. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19481381>>. Acesso em May 3, 2021. doi: 10.1016/j.anireprosci.2009.04.009.

ROVANI, M. T., et al. Prostaglandin F₂alpha-induced luteolysis involves activation of Signal transducer and activator of transcription 3 and inhibition of AKT signaling in cattle. **Mol Reprod Dev**, v.84, n.6, p.486-494. 2017. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28337827>>. Acesso em May 3, 2021. doi: 10.1002/mrd.22798.

VIANA, J. 2019 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals

Divergent trends for IVD and IVP embryos. **Annual Conference of the International**

Embryo Technology Society. New Orleans, Louisiana: International Embryo Technology

Society 2019. Disponível em:

<https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/IETS_Data_Retrieval_Report_2019.pdf>. Acesso em May 3, 2021.

WRENZYCKI, C. In vitro culture systems: how far are we from optimal conditions? **Anim**

Reprod, v.13, p.279-282. 2016. Disponível em: <[https://www.animal-](https://www.animal-reproduction.org/article/doi/10.21451/1984-3143-AR869)

[reproduction.org/article/doi/10.21451/1984-3143-AR869](https://www.animal-reproduction.org/article/doi/10.21451/1984-3143-AR869)>. Acesso em May 3, 2021. doi.

10.21451/1984-3143-AR869

ZAMAI, M., et al. Synchronization with estradiol benzoate in the presence of the corpus

luteum in Wagyu cows increases the number of medium follicles but does not interfere with

in vitro production of embryos. **Semina:Ciencias Agrarias**, v.42, p.1147-1157. 2021.

Disponível em: <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/40918>>.

Acesso em May 3, 2021. doi. 10.5433/1679-0359.2021v42n3p1147

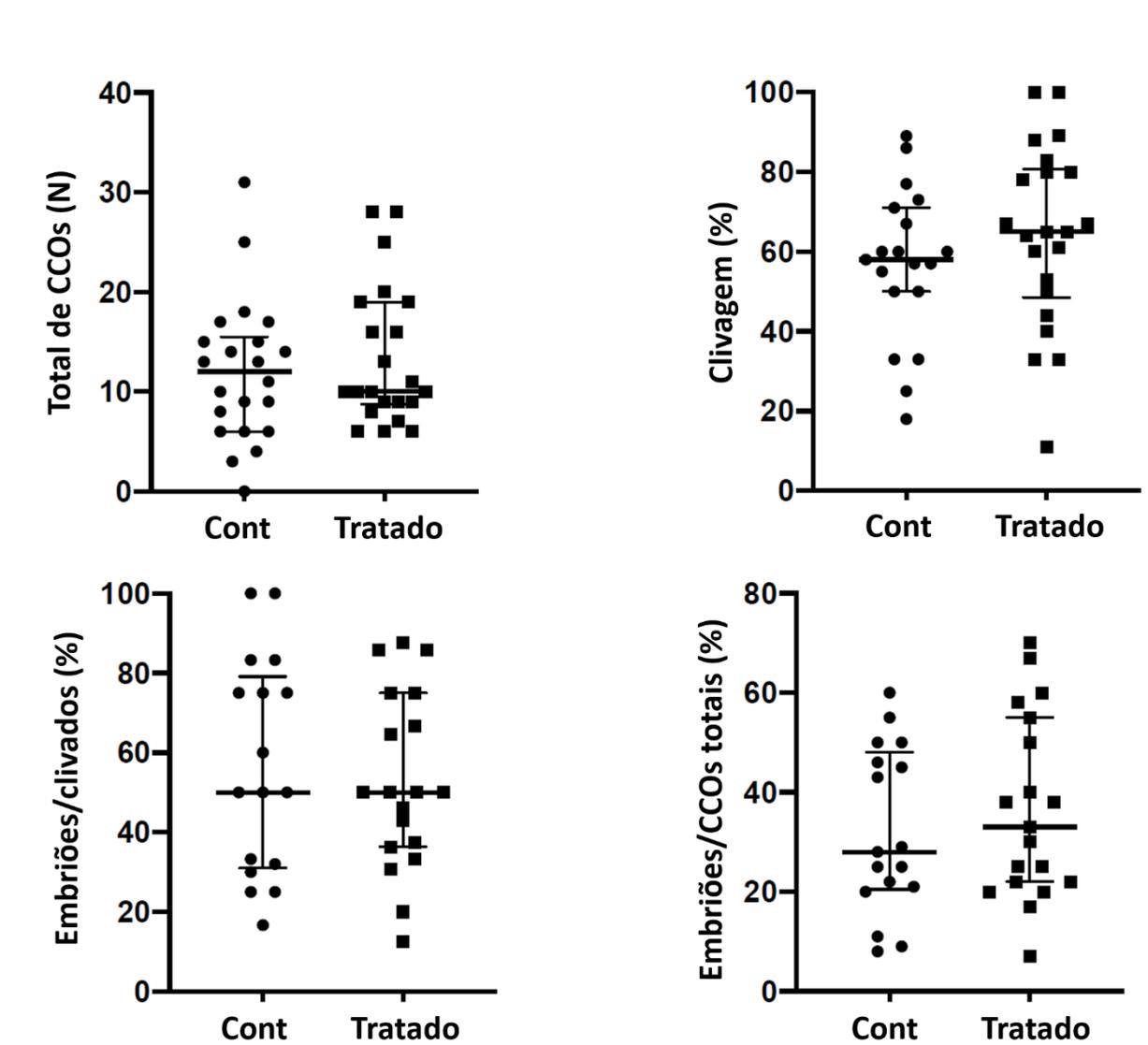


Figura 1 – Desempenho de fêmeas *Bos taurus* submetidas (Tratado) ou não (Cont) a um tratamento hormonal (P4i+BE+PGF) pré-aspiração folicular. A caixa representa os dados inclusos no 2º e 3º quartil e a linha horizontal no interior da caixa representa a mediana e separa os dois quartis centrais. Os pontos representam os indivíduos.

CCOs = Complexos Cumulus-oócito.

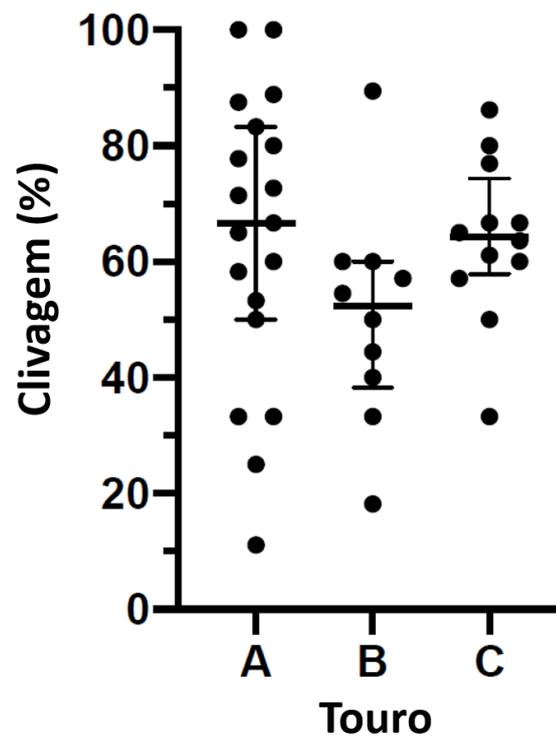


Figura 2 – Taxa de clivagem para cada touro utilizado na FIV.

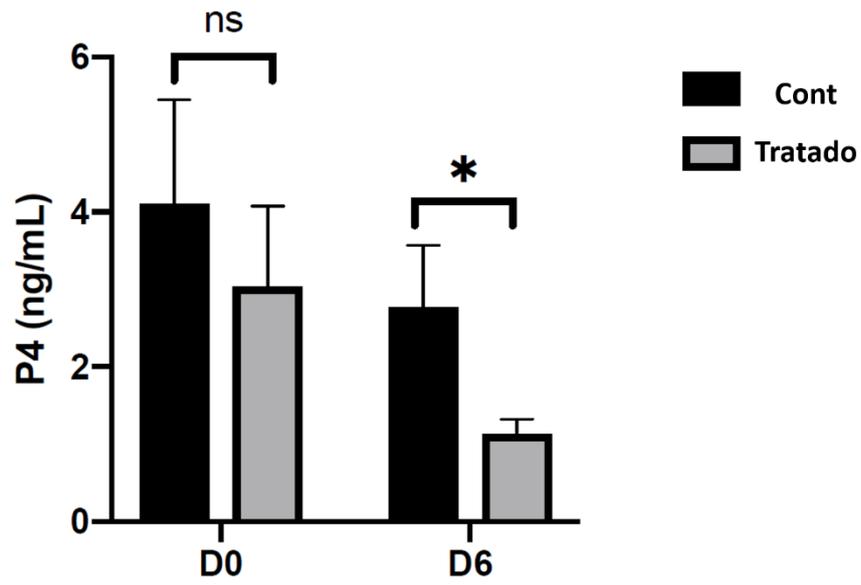


Figura 3 – Concentração de progesterona (P4) nos dias 0 (D0) e 6 (D6) em animais suplementados (Tratado) ou não (Cont) com o protocolo hormonal injetável (P4i+BE+PGF). A OPU foi realizada no D6.

4 Considerações Finais

Apesar de bem estabelecida a técnica de superovulação para produção de embriões *in vivo* (SOV-TE) apresenta algumas limitações, como a recuperação de estruturas não fecundadas. No primeiro estudo, esperava-se que o tratamento com PGF possibilitaria maior sincronia de ovulações e/ou efeito positivo no transporte de gametas, resultando em menor proporção de oócitos não fecundados, logo, maior número de embriões viáveis. Porém a hipótese não foi confirmada e concluiu-se que a administração de PGF no momento da primeira IA não afeta a produção embrionária de vacas superovuladas. Entretanto, é possível que um maior número de aplicações, ou os tratamentos em outros momentos, possam induzir os efeitos positivos na ovulação e/ou fecundação, conforme relatado em outros estudos.

A produção *in vitro* de embriões está muito bem estabelecida para fêmeas de raças zebuínas, que representam a maior parte do rebanho bovino brasileiro. Entretanto, a PIVE em fêmeas taurinas apresenta uma importante limitação, relacionada ao baixo número de CCOs obtidos após cada aspiração folicular. No segundo estudo, a hipótese de que o tratamento hormonal para indução de nova onda folicular previamente à OPU aumentaria o número de CCOs viáveis e, portanto, melhoraria a produção embrionária, não foi confirmada. Concluiu-se que a sincronização da onda folicular antes da OPU não melhorou a qualidade oocitária e produção *in vitro* de embriões em vacas *Bos taurus*, tornando o seu uso dispensável.

Portanto, novas estratégias devem ser estudadas para melhorar a produção embrionária. Por exemplo, pode-se avaliar se múltiplas administrações de PGF, ou tratamento com prostaglandina E2, podem melhorar a taxa de fecundação *in vivo* em bovinos. No que se refere a OPU-PIVE em fêmeas *Bos taurus*, é necessário avaliar alternativas como o tratamento com eCG, ou FSH diluído em formulações de liberação lenta, para estimular o desenvolvimento de um maior número de folículos e, conseqüentemente, aumentar o número e qualidade dos CCOs aspirados.

Além de investigar alternativas para aperfeiçoar as técnicas de produção de embriões *in vivo* e *in vitro* para maximizar a disseminação da genética de animais superiores, deve-se avaliar cada caso individualmente (fazenda e animais), para eleger então, a técnica que melhor se encaixa para alcançar os objetivos. Também pode-se combinar a PIVE com a SOV, de acordo com a categoria animal ou *status* reprodutivo do indivíduo a ser trabalhado.

Referências

AMBROSE, D. J., et al. Low-dose natural prostaglandin F2alpha (dinoprost) at timed insemination improves conception rate in dairy cattle. **Theriogenology**, v.83, n.4, p.529-34. 2015.

AQUINO, C., Livestock and Products Semi-annual. **Global Agricultural Information Network**. Brasilia, 02 mar. 2021. Livestock and Products, n.7.

BACELAR, D., et al. Incremento na obtenção de oócitos em novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*) tratadas com progesterona injetável e benzoato de estradiol. **Semina: Ciências Agrárias**, v.31, p.163-172. 2010.

BERISHA, B., et al. Prostaglandins in Superovulation Induced Bovine Follicles During the Preovulatory Period and Early Corpus Luteum. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v.10, p.467. 2019.

CARVALHO, J. G. S., et al. Administration of PGF2alpha during the periovulatory period increased fertilization rate in superovulated buffaloes. **Theriogenology**, v.145, p.138-143. 2020.

CARVALHO, P. D., et al. Effects of deep-horn AI on fertilization and embryo production in superovulated cows and heifers. **Theriogenology**, n.80, p.1074–1081. 2013.

CASTRO, N. A., et al. Use of prostaglandin F2alpha as ovulatory stimulus for synchronizing dairy cattle. **Res Vet Sci**, v.118, p.151-154. 2018.

DE LOOS, F., et al. Morphology of immature bovine oocytes. **Gamete Res**, v.24, n.2, p.197-204. 1989.

DEMETRIO, D. G. B., et al. How can we improve embryo production and pregnancy outcomes of Holstein embryos produced in vitro? (12 years of practical results at a California dairy farm). **Animal Reproduction**, v.17. 2020.

EVERSOLE, D., et al. Body condition scoring beef cows. **Virginia Cooperative Extension** 2009.

FERNANDES, C., et al. Hormonal protocols for in vitro production of Zebu and taurine embryos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.49, p.813-817. 2014.

FERRAZ, J. B.; P. E. FELICIO. Production systems--an example from Brazil. **Meat Sci**, v.84, n.2, p.238-43. 2010.

FERRÉ, L. B., Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. **Animal**, v.14, n.5, p.991–1004. 2020

GARCIA GUERRA, A., et al. Lengthening the superstimulatory treatment protocol increases ovarian response and number of transferable embryos in beef cows. **Theriogenology**, v.78, n.2, p.353-60. 2012.

GIMENES, L. U., et al. 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.385-93. 2015.

HANSEN, P. J. Current and future assisted reproductive technologies for mammalian farm animals. **Adv Exp Med Biol**, v.752, p.1-22. 2014.

HASLER, J. F. Bovine Embryo Transfer: Are Efficiencies Improving? Proceedings, **Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle**. Sioux Falls, SD, December 3-4, 2012.

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, p.152–169. 2014.

LEONARDI, C. E., et al. Prostaglandin F₂α promotes ovulation in prepubertal heifers. **Theriogenology**, v.78, n.7, p.1578-82. 2012.

LIMA, W. M., et al. Improved superovulatory response in beef cattle following ovarian follicular ablation using a simplified transvaginal device. **Anim Reprod Sci**, v.100, n.3-4, p.364-70. 2007.

LOPEZ-GATIUS, F., et al. Reproductive performance of lactating dairy cows treated with cloprostenol at the time of insemination. **Theriogenology**, v.62, n.3-4, p.677-89. 2004.

MAPLETOFT, R., et al. In vitro and in vivo embryo production in cattle superstimulated with FSH for 7 days. **Animal Reproduction**, v.12, n.3, p.383-388. 2015.

MAPLETOFT, R. et al. Evolution of knowledge on ovarian physiology and its contribution to the widespread application of reproductive biotechnologies in South American cattle. Proceedings of the **10th International Ruminant Reproduction Symposium** (IRRS 2018); Foz do Iguaçu, PR, Brazil, September 16th to 20th, 2018.

MIKKOLA, M., Factors affecting embryo production in superovulated *Bos taurus* cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v.32, p.104–124. 2020.

MOHAMMADI, A., et al. Effect of prostaglandin F₂α and GnRH administration at the time of artificial insemination on reproductive performance of dairy cows. **Vet Res Forum**, v.10, n.2, p.153-158. 2019.

MORRISON, D. G., et al. Effect of prostaglandin F₂ α at insemination on sperm cell numbers and pregnancy rate in beef cattle. **Theriogenology**, v.30, n.1, p.109-118. 1988.

ONGARATTO, F. L., et al. Effect of FSH treatment on cumulus oocyte complex recovery by ovum pick up and in vitro embryo production in beef donor cows. **Animal reproduction science**, v.214, p.106274. 2020.

RAMOS, A. F., et al. Effect of follicular wave synchronization on in vitro embryo production in heifers. **Animal reproduction science**, v.117, n.3-4, p.201-7. 2010.

RODRIGUES, C. F. M. Historical context of cattle embryo transfer technique in Brazil. **Anim. Reprod.**, v.11, n.3, p.137-140, 2014.

ROVANI, M. T., et al. Prostaglandin F₂ α -induced luteolysis involves activation of Signal transducer and activator of transcription 3 and inhibition of AKT signaling in cattle. **Mol Reprod Dev**, v.84, n.6, p.486-494. 2017.

VIANA, J. 2019 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals Divergent trends for IVD and IVP embryos. **Annual Conference of the International Embryo Technology Society**. New Orleans, Louisiana: International Embryo Technology Society 2019.

WILEY, C., et al. Effects of endogenous progesterone during ovarian follicle superstimulation on embryo quality and quantity in beef cows. **Theriogenology**, v.129, p.54-60. 2019.

WRENZYCKI, C. In vitro culture systems: how far are we from optimal conditions? **Anim Reprod**, v.13, p.279-282. 2016.

ZAMAI, M., et al. Synchronization with estradiol benzoate in the presence of the corpus luteum in Wagyu cows increases the number of medium follicles but does not interfere with in vitro production of embryos. **Semina:Ciencias Agrarias**, v.42, p.1147-1157. 2021.

Anexos

Anexo I - Documento da Comissão de Ética e Experimentação Animal



PARECER Nº
PROCESSO Nº

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
14/2019/CEEA/REITORIA
23110.057360/2018-79

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada “**Marcadores endócrinos, genéticos e moleculares relacionados à resposta a superovulação e qualidade embrionária em bovinos**”, processo nº 23110.057360/2018-19, sob a responsabilidade de **Rafael Giannela Mondadori** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 16/04/2019.

Finalidade (X) Pesquisa () Ensino

Vigência da 17/04/2019 a 30/12/2022
autorização

Espécie/linhagem/raça **Bovinos/Holandês, Angus, Hereford, Braford e Brangus**

Nº de animais **668**

Idade **2 a 8 anos**

Sexo **Fêmeas**

Origem **Biotech Biotecnologia em Reprodução Animal. Linha Zona Porta, 4570 – Protásio Alves – RS**

Código para cadastro nº CEEA 57360-2018

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da CEEA



Documento assinado eletronicamente por **ANELIZE DE OLIVEIRA CAMPELLO FELIX**, Médico Veterinário, em 17/04/2019, às 14:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 0509745 e o código CRC B0EF698B.

Referência: Processo nº 23110.057360/2018-79

SEI nº 0509745

Criado por 00246127074, versão 2 por 00246127074 em 17/04/2019 14:37:36.