

**UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO – UNIFENAS
ASAFE COSTA LOPES**

**EXPRESSÃO GÊNICA DE MEMBROS DO SISTEMA IGF EM OÓCITOS E
CÉLULAS DO CUMULUS PROVENIENTES DE VACAS DE DIFERENTES
GENÓTIPOS LEITEIROS**

**ALFENAS – MG
2016**

ASAFE COSTA LOPES

**EXPRESSÃO GÊNICA DE MEMBROS DO SISTEMA IGF EM OÓCITOS E
CÉLULAS DO CUMULUS PROVENIENTES DE VACAS DE DIFERENTES
GENÓTIPOS LEITEIROS**

Dissertação apresentada à Universidade José do Rosário Vellano
- UNIFENAS, para a obtenção do Título de Mestre em
Reprodução, Sanidade e Bem-estar Animal.
Orientadora: Profa. Dra. Ester Siqueira Caixeta Nogueira

Alfenas – MG

2016

Lopes, Asafe Costa

Expressão gênica de membros dos sistema IGF em oócitos e células do cumulus provenientes de vacas de diferentes genótipos leiteiros— Asafe Costa Lopes.—Alfenas, 2016.

39 f.

Orientadora: Profª Drª Ester Siqueira Caixeta Nogueira
Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-graduação
em Reprodução, Sanidade e Bem Estar Animal - Universidade
José do Rosário Vellano, Alfenas, 2016.

1. Gado de leite 2. Qualidade oocitária 3. Sistema IGF
4. Expressão gênica I.Universidade José do Rosário Vellano II. Título
CDU : 636.082(043)



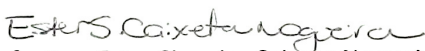
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: “EXPRESSÃO GÊNICA DE MEMBROS DO SISTEMA IGF EM ÓOCITOS E CÉLULAS DO CUMULUS PROVENIENTES DE VACAS DE DIFERENTES GENÓTIPOS LEITEIROS”.

Autor: Asafe Costa Lopes

Orientador: Profa. Dra. Ester Siqueira Caixeta Nogueira

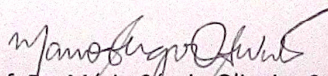
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de **MESTRE EM REPRODUÇÃO, SANIDADE E BEM-ESTAR ANIMAL** pela Comissão Examinadora.


Profa. Dra. Ester Siqueira Caixeta Nogueira
Orientadora


Prof. Dr. José Antonio Dias Garcia


Prof. Dr. Lincoln da Silva Amorim

Alfenas, 03 de agosto de 2016.


Prof. Dr. Mário Sérgio Oliveira Swerts
Diretor de Pesquisa e Pós-graduação
UNIFENAS

A todos que acreditaram em meu potencial e que de alguma maneira contribuíram para o sucesso deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, a peça fundamental para que tivesse a inteligência e força necessárias para a realização deste projeto. À minha orientadora Ester, pela confiança, compreensão e por ter fornecido todo o suporte necessário para o sucesso do trabalho. A meu pai, Mauro Sérgio Lopes, minha mãe, Regina Félix Costa e irmão, André Costa Lopes, que jamais me desampararam nos momentos vividos ao longo desta caminhada. À Universidade José do Rosário Vellano, Universidade Federal de Alfenas, à empresa Biotran e a Fazenda Rancho Grande que forneceram toda infraestrutura e os animais necessários para a realização deste trabalho, aos meus queridos professores que incentivaram e me ampararam nesta jornada, não podendo deixar de citar a Professora Luísa Barbosa Messoria pelas longas conversas e motivações, além da concessão da oportunidade de ingresso de fato na vida acadêmica, além dos coordenadores do programa de pós-graduação da UNIFENAS.

“Dificuldades preparam pessoas comuns para destinos extraordinários.”

C.S. Lewis

RESUMO

Nos últimos anos observou-se um aumento expressivo do uso da Produção *In-vitro* de Embriões (PIVE) em raças bovinas leiteiras. Neste contexto, é conhecido que as diferenças na quantidade e no potencial de desenvolvimento oocitário entre fêmeas de raças europeias (*Bos taurus taurus*) e zebuínas (*Bos indicus taurus*) afetam consideravelmente a eficiência e a viabilidade econômica da PIVE. Sabendo que o sistema dos fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF) está relacionado à capacidade de desenvolvimento dos oócitos, o objetivo deste estudo foi avaliar a expressão de genes do sistema IGF nos complexos cumulus oócitos (COCs) oriundos de doadoras das raças Gir, Holandesa e mestiças F1 (1/2 Holandesa x 1/2 Gir). Os COCs imaturos foram recuperados por aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU) em fazendas na região sul do estado de Minas Gerais, Brasil. Os oócitos e as células do cumulus provenientes de grupos de 30 COCs (n=4/raça) foram mecanicamente separados e armazenados em nitrogênio líquido. Foram selecionados para as análises somente COCs classificados como grau 1 e viáveis. O RNA total foi extraído de “pools” de 30 oócitos e das células do cumulus correspondentes utilizando o kit RNeasy® (Qiagen). A expressão dos genes alvo (*IGF1* e *IGF2*), seus receptores (*IGFR1* e *IGFR2*), proteínas de ligação aos IGFs (*IGFBP2* e *IGFBP4*) e proteína de inativação IGFBPase (também conhecida como “Proteína Plasmática Associada a Gravidez”; *PAPP-A*), foi investigada por RT-PCR em tempo real utilizando o sistema Power Sybr® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e normalizada pela Ciclofilina-A (*CYC-A*). A quantificação relativa do RNAm foi determinada pelo método de $\Delta\Delta C_t$ com correção de eficiência. Os efeitos das diferentes raças sobre a expressão dos genes alvo nos oócitos e nas células do cumulus foram testados por ANOVA e os grupos foram comparados pelo teste de Tukey-Kramer HSD. O nível de significância foi considerado $P < 0,05$. Nos oócitos houve uma maior expressão do RNAm codificante para *IGFR1* em doadoras Gir em relação às 1/2 Holandesa x 1/2 Gir e Holandesas. A abundância relativa de RNAm do *IGF2*, *IGFR2* e *IGFBP4* foi maior nas células do cumulus de vacas Holandesas quando comparado às vacas Gir e 1/2 Holandesa x 1/2 Gir. A expressão do RNAm da enzima *PAPP-A* foi maior nas células do cumulus e nos oócitos das doadoras Gir e 1/2 Holandesa x 1/2 Gir em comparação com as Holandesas. Não houve alteração na expressão dos genes *IGF1*, *IGF2*, *IGFR2*, *IGFBP2* e *IGFBP4* nos oócitos,

assim como dos genes *IGF1*, *IGFR1* e *IGFBP2* nas células do cumulus entre as raças. Em conclusão, a maior expressão de *PAPP-A* nos oócitos e células do cumulus de COCs provenientes de doadoras das raças Gir e 1/2 Holandês x 1/2 Gir associada à baixa expressão de *IGFBP4* nas células do cumulus destas, sugere uma degradação mais eficiente das IGFBPs, resultando em maior biodisponibilidade dos IGFs em COCs imaturos das raças Gir e meio sangue (1/2 Holandesa x 1/2 Gir) quando comparado com COCs da raça Holandesa.

Palavras-chave: Gado de leite; Qualidade oocitária; Sistema IGF; Expressão gênica.

ABSTRACT

In last years it has been noted increasing utilization of in vitro embryo production (IVEP) in dairy breeds production. In this context, is known that differences in the number and development potential of oocytes between European (*Bos taurus taurus*) and Zebu (*Bos indicus taurus*) cows affect extremely the efficiency and economic viability of IVEP. Since, insulin-like growth factor (IGF) system is related to developmental capacity of oocytes, the aim of this study was to quantify mRNA abundance of IGF system members in cumulus oocytes complex (COCs) from Gir, Holstein and 1/2 Holstein x 1/2 Gir donor cows. Pools of 30 immature COCs from Gir (n=4 pools), Holstein (n=4 pools) and 1/2 Holstein x 1/2 Gir donor cows (n=4 pools) were obtained by ovum pick-up on farms in the southern region of Minas Gerais state, Brazil. Oocytes and cumulus cells were mechanically separated and stored in liquid nitrogen. Only selected COCs were analyzed with homogeneous cytoplasm and surrounded by, at least, three layers of compact cumulus cells were selected for the experiment. Total RNA was extracted from pools of 30 oocytes and their respective cumulus cells using the RNeasy® kit (Qiagen). The investigation of target genes (*IGF1* and *IGF2*), their receptors (*IGFR1* and *IGFR2*), as well as IGF binding proteins (*IGFBP2*, *IGFBP4*), and pregnancy-associated plasma protein-A (*PAPPA*) was assessed by real time RT-PCR using Power SYBR® green master mix (Applied Biosystems) and normalized by Cyclophilin (*CYC-A*). Relative quantification of mRNA abundance was determined using the $\Delta\Delta C_t$ method with correction by Pfaffl's equation. Effects of breeds on the expression of target genes in oocytes and cumulus cells were tested by ANOVA and means were compared by Tukey-Kramer HSD test. Differences were considered significant when $P < 0.05$. In oocytes, mRNA encoding *IGFR1* was higher in Gir compared to Holstein and 1/2 Holstein x 1/2 Gir animals. The relative mRNA abundance of *IGF2*, *IGFR2* and *IGFBP4* was higher in the cumulus cells of Holstein donor compared to Gir cows. The mRNA abundance of *PAPPA* was higher in cumulus cells and oocytes in Gir and 1/2 Holstein x 1/2 Gir donor cows compared to the Holstein donors. No differences on mRNA abundance of *IGF1*, *IGF2*, *IGFR2*, *IGFBP2* and *IGFBP4* in oocytes and *IGF1*, *IGFR1* and *IGFBP2* in cumulus cells were demonstrated among different breeds. In conclusion, the higher *PAPPA* mRNA abundance in oocyte and cumulus cells from Gir and 1/2 Holstein x 1/2 Gir donors associated

with low expression of *IGFBP4* in cumulus cells of these breeds, suggest more efficient degradation of IGFBPs, which results in greater bioavailability of IGF in Gir and crossbred (1/2 Holstein x 1/2 Gir) COCs when compared to the Holstein immature COCs.

Keyword: Dairy cattle; Oocyte quality; IGF system; Gene expression.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Região do Crescente Fértil, berço de origem das raças taurinas.	22
Figura 2 - Região de Indus Valley, berço de origem das raças zebuínas.....	22

CAPITULO 1

Figura 1 - Efeitos das diferentes raças, 1/2 Holandesa x 1/2 Gir (GR), Gir (GIR) e Holandesa (HOL), na expressão do RNAm de IGF1, IGF2, IGFR1, IGFR2, IGFBP2, IGFBP4 e PAPP-A nos oócitos provenientes de COCs imaturos obtidos por aspiração folicular guiada por ultrassonografia. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média. A quantificação relativa do RNAm foi determinada pelo método de $\Delta\Delta Ct$ e normalizada pelo gene constitutivo Ciclofilina-A (CYC-A). As barras com diferentes letras indicam valores significativamente diferentes ($P < 0,05$). Os dados foram obtidos a partir de quatro réplicas para grupo experimental.....	61
Figura 2 - Efeitos das diferentes raças, 1/2 Holandesa x 1/2 Gir (GR), Gir (GIR) e Holandesa (HOL), na expressão do RNAm de IGF1, IGF2, IGFR1, IGFR2, IGFBP2, IGFBP4 e PAPP-A nas células do cumulus provenientes de COCs imaturos obtidos por aspiração folicular guiada por ultrassonografia. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média. A quantificação relativa do RNAm foi determinada pelo método de $\Delta\Delta Ct$ e normalizada pelo gene constitutivo Ciclofilina-A (CYC-A). As barras com diferentes letras indicam valores significativamente diferentes ($P < 0,05$). Os dados foram obtidos a partir de quatro réplicas para grupo experimental.....	62

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores, tamanho do fragmento amplificado em pares de base (pb) e temperatura de anelamento utilizados para a amplificação pela PCR em tempo real.	60
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA – Ácido Desoxirribonucleico
cDNA – Ácido Desoxirribonucleico Complementar
RNA – Ácido Ribonucleico
RNAm – Ácido Ribonucleico Mensageiro
NSILA – Atividade Semelhante a Insulina Não Supressivo
Cm – Centímetro
CYC-A – Ciclofilina A
OPU – Coleta de Oócitos
COC – Complexo Cumulus-oócito
CIV – Cultivo *In vitro*
EPM – Erro Padrão da Média
EGF – Fator de Crescimento Epidermal
IGF – Fator de Crescimento Semelhante a Insulina
FIV – Fertilização *In vitro*
GAPDH - Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
°C – Graus Célsius
H2A – Histona 2a
GH –Hormônio do Crescimento
FSH – Hormônio Folículo Estimulante
LH – Hormônio Luteinizante
MIV – Maturação *In vitro*
MHz – Megahertz
µl – Microlitro
mL – Mililitro
mL/min – Mililitro por minuto
Mm – Milímetro
mm/Hg – Milímetros de Mercúrio
PIVE – Produção *In vitro* de Embriões
IGFBP – Proteína Ligadora de IGF

PAPP-A - Proteína Plasmática Associada à Gestação A

MAPK - Proteína-quinases Ativadas por Mitógenos

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

EGFR – Receptor do Fator de Crescimento Epidermal

IGFR – Receptor de Fator de Crescimento Semelhante a Insulina

RPM – Rotações por Minuto

AKT – Serina Treonina Proteína Kinase

PBS – Tampão Fosfato-salino

RT – Transcrição Reversa

UI/mL – Unidades internacionais por mililitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	18
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	21
2.1 A Domesticação bovina e surgimento das raças atuais.....	21
2.1.1 Introdução dos bovinos na américa.....	22
2.2 Raça Gir.....	23
2.3 Raça Holandesa.....	23
2.4 Meio Sangue Holandês/Gir	23
2.5 A importância da produção <i>in vitro</i> de embriões no gado leiteiro e seus desafios.....	24
2.6 Fatores de Crescimento Semelhantes a Insulina.....	26
2.6.1 O papel dos IGFs durante a foliculogênese	27
2.6.2 Participação dos IGFs na maturação oocitária e desenvolvimento embrionário	30
3 CAPITULO 1 – EXPRESSÃO GÊNICA DE MEMBROS DO SISTEMA IGF EM COCs PROVENIENTES DE VACAS DE DIFERENTES GENÓTIPOS LEITEIROS.....	32
Resumo.....	33
Abstract	35
Introdução.....	36
Material e métodos.....	39
Delineamento experimental.....	39
Aspiração folicular e recuperação dos complexos cumulus-oócitos (COCs)	39
Análise de expressão gênica.....	41
Análise estatística	42
Resultados e Discussão	44
Conclusão	48

Agradecimentos	49
Referências	50
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O crescimento do setor agropecuário esteve acima da média de desenvolvimento geral do país nos últimos anos. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, (IBGE) a agropecuária se manteve como um dos sustentáculos do Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro no ano de 2015¹.

Neste sentido vale destacar que a pecuária leiteira é de fundamental importância para o setor agropecuário brasileiro. Em 2014, a produção de leite foi de 35,17 bilhões de litros, representando um aumento de 2,7% em relação à registrada no ano anterior. De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (United States Department of Agriculture - USDA), o Brasil ocupou a quinta posição no “ranking” mundial de produção de leite em 2014 (IBGE, 2015). Minas Gerais ganha posição de destaque no cenário pecuário nacional por ser o estado maior produtor de leite do Brasil, responsável por cerca de 28% da produção nacional (IBGE, 2015).

Ainda que parte do rebanho mineiro seja constituída de animais de raças taurinas, principalmente Holandesas e Jersey, uma grande proporção dos animais destinados à produção leiteira é de origem zebuína ou seus cruzamentos. Animais que nas condições de clima e manejo das propriedades mineiras, podem ser tão ou mais eficientes que as raças europeias. Dentre as raças *Bos indicus taurus*, a vaca Gir é a principal raça leiteira usada nos trópicos. Ela é amplamente utilizada na América do Sul, principalmente no Brasil, onde o melhoramento genético vinculado ao processo de seleção para a produção de leite vem ocorrendo há anos (CAMARGO et al., 2007). Além disso, ocupam posição de destaque os mestiços F1 (1/2 Holandês x 1/2 Gir), os quais devido aos efeitos favoráveis de heterose e complementariedade das raças possuem aptidão leiteira e maior adaptabilidade (MADALENA; PEIXOTO; GIBSON, 2012).

No entanto, um dos principais desafios para a maioria dos produtores de leite com gado mestiço é a dificuldade em manter os rebanhos no grau de sangue desejado, quer seja pela inseminação artificial ou pela monta natural (GOULART et al., 2009). Os sistemas de produção brasileiros ainda buscam um mecanismo eficaz para suprir a reposição de fêmeas mestiças F1 (1/2 sangue) ou F2 (3/4; MARCATTI-NETO; RUAS; BORGES, 2004). Neste

¹ <http://www1.folha.uol.com.br/mercado/2015/08/1674821-agropecuaria-ainda-sustenta-pib.shtml>

sentido, a utilização de biotécnicas como a produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma alternativa para a formação e manutenção de rebanhos que visa à utilização de fêmeas F1 ou F2 para a produção de leite. É válido mencionar que nos últimos anos observou-se um aumento expressivo do uso da PIVE em raças leiteiras (VIANA et al., 2010; 2012a), o que pode ser atribuído, em grande parte, pela disponibilidade de sêmen sexado (VIANA et al., 2012b) e pela demanda de animais de produção, como no caso dos rebanhos F1. No Brasil, estima-se uma demanda anual de 2 a 4 milhões de novilhas de reposição para rebanhos leiteiros, e a PIVE pode ser uma alternativa valiosa para fornecer animais com maior potencial de produção para este segmento (VIANA et al., 2012a).

Com o programa de melhoramento genético da raça Gir Leiteiro, iniciado em 1985, existem disponíveis hoje no mercado, sêmen de touros provados para leite, o que estimula sua utilização para a produção de animais F1, usando o Holandês como raça materna. A utilização desse cruzamento é uma alternativa, porém, a eficiência e viabilidade econômica da PIVE são limitadas quando doadoras de raças taurinas são utilizadas, uma vez que estas apresentam menor número de folículos disponíveis para aspiração em seus ovários e reduzido potencial de desenvolvimento de seus oócitos, influenciando diretamente no número de prenhez por aspiração (BLONDIN et al., 2002; MERTON et al., 2003). Segundo Viana e colaboradores (2010; 2012b), existe um crescimento progressivo na utilização de raças leiteiras na PIVE no Brasil, principalmente das raças Gir e Girolando, pelo potencial destas raças na produção de embriões. Embora com grande potencial, os resultados são ainda discrepantes, por se tratar de um processo ainda insipiente nestas raças, o que demanda estudos adicionais específicos neste tipo de animal.

Neste contexto, é conhecido que a capacidade de desenvolvimento do oócito para sofrer a maturação completa, a fertilização e formar um embrião viável é influenciada pela presença de informações específicas na forma de RNAm e proteínas. Apesar de alguns genes já terem sido relacionados com a competência (DONNINSON e PFEFFER, 2004), os mecanismos pelos quais o oócito adquire essa competência ainda não foram completamente elucidados. Dentre alguns fatores apontados como reguladores do desenvolvimento oocitário, destacam-se os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs), cuja participação tem sido relatada nos diferentes estágios do desenvolvimento folicular, na maturação oocitária e no subsequente desenvolvimento embrionário (PALMA; MÜLLER; BREM, 1997; DEEMESTERE et al., 2004). Estudos demonstram que a adição de IGF1 durante a MIV proporciona um aumento na expansão das células do cumulus, uma melhora na maturação

nuclear e uma redução nos índices de apoptose no oócito (WASIELAK e BOGACKI, 2007 revisado por VELAZQUEZ et al., 2009).

Estudos que utilizam oócitos com diferentes potenciais de desenvolvimento associados à expressão gênica podem ajudar a compreender os mecanismos que permitem um melhor desempenho reprodutivo de determinadas raças doadoras. Tais conhecimentos podem contribuir na identificação de alterações necessárias para a melhoria da eficiência do processo de PIVE, refletindo em uma redução dos custos e uma maior produtividade e lucratividade do setor.

Sabendo as diferenças entre as raças zebuínas e europeias quanto ao desempenho reprodutivo e que os IGFs podem estar relacionados a variações individuais de competência oocitária, o objetivo do presente estudo baseou-se em verificar a expressão do RNAm de membros do sistema IGF em oócitos e células do cumulus derivados de vacas leiteiras das raças Gir (*Bos indicus taurus*), Holandesa (*Bos taurus taurus*) e mestiça F1 (*indicus-taurus*). Vale ressaltar que o gado mestiço F1 (1/2 Holandês x 1/2 Gir) tem sido amplamente utilizado para a produção de fêmeas leiteiras 3/4 pela técnica de PIVE, o que justifica a necessidade de ampliação do conhecimento dos aspectos fisiológicos da reprodução nestes animais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A Domesticação bovina e surgimento das raças atuais

Apesar da dificuldade de se precisar exatamente o momento em que os bovinos passaram a ser domesticados pelos seres humanos, suspeita-se que tal ação tenha se iniciado no período Neolítico da história e que esses animais tinham como função fornecer leite, couro e transporte além de ser símbolo de riqueza e utilizado em esportes como touradas e rodeios (VAN VUURE, 1998).

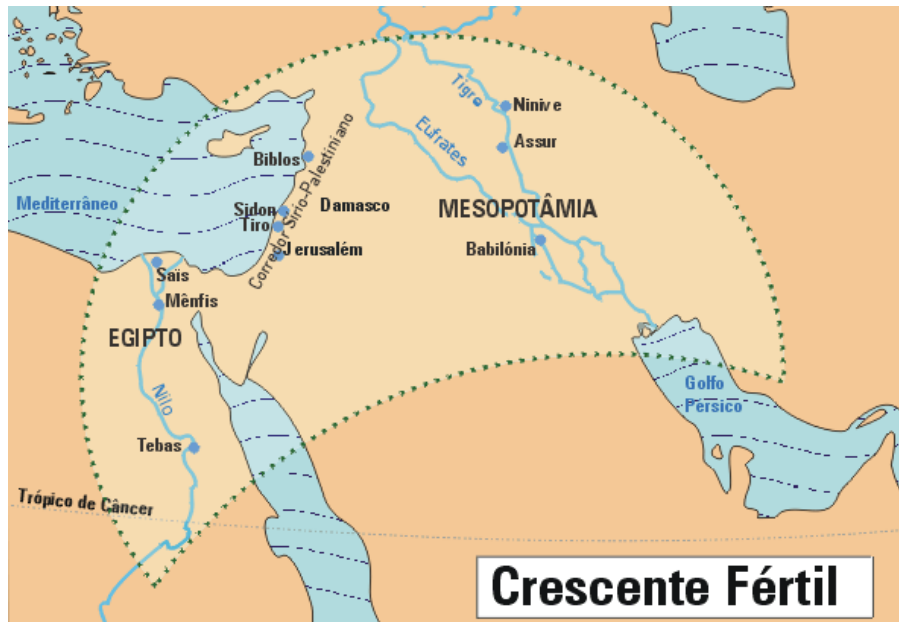
A domesticação bovina ocorreu por meio do *Bos primigenius*, conhecido também como Auroque, que era um excelente animal para fornecer carne e também pela sua grande força de tração que era aproveitada na agricultura (ISAAC, 1962).

Segundo Reed (1964), tanto o gado Taurino (*Bos taurus taurus*) quanto o Zebuínio (*Bos indicus taurus*), descendem da primeira raça domesticada pelos seres humanos, o Auroque (*Bos primigenius*) que estava presente desde o Atlântico até a costa do Pacífico, Tundra do norte, Índia e África.

A medida que o gado passou a ser domesticado, percebeu-se que esses animais sofreram diversas adaptações e modificações fenotípicas. Dentre elas destacam-se a redução gradativa do tamanho dos animais, a redução ou extinção dos chifres utilizados nas disputas territoriais, além da adaptação as mais diversas condições climáticas que iam de pastos verdes e clima ameno a regiões completamente áridas. Tais adaptações contribuíram para o surgimento de diversas raças especializadas que vêm sendo aprimoradas até os dias atuais (FELIUS, 1995).

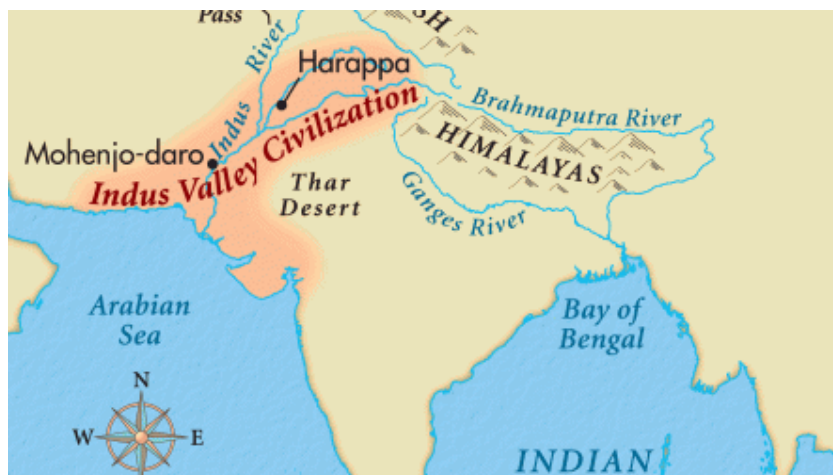
Surgiu então duas espécies derivadas do Auroque. Os animais domesticados na região do crescente fértil (Figura 1) deram origem aos Taurinos, e os animais que foram domesticados na região do Indus Valley (Figura 2) originaram os animais atualmente conhecidos como zebuínos ou índicos.

Figura 1 - Região do Crescente Fértil, berço de origem das raças taurinas.



Disponível em: <<http://www.infoescola.com/wp-content/uploads/2010/08/crescente-fertil.gif>>
 Acesso em: 04 de Junho de 2016.

Figura 2 - Região de Indus Valley, berço de origem das raças zebuínas.



Disponível em: <<http://childfriendlynews.com/wp-content/uploads/2014/01/map-460x250.gif>>.
 Acesso em: 04 de Junho de 2016.

2.1.1 Introdução dos bovinos na América

Após a descoberta das Américas, o gado passou a ser trazido para o continente americano juntamente com os desbravadores do território. Os primeiros animais a chegar em

continente americano foram trazidos da Espanha e África do Norte para o Caribe, seguido pela introdução dos animais na cidade de São Paulo - SP vindos de Portugal (FELIUS, 1995).

Ainda segundo Felius (1995), no século XIX, começaram também a chegar em território brasileiro animais vindos da Índia, introduzindo assim as raças zebuínas no país com a chegada do Guzerá em 1875, do Gir em 1890 e do Ongole em 1895.

2.2 Raça Gir

A raça Gir tem como origem a parte central da Península de Kathiawar a mais de seis mil anos atrás, nos pastos Savana, parte central da península. O gado Gir está entre uma das melhores raças zebuínas leiteiras existentes (KHACHAR, 2013).

A partir da introdução da raça no Brasil, notou-se que os animais desta raça, além de sua rusticidade, longevidade produtiva e reprodutiva, docilidade, baixo custo de manutenção e facilidade no parto, eram também animais com boa produção de leite, sendo então iniciado o processo de seleção genética para a produção de leite nestes animais a partir da década de 30 (O Gir..., 2012).

2.3 Raça Holandesa

Segundo Houghton (1897), não há um consenso sobre a origem da raça Holandesa, conjectura-se que o animal ao qual conhecemos hoje pelas características fenotípicas, tenha surgido apenas na segunda metade do século XVIII, devido as grandes enchentes e epidemias ocorridas na região Holandesa da Dinamarca, bem como ao início do processo de melhoramento genético para a produção leiteira que culminou com a importação de animais europeus, americanos, indianos, africanos e australianos e que desta mesclagem de animais surgiu então o gado negro malhado mundialmente conhecido.

Presume-se que o gado Holandês tenha sido trazido para território brasileiro entre os anos de 1530 e 1535, no período em que o país estava dividido em capitânias hereditárias.(GEORGEALVES, 2015)

2.4 Meio Sangue Holandês/Gir

De acordo com a Associação Brasileira dos Criadores de Girolando, (Generalidades..., 2016), supõe-se que a raça surgiu entre as décadas de 40 e 50 na região do vale do paraíba, São Paulo, quando um touro Gir invadiu uma pastagem vizinha e cobriu algumas vacas de raça Holandesas. Ao nascerem, notou-se uma grande diferença entre os animais nascidos e os

tradicionais da época, além de demonstrarem várias características interessantes aliando as qualidades das duas raças cruzadas, como a produção de leite e a rusticidade. A partir de então os criadores passaram a realizar tal cruzamento com mais frequência e a prática foi difundida por todo o Brasil.

A descendência foi então normatizada no ano de 1989, determinando que o animal caracterizado como Puro Sintético da Raça Girolando, deveria conter o grau de 5/8 Holandês com 3/8 Gir (Generalidades..., 2016).

2.5 A importância da produção *in vitro* de embriões no gado leiteiro e seus desafios

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos é uma biotecnologia utilizada em todo o mundo, principalmente no Brasil. O aumento no número de laboratórios que oferecem essa técnica a torna cada vez mais acessível aos pecuaristas. Seu princípio se baseia na aspiração folicular guiada por ultrassonografia, seguida pela maturação *in vitro* (MIV) e fecundação *in vitro* (FIV) dos oócitos obtidos e do cultivo *in vitro* (CIV) dos zigotos produzidos. Todo este processo ocorre em laboratórios, dentro de incubadoras com temperatura e atmosfera controladas, sendo que os embriões só são transferidos para as receptoras após seis ou sete dias de cultivo. Dentre as vantagens reprodutivas da PIVE, destacam-se a redução no intervalo entre gerações, obtida pela utilização de animais bastante jovens e o acelerado progresso genético, conseguido pela intensa exploração de matrizes geneticamente superiores (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2002).

No Brasil, a popularização da PIVE bovina entre criadores e selecionadores genéticos esteve associada inicialmente às raças zebuínas de corte. Dentre os fatores que impulsionaram esta particularidade estão a composição de nossos rebanhos majoritariamente formada por animais zebuínos ou seus cruzamentos e a eficiência da técnica a qual é maior nestas, devido ao maior número de oócitos obtidos por sessão de aspiração somado às melhores taxas de embriões produzidos *in vitro* (DE ROOVER et al., 2008; WATANABE et al., 2008). Contudo, nos últimos anos tem-se observado um crescimento progressivo do emprego da PIVE em raças leiteiras (VIANA et al., 2010; 2012b). No período de 2005 a 2010 o uso da PIVE em gado de corte caiu 24%, enquanto no gado leiteiro aumentou 764% (VIANA et al., 2012b). No Brasil, em 2013, 45,7% dos embriões produzidos *in vitro* foram obtidos de doadoras de raças leiteiras, enquanto 54,3% foram de vacas de corte (revisado por KADARMIDEEN et al., 2015). Este crescimento pode ser atribuído, em grande parte, à disponibilidade de sêmen sexado (RATH e JHONSON, 2009), uma vez que o maior percentual de machos nascidos com o uso de sêmen convencional era um dos fatores que

inviabilizava o uso da técnica em animais leiteiros (SIQUEIRA et al., 2012). Mais recentemente, o uso da PIVE na pecuária leiteira também foi impulsionado pela demanda de animais de reposição, como no caso dos rebanhos F1 (1/2 Holandês X 1/2 Gir), criando um novo mercado potencial para as tecnologias de embriões (VIANA et al., 2010; 2012b).

Até o início da década de 90, a obtenção de animais F1 era, na sua maioria, feita utilizando-se fêmeas da raça Gir e touros Holandeses. Isso porque a população de Gir era grande, a vaca Gir possuía custo relativamente baixo e dispunha-se de touros Holandeses provados para leite (VERNEQUE et al., 2010). Atualmente, a produção de F1 utilizando reprodutores Gir e doadoras Holandesas de alto mérito genético foi viabilizada através da PIVE, o que pela utilização da inseminação artificial era extremamente oneroso. Isso porque manter o sistema de produção de leite com matrizes Holandesas selecionadas para alta produção tem elevado custo, principalmente com nutrição e sanidade. Além disso, com o programa de melhoramento genético da raça Gir, iniciado em 1985, existem disponíveis no mercado sêmen de touros provados para leite, o que estimula a utilização destes para a produção de F1 (VERNEQUE et al., 2010).

Em adição, é válido mencionar que existe um mercado crescente para a formação de rebanhos com fêmeas 3/4 para a produção de leite (MADALENA; PEIXOTO; GIBSON, 2012), e, novamente, a PIVE tem sido uma ferramenta para a produção desses animais, através da utilização das fêmeas mestiças F1 (1/2 Holandês/Gir) como doadoras de oócitos (PONTES et al., 2010). Pontes e colaboradores (2010) mostraram que o desempenho de fêmeas F1 (1/2 Holandês/Gir) como doadoras de oócitos foi próximo ou até mesmo melhor do que o desempenho das doadoras Gir, considerando tanto o número de oócitos recuperados como o de embriões produzidos.

Tem sido relatado que particularidades reprodutivas entre fêmeas de raças europeias (*Bos taurus taurus*) e zebuínas (*Bos indicus taurus*) afetam consideravelmente a eficiência e a viabilidade econômica da PIVE (VIANA et al., 2012b). Dentre elas destacam-se o número de folículos disponíveis para aspiração nos ovários e a qualidade e potencial de desenvolvimento dos oócitos recuperados (LOPES et al., 2006; CAMARGO et al., 2007; DE ROOVER et al., 2008). Nesse sentido, Pontes e colaboradores (2010) mostraram que o número de oócitos e de embriões produzidos por aspiração foram superiores nas doadoras Gir quando comparado com as doadoras Holandesas. Em adição, Camargo *et al.* (2007), comparando as mesmas raças de doadoras, encontraram uma maior taxa de clivagem e produção de blastocistos, baseado no número de oócitos recuperados, em doadoras Gir. Tais dados sugerem que a raça

Gir apresenta um número superior de COCs recuperados e melhor qualidade intrínseca dos oócitos em relação à Holandesa.

Dentre os fatores que justificam o menor desempenho reprodutivo de animais das raças *Bos taurus taurus*, destaca-se a maior susceptibilidade destes animais ao estresse térmico. Em fêmeas europeias, a exposição a temperaturas tropicais comprovadamente prejudica o crescimento folicular, a secreção hormonal (WOLFENSON et al., 1995), reduz o potencial de desenvolvimento do oócito e a taxa de fecundação, além de comprometer o desenvolvimento embrionário (AL-KATANANI; PAULA-LOPES; HANSEN, 2002; SARTORI et al., 2002; SATRAPA et al., 2011). Em contraste, animais zebuínos são mais adaptados ao clima tropical, demonstrando maior tolerância ao calor. Consequentemente, animais *Bos indicus taurus* têm mostrado melhor desempenho reprodutivo se comparados a animais *Bos taurus taurus* quando em regiões tropicais e subtropicais (BO; BARUSELLI; MARTINEZ, 2003; CAMARGO et al., 2007).

Dentre alguns dos fatores apontados como reguladores do desenvolvimento oocitário tanto na presença quanto na ausência de estresse térmico, destacam-se os Fatores de Crescimento Semelhantes à Insulina (IGFs).

2.6 Fatores de Crescimento Semelhantes a Insulina

O sistema IGF é composto pelos polipeptídios estruturalmente relacionados à pró-insulina, os fatores IGF1 e IGF2, os quais se ligam a dois tipos de receptores (IGFR1 e IGFR2) e seis proteínas de ligação (IGFBP-1, -2, -3, -4, -5, e -6). Esses fatores exercem atividade sobre o metabolismo intermediário, a proliferação, o crescimento e a diferenciação celular (JONES e CLEMMONS, 1995).

Os IGFs foram descritos por Kaye (1992) e Zapf *et al.* (1980), como membros de uma superfamília de peptídeos séricos ligados que evoluíram de uma duplicação genética ocorrida em milhões de anos até resultar na insulina, IGF1, IGF2 e relaxina.

Dulak e Temin (1973), pesquisando a presença de fatores de crescimento no soro, reconheceram um fator que apresentava atividade em diversos tecidos e deram o nome a este fator de anticorpos anti-insulina (NSILA I e II), que depois passou a se chamar de Somatomedinas. Após demonstrar a semelhança estrutural da cadeia beta desse fator com a cadeia beta da insulina, este passou a receber a denominação de fator de crescimento semelhante à insulina 1 e 2 (IGF1 e IGF2).

Odle, Zijlstra e Donovan (1996), demonstraram que a sequência de aminoácidos é altamente conservada entre as espécies e que o IGF1 apresenta 100% de homologia entre humanos, suínos, ovinos e bovinos, e 96% para o IGF2 entre humanos e bovinos.

O fígado é o órgão responsável pela maior produção de IGF1 do organismo, exercendo a função de hormônio endócrino. Sua produção é estimulada pelo hormônio do crescimento (GH) e sua secreção é concomitantemente à sua produção, uma vez que não há um órgão de armazenamento específico (DELAFONTAINE; SONG; LI, 2004; HORIO et al., 2005; GUNTUR e ROSEN, 2013). O IGF1 também pode ser sintetizado por tecidos-alvos como ovários, tubas uterinas, útero e pelo próprio embrião, atuando, neste caso, de forma parácrina e autócrina (SPICER e ECHTERNKAMP, 1995; WATSON; WESTHUSIN; WINGER, 1999; DAFTARY e GORE, 2005; MAGALHÃES et al., 2012). O sistema parácrino/autócrino intraovariano do IGF participa na regulação do desenvolvimento folicular e da esteroidogênese, tanto sozinho quanto em sinergismo com as gonadotrofinas (GIUDICE, 1992; ARMSTRONG et al., 2002; THOMAS et al., 2007; MAGALHÃES et al., 2012). Além disso, tem sido demonstrado que o IGF1 e o IGF2 participam da maturação do oócito, ovulação, implantação e embriogênese (YOSHIMURA, 2003).

No plasma e em outros fluidos biológicos os IGFs se ligam a uma família de proteínas conhecidas como proteínas de ligação ao IGF (IGFBPs) que regulam sua disponibilidade nas células alvo (YAKAR et al., 2002). Bachelot *et al.* (2002) relatam que as IGFBPs estão presentes em todos os fluidos biológicos. De forma geral, as IGFBPs possuem quatro funções essenciais na regulação das atividades dos IGFs: 1) atuam como proteínas de transporte no plasma; 2) prolongam a meia-vida dos IGFs por regular sua depuração metabólica; 3) proporcionam um meio de transporte a tecidos de células-alvo de tipo específico; 4) modulam diretamente a interação dos IGFs com seus receptores e, assim, indiretamente, controlam a sua biodisponibilidade (RIVERA e FORTUNE, 2001).

A biodisponibilidade dos IGFs pode ser aumentada por meio da atividade de enzimas específicas de inativação das IGFBPs, as IGFBPs proteases (MONGET et al., 1996). A proteína PAPP-A (“Proteína Plasmática Associada à Gravidez”) é uma protease para o IGFBP-2, -4 e -5 e tem importante função na regulação da biodisponibilidade dos IGFs (LAWRENCE et al., 1999).

2.6.1 O papel dos IGFs durante a foliculogênese

O desenvolvimento do folículo, que se dá desde o seu estágio primordial até o pré-ovulatório é denominado foliculogênese. Tal processo envolve etapas de ativação,

crescimento e maturação, sendo controladas através da interação de vários fatores que podem ser autócrinos, endócrinos ou parácrinos (GOUGEON, 1996).

Tem sido relatada uma importante influência do sistema IGF na regulação das diversas etapas do desenvolvimento folicular (MAGALHÃES et al., 2012). Durante a fase pré-antral, apesar dos folículos serem responsivos às gonadotrofinas, os maiores responsáveis pela regulação da foliculogênese são os fatores intraovarianos. Durante esta fase na espécie bovina, os IGFs parecem apresentar ação endócrina, uma vez que os folículos pré-antrais não expressam os ligantes IGF1 ou IGF2, mas expressam receptores (IGFR1) e proteínas ligantes (IGFBP-2 e 3), que mediam a ação e regulam a disponibilidade local de IGF1 de origem hepática (WEBB et al., 2003).

Elvin e Matzuk, (1998) utilizando roedores nocaute para o gene do IGF1 comprovaram sua atuação no desenvolvimento pré-antral, uma vez que houve grande comprometimento na foliculogênese destes quando comparados com animais normais. Além disso, Gutierrez e colaboradores (2000) demonstraram que a adição de IGF1 ao cultivo de folículos pré-antrais estimulou o crescimento folicular em bovinos, sendo encontrados dados similares em humanos (LOUHIO et al., 2000) e ratos (ZHAO et al., 2001).

Durante a fase de desenvolvimento antral dos folículos, estes dependem da ação das gonadotrofinas para que ocorra a indução do recrutamento e crescimento folicular (FORTUNE et al., 2001). Além das gonadotrofinas, outros peptídeos que são sintetizados localmente auxiliam o desenvolvimento da fase antral (WEBB et al., 2003).

Cada onda folicular se desenvolve a partir da elevação de concentrações plasmáticas de FSH, que age recrutando folículos (ADAMS et al., 1992). Destes recrutados, apenas um adquire a capacidade ovulatória, recebendo o nome de folículo dominante, este ocasionará a atresia dos folículos subordinados à medida que secreta estradiol e inibina (GINTHER et al., 2003). A dominância do folículo está diretamente relacionada a expressão de receptores de LH nas células da granulosa (BAO e GARVERICK, 1998).

O sistema IGF também parece desempenhar papel crítico na seleção do folículo dominante. Os IGFs são sinérgicos ao FSH na promoção de crescimento folicular e produção de estradiol (FORTUNE; RIVERA; YANG, 2004). Apesar da expressão gênica do IGF1 e IGF2 ter sido localizada em células da granulosa e da teca, respectivamente, o IGF2 tem sido apontado como o principal IGF intraovariano, enquanto que o IGF1 atuaria de forma endócrina (YUAN et al., 1998; ARMSTRONG et al., 2000). O IGF1 e o IGF2 ativam os receptores de IGF tipo 1 e 2, ambos presentes em células da granulosa e da teca (SPICER, 2004). Embora a concentração de IGF total não tenha se mostrado diferente no fluido folicular

de folículos dominantes em relação a folículos subordinados, a concentração de IGF1 livre foi maior no fluido folicular do maior folículo comparado ao segundo maior da mesma onda, antes mesmo da observação de diferenças na concentração de estradiol ou no diâmetro (BEG et al., 2002). Logo, nota-se a existência de um sistema regulador da disponibilidade do IGF no interior dos folículos. Tal regulação ocorre por meio das IGFBPs, uma vez que seus níveis se alteram com o decorrer da foliculogênese, modulando a ação dos IGFs e, conseqüentemente, as ações das gonadotrofinas (MONGET; MONNIAUX; DURAND, 1989). Quatro dentre os seis tipos de IGFBPs (IGFBP-2, -3, -4 e -5) foram identificadas no fluido folicular de bovinos. (BAXTER, 2000; MIHM et al., 2000; BACHELOT et al., 2002). Além disso, foi detectada a expressão do RNAm codificante para a PAPP-A em células da granulosa e células da teca, assim como a presença da proteína no fluido folicular de bovinos (MAZERBOURG et al., 2001; RIVERA e FORTUNE, 2001).

Tem sido demonstrado que a biodisponibilidade de IGF1 livre está diretamente relacionada com a dominância folicular (RIVERA e FORTUNE, 2001). A proteína PAPP-A, como já mencionado, é capaz de degradar as IGFBP-2, -4 -5, permitindo um aumento na concentração intrafolicular de IGF1. Portanto, as altas concentrações de IGF1 livre no maior folículo próximo do início do desvio folicular são associadas à alta degradação proteolítica das IGFBP-2 e -5 pelas proteases PAPP-A. Neste momento, as concentrações de IGFBP-2, -4, e -5 são maiores no segundo maior folículo (BEG et al., 2001; RIVERA e FORTUNE, 2003). A concentração de IGF1 aumentada auxilia no crescimento folicular, amplia os efeitos do FSH e a síntese de estradiol (FORTUNE; RIVERA; YANG, 2004). Austin e colaboradores (2001) propuseram que a primeira mudança intrafolicular que distingue o folículo destinado a se tornar dominante dos outros folículos em crescimento deva ser a manutenção de baixos níveis de IGFBPs e o aumento na capacidade de produzir estradiol.

In vitro o IGF1 (10 ng/mL) promoveu o crescimento de pequenos folículos antrais e aumentou a viabilidade dos oócitos (WALTERS et al., 2006), além de ter estimulado a proliferação e a sobrevivência das células da granulosa, prevenindo a apoptose em bovinos (QUIRK et al., 2004). Outros estudos *in vitro* reportam que o IGF1 aumenta o número de sítios de ligação ao LH e aumenta a produção de androstenediona e progesterona pelas células da teca, a partir da estimulação pelo LH (SPICER e STEWART, 1996). Esses resultados levaram os autores a inferirem que o IGF1 tem papel no aumento da responsividade das células foliculares ao LH que, por sua vez, aumenta a produção folicular de estradiol, hormônio necessário ao processo de ovulação.

2.6.2 Participação dos IGFs na maturação oocitária e desenvolvimento embrionário

Durante a transição de folículos pré-antrais para o estágio antral, as células da granulosa são diferenciadas em duas populações anatômica e funcionalmente distintas: as células do cumulus, que estão diretamente associadas ao oócito, e as células da granulosa murais, que revestem internamente a parede folicular. As células do cumulus possuem projeções citoplasmáticas altamente especializadas que penetram a zona pelúcida, dando origem às junções comunicantes (“gap junctions”). As junções comunicantes mantém íntimo contato com o oócito, formando uma estrutura elaborada denominada complexo cumulus-oócito (ALBERTINI et al., 2001). As células do cumulus são especializadas em oferecer suporte nutricional para o oócito, controlando seu crescimento e metabolismo (HAGHIGHAT e VAN WINKLE, 1990). Sabe-se que mudanças na dinâmica da comunicação entre o cumulus e o oócito e na extensão da transferência de moléculas, podem impactar a aquisição da competência do desenvolvimento do oócito (ALBERTINI et al., 2001).

Durante o crescimento do folículo antral, o oócito adquire de forma gradual e sequencial sua competência meiótica e de desenvolvimento (GILCHRIST; LANE; THOMPSON, 2008). É nesta fase da oogênese que o oócito adquire o maquinário molecular e celular necessários para suportar o desenvolvimento embrionário, sendo este processo denominado de competência oocitária (DONNINSON e PFEFFER, 2004; SIRARD et al., 2006).

Os fatores de crescimento solúveis secretados pelo oócito atuam na vizinhança dos folículos regulando várias funções das células da granulosa e das células do cumulus. Desta forma, há um eixo de comunicação entre o oócito e suas células somáticas, com moléculas específicas sendo secretadas pelo oócito e pelas células do cumulus, que formam a base deste eixo de comunicação (GILCHRIST; LANE; THOMPSON, 2008).

Um dos fatores de crescimento que participam deste eixo de comunicação entre o oócito e suas células do cumulus são os IGFs. É conhecido que grandes quantidades de IGF são produzidas pelas células do cumulus e pelos oócitos, e a hipótese de envolvimento deste fator no desenvolvimento oocitário e folicular é sustentada pela presença de seus receptores em ambos os tipos celulares (ZHOU; BIEVRE; BONDY, 2000). Na espécie bovina, a expressão gênica do IGF1 e IGF2, bem como de seus receptores (IGFR1 e IGFR2) tem sido demonstrada em COCs (YOSHIDA et al., 1998; NUTTINCK et al., 2004) e embriões (LONERGAN et al., 2000, 2003). Em adição, a expressão das IGFbps e da PAPP-A também foi confirmada em oócitos (NUTTINCK et al., 2004; SATRAPA et al., 2013) e embriões bovinos (WINGER, 1997; SAWAI et al., 2005).

A adição de IGF1 ao meio de maturação *in vitro* aumentou a expansão das células do cumulus, promoveu uma melhora na maturação nuclear e uma redução nos índices de apoptose no oócitos (SAKAGUCHI et al., 2002; WASIELAK e BOGACKI, 2007; revisado por VELAZQUEZ et al., 2009). Estudos complementares também mostraram que a suplementação do meio de cultivo *in vitro* com IGF1 ou IGF2 aumentou o número de mórulas e blastocistos, assim como reduziu a incidência de apoptose embrionária em bovinos (PALMA; MÜLLER; BREM, 1997; BYRNE et al., 2002; MOREIRA et al., 2002; SIRISATHIEN; HERNANDEZ-FONSECA; BRACKET, 2003; BONILLA et al., 2011; revisado por PAULA-LOPES et al., 2013).

Em adição, Lonergan *et al.*, (2000) relataram que a expressão do IGF1 foi maior em embriões clivados até 36 horas após a inseminação, em comparação àqueles com clivagem mais atrasada, sugerindo que a expressão gênica dos membros do sistema IGF pode ser usada como um indicador de qualidade embrionária.

Apesar das evidências acima, pouco se sabe sobre a relação entre a expressão diferencial dos IGFs em COCs que possa estar relacionada a variações na competência oocitária de diferentes raças doadoras. Curiosamente, foi demonstrado por Satrapa e colaboradores (2013) que a expressão do RNAm do IGF1 e IGF2 foi maior em oócitos de vacas Holandesas quando comparada aos de raça Nelore, entretanto, a expressão da PAPP-A foi maior em oócitos de Nelore. Os autores sugerem que estes resultados indicam uma maior biodisponibilidade de IGF livre em oócitos de Nelore, podendo ser este um fator contribuinte para a superior competência dos oócitos de Nelore em relação à raça Holandesa.

A falta de informações sobre o padrão de expressão gênica de membros do sistema IGF em oócitos e células do cumulus da raça Gir e meio sangue Holandês/Gir comparado com oócitos da raça Holandesa, somado à importância que tais raças vêm ganhando na PIVE para a melhoria no rebanho leiteiro no estado de Minas Gerais reforçam a necessidade de maiores estudos envolvendo estes grupamentos genéticos. Considera-se importante a investigação do padrão de expressão destes genes não somente nos oócitos, mas também nas células do cumulus, as quais são capazes de produzir IGF e conhecidamente mantêm um contato direto com os oócito fornecendo nutrientes e dando suporte para o seu desenvolvimento.

3 CAPITULO 1 – EXPRESSÃO GÊNICA DE MEMBROS DO SISTEMA IGF EM COCS PROVENIENTES DE VACAS DE DIFERENTES GENÓTIPOS LEITEIROS

O presente artigo encontra-se de acordo com as normas de submissão exigidas pelo periódico Pesquisa Agropecuária Brasileira, Qualis B2. A ser submetido.

1 **Expressão gênica de membros do sistema IGF em COCs provenientes de vacas de**
2 **diferentes genótipos leiteiros**

3 Asafe Costa Lopes⁽¹⁾, Tatimara Maria Miyauchi⁽¹⁾, Carlos Antônio C Fernandes⁽¹⁾ e Ester
4 Siqueira Caixeta Nogueira⁽¹⁾

5 (1) Universidade José do Rosário Vellano, Departamento de Medicina Veterinária,
6 Laboratório de Reprodução Animal, Rodovia MG 179, Km 0, CEP 37130-000 Alfenas, MG,

7 Brasil. E-mail: asafecosta@gmail.com, tatimara@biotran.com.br, carlos@biotran.com.br,

8 ecaixeta@gmail.com

9 **Resumo**

10 O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão de genes do sistema IGF nos complexos
11 cumulus-oócitos (COCs) oriundos de doadoras das raças Gir, Holandesa e mestiças F1 (1/2
12 Holandesa x 1/2 Gir). Os COCs imaturos foram recuperados por aspiração folicular guiada
13 por ultrassonografia. O RNA total foi extraído de pools de 30 oócitos (n=4/raça) e das células
14 do cumulus (CC) correspondentes (n=4/raça). A expressão dos genes alvo (*IGF1* e *IGF2*),
15 seus receptores (*IGFR1* e *IGFR2*), proteínas de ligação aos IGFs (*IGFBP2* e *IGFBP4*) e
16 proteína de inativação IGFBPase (*PAPP-A*), foi investigada por RT-qPCR. A abundância
17 relativa de RNAm do *IGF2*, *IGFR2* e *IGFBP4* foi maior nas CC de vacas Holandesas quando
18 comparado às vacas Gir e F1 1/2 Holandesa x 1/2 Gir. Nos oócitos houve uma maior
19 expressão do RNAm codificante para *IGFR1* em doadoras Gir em relação às 1/2 Holandesa x
20 1/2 Gir e Holandesas. A expressão do RNAm da *PAPP-A* foi maior nas CC e nos oócitos das
21 doadoras Gir e 1/2 Holandesa x 1/2 Gir em comparação com as Holandesas. Não houve
22 alteração na expressão dos genes *IGF1*, *IGFR1* e *IGFBP2* nas CC, assim como dos genes
23 *IGF1*, *IGF2*, *IGFR2*, *IGFBP2* e *IGFBP4* nos oócitos entre as raças. Em conclusão, a maior

24 expressão de *PAPP-A* nos oócitos e CC de doadoras das raças Gir e 1/2 Holandês x 1/2 Gir
25 associada à baixa expressão de *IGFBP4* nas CC destas raças, sugere uma degradação mais
26 eficiente das IGFBPs e maior biodisponibilidade dos IGFs em COCs das raças Gir e meio
27 sangue (1/2 Holandesa x 1/2 Gir) quando comparado aos da raça Holandesa.

28 Termos para indexação: gado de leite, qualidade oocitária, *Bos taurus taurus*, *Bos indicus*
29 *taurus*, *bos indicus/taurus*

30

31 **Gene expression of members of the IGF system in COCs from dairy cows of different**
32 **genotypes**

33 **Abstract**

34 The aim of this study was to quantify mRNA abundance of IGF system members in
35 cumulus oocytes complex (COCs) from Gir, Holstein and cross breed F1 (1/2 Holstein x 1/2
36 Gir) donors cows. Immature COCs were obtained by ovum pick-up. Total RNA was extracted
37 from pools of 30 oocytes (n=4/breed) and their respective cumulus cells (CC; n=4/breed). The
38 investigation of target genes (*IGF1* and *IGF2*), their receptors (*IGFR1* and *IGFR2*), as well as
39 IGF binding proteins (*IGFBP2*, *IGFBP4*), and pregnancy-associated plasma protein-A
40 (*PAPPA*) was assessed by RT-qPCR. The relative mRNA abundance of *IGF2*, *IGFR2* and
41 *IGFBP4* was higher in the CC of Holstein donor compared to Gir and 1/2 Holstein x 1/2 Gir
42 cows. In oocytes, mRNA encoding *IGFR1* was higher in Gir donors compared to Holstein and
43 F1 (1/2 Holstein x 1/2 Gir) animals. The mRNA abundance of *PAPPA* was higher in CC and
44 oocytes in Gir and 1/2 Holstein x 1/2 Gir cows compared to the Holstein donors. No
45 differences on mRNA abundance of *IGF1*, *IGFR1* and *IGFBP2* in CC and *IGF1*, *IGF2*,
46 *IGFR2*, *IGFBP2* and *IGFBP4* in oocytes. In conclusion, the higher *PAPPA* mRNA abundance
47 in oocyte and CC from Gir and 1/2 Holstein x 1/2 Gir donors associated with low expression
48 of *IGFBP4* in CC of these breeds, suggest more efficient degradation of IGFbps which
49 results in greater bioavailability of IGF in Gir and crossbred (1/2 Holstein x 1/2 Gir) COCs
50 when compared to the Holstein breed COCs.

51 Index terms: dairy cattle; oocyte quality; *Bos taurus taurus*, *Bos indicus taurus*, *bos*
52 *indicus/taurus*

53

Introdução

54

55

56 A pecuária de leite exerce importância fundamental na economia do Brasil. Ainda que
57 parte do rebanho brasileiro seja constituída de animais de raças taurinas, como a Holandesa, a
58 maior parte da produção leiteira é proveniente de vacas zebuínas ou de seus cruzamentos.
59 Neste contexto, ocupam posição de destaque os mestiços F1 (1/2 Holandês x 1/2 Gir), cujos
60 efeitos favoráveis de heterose e complementariedade das raças garantem aptidão leiteira e
61 maior adaptabilidade (Madalena et al., 2012). No entanto, um dos principais desafios para
62 grande parte dos produtores de leite com gado mestiço é a dificuldade em manter os rebanhos
63 no grau de sangue desejado (Goulart et al., 2009). Neste sentido, a utilização de biotécnicas
64 como a produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma alternativa para a formação e
65 manutenção de rebanhos que visam a utilização de fêmeas F1 ou F2 (3/4) para a produção de
66 leite.

67 Nos últimos anos tem-se observado um crescimento progressivo do emprego da PIVE
68 em raças leiteiras, incluindo Holandesa, Gir e 1/2 Holandês x 1/2 Gir (Viana et al., 2010a,
69 2012). No período de 2005 a 2010 o uso da PIVE no gado leiteiro aumentou 764% (Viana et
70 al., 2012). Este crescimento pode ser atribuído, em grande parte, à disponibilidade de sêmen
71 sexado (Siqueira et al., 2012) e à demanda de animais de produção, como no caso dos
72 rebanhos F1 e F2 (Holandês/Gir), criando um novo mercado potencial para as tecnologias de
73 embriões (Viana et al., 2010a; Siqueira et al., 2012).

74 É conhecido que as diferenças no número de folículos para a aspiração e no potencial de
75 desenvolvimento dos oócitos entre fêmeas de raças europeias (*Bos taurus taurus*) e zebuínas
76 (*Bos indicus taurus*) afetam consideravelmente a eficiência e a viabilidade econômica da
77 PIVE (Lopes et al., 2006; Camargo et al., 2007; Siqueira et al., 2012). Tem sido observado
78 um maior número de oócitos recuperados por aspiração e uma maior taxa de clivagem e

79 produção de blastocistos, baseado no número de oócitos recuperados, nas doadoras Gir
80 quando comparado com as doadoras Holandesas (Camargo et al., 2007; Pontes et al., 2010).
81 Curiosamente, o desempenho de fêmeas F1 (1/2 Holandês x 1/2 Gir) como doadoras de
82 oócitos foi próximo ou até mesmo mais eficaz que o desempenho das doadoras Gir,
83 considerando tanto o número de oócitos recuperados como o de embriões produzidos (Pontes
84 et al., 2010).

85 Dentre alguns fatores apontados como reguladores do desenvolvimento folicular e
86 oocitário, destacam-se os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs), cuja
87 participação tem sido relatada nos diferentes estágios do desenvolvimento folicular, na
88 maturação oocitária e no subsequente desenvolvimento embrionário (Palma et al., 1997;
89 Herrler et al., 1998; Sakaguchi et al., 2002; Demeestere, 2004; Walters et al., 2006).

90 Grandes quantidades de IGF são produzidas pelas células do cumulus e pelos oócitos, e
91 a hipótese de envolvimento deste fator no desenvolvimento oocitário e folicular é sustentada
92 pela presença de seus receptores em ambos os tipos celulares (Zhou et al., 2000). Na espécie
93 bovina, a expressão gênica do *IGF1* e *IGF2*, bem como de seus receptores (*IGFR1* e *IGFR2*)
94 tem sido demonstrada em complexos cumulus-oócitos (COCs) (Yoshida et al., 1998; Nuttinck
95 et al., 2004) e embriões (Lonergan et al., 2000; 2003). O transporte e função dos IGFs são
96 modulados pela interação com pelo menos seis proteínas de ligação ao IGF (IGFBPs 1 a 6)
97 cuja expressão também foi confirmada em oócitos (Yoshida et al., 1998; Lonergan et al., 2000,
98 2003) e embriões bovinos (Winger et al., 1997; Sawai et al., 2005). A degradação das IGFBP-
99 2, -4 e -5 ocorre pela ação proteolítica de uma enzima de inativação IGFBPase (também
100 conhecida como “Proteína Plasmática Associada a Gravidez”; PAPP-A), sendo que o
101 aumento na expressão das IGFBPs está relacionado com uma menor biodisponibilidade de
102 IGF livre (Monget et al., 2003; Fortune et al., 2004).

103 Dentre seus efeitos benéficos, os IGFs têm demonstrado uma ação sinérgica com o
104 hormônio folículo estimulante (FSH) na promoção do crescimento folicular e produção de
105 estradiol (Fortune et al., 2004). Estudos mostram ainda que a adição de IGF1 durante a
106 maturação *in-vitro* (MIV) em bovinos proporciona um aumento na expansão das células do
107 cumulus, uma melhora na maturação nuclear e uma redução nos índices de apoptose no oócito
108 (Sakaguchi et al., 2002; Wasielak & Bogacki, 2007; revisado por Velazquez et al., 2009).
109 Adicionalmente, a suplementação do meio de cultivo *in vitro* com IGF1 ou IGF2 aumentou o
110 número de mórulas e blastocistos, assim como reduziu a incidência de apoptose embrionária
111 em bovinos (Palma et al., 1997; Byrne et al., 2002; Moreira et al., 2002; Sirisathien et al.,
112 2003; Sirisathien & Brackett, 2003; Bonilla et al., 2011; revisado por Paula-Lopes et al.,
113 2013).

114 Embora alguns mecanismos relacionados a diferenças no desempenho reprodutivo de
115 doadoras de diferentes grupamentos genéticos já tenham sido investigados, outros aspectos
116 continuam sendo foco de estudos. Dada a notável importância do sistema de IGF no
117 desenvolvimento oocitário e as diferenças quanto ao desempenho reprodutivo entre as raças, o
118 objetivo deste estudo foi verificar a expressão do RNAm de membros do sistema de IGF
119 (*IGF1*, *IGF2*, *IGFR1*, *IGFR2*, *IGFBP2* e *IGFBP4*) e *PAPP-A* em oócitos e células do
120 cumulus provenientes de OPU em vacas das raças Gir (*Bos indicus taurus*), Holandesa (*Bos*
121 *taurus taurus*) e 1/2 Holandesa X 1/2 Gir (*indicus-taurus*).

122 **Material e métodos**

123

124 **Delineamento experimental**

125

126 A expressão gênica dos membros do sistema IGF foi avaliada em oócitos e células do
127 cumulus das diferentes raças de doadoras leiteiras a partir de COCs imaturos recuperados por
128 aspiração folicular guiada por ultrassonografia. Os COCs imaturos recuperados tiveram as
129 células do cumulus separadas dos oócitos para as análises de expressão gênica. Foram
130 armazenados 4 *pools* de 30 oócitos e suas células do cumulus correspondentes para cada
131 grupo experimental: Grupo Holandês (HOL), Grupo Gir (GIR), Grupo Holandês/Gir (GH).

132 As aspirações foliculares foram realizadas em fazendas na região sul do estado de
133 Minas Gerais, Brasil. As doadoras não foram submetidas a nenhum tipo de estímulo hormonal
134 antes das aspirações foliculares. Foram utilizadas vacas não-lactantes, pluríparas das raças Gir
135 (n=12), Holandesa (n=16) e mestiças F1 (1/2 Holandesa x 1/2 Gir; n=11) com escore de
136 condição corporal variando de 3,5 - 4,5 (escala de 1 a 5; Edmonson et al., 1989). Todas as
137 vacas estavam ciclando regularmente e livres de anormalidades clínicas e reprodutivas.
138 Durante o período experimental as vacas foram mantidas em pastagem (*Brachiaria spp.*),
139 suplementadas com silagem de milho e concentrado proteico com acesso *ad libitum* à água e
140 sal mineral.

141

142 **Aspiração folicular e recuperação dos complexos cumulus-oócitos (COCs)**

143

144 O procedimento de aspiração folicular (“ovum pick up” – OPU) foi conduzido como
145 descrito previamente por Bols et al. (1997). Resumidamente, após anestesia epidural caudal (5
146 ml de lidocaína 1%; Hertape, Juatuba, MG, Brasil) a aspiração folicular foi realizada

147 utilizando-se aparelho de ultrassonografia e guia de biópsia com transdutor setorial
148 intravaginal de 7,5 Mhz (Mindray DP2200, Mindray Medical International Ltd, Shenzhen,
149 China). Folículos com diâmetro superior a 3mm foram identificados e puncionados
150 utilizando-se agulhas 20G e pressão de vácuo de 80 mmHg, o que corresponde a um fluxo de
151 11 mL/min de água. O fluido folicular foi recuperado em tubos plásticos de 50 mL contendo
152 15 mL de meio Dullbeco PBS modificado (DPBS; Nutricell, Campinas, SP, Brasil),
153 suplementado com 125 UI/mL de heparina (Liquemine; Roche Lab., São Paulo, SP, Brasil),
154 aquecido a 37°C. Após a punção os CCO's foram separados em filtro de coleta de embriões
155 com malha de 80 μ (Milipore, São Paulo, SP, Brasil) e morfologicamente classificados em
156 quatro categorias, de acordo com Viana et al. (2010b).

- 157 • Grau 1: COC compacto, com mais de três camadas de células do cumulus e um oócito
158 com citoplasma homogêneo.
- 159 • Viáveis: COC com no mínimo uma camada de células do cumulus e um oócito com
160 citoplasma homogêneo ou ligeiramente heterogêneo, adequado para a produção *in*
161 *vitro* de embriões.
- 162 • Degenerado: Oócitos desnudos ou parcialmente desnudos e/ou vacuolização do
163 citoplasma e conseqüentemente, não adequado para a produção *in vitro* de embriões.
- 164 • Expandido: COC com expansão das células do cumulus.

165

166 Somente os COCs classificados como Grau1 e Viáveis foram utilizados neste estudo.

167 Os oócitos e as células do cumulus foram armazenados logo após o processo de aspiração
168 para posterior análise de expressão gênica.

169

170 **Análise de expressão gênica**

171

172 Após a recuperação e classificação, os oócitos e as células do cumulus provenientes de
173 grupos de 30 COCs imaturos (n=4/raça) foram mecanicamente separados por sucessivas
174 pipetagens em PBS. Os oócitos desnudos foram recuperados e lavados três vezes em tampão
175 fosfato-salino (PBS). As células do cumulus foram transferidas para um tubo de 1,5 ml e
176 centrifugadas por 5 minutos à 2000rpm. O sobrenadante foi retirado e ao pellet contendo as
177 células do cumulus foi adicionado 350 µL de tampão de lise do kit de extração de RNA. As
178 amostras foram armazenadas em nitrogênio líquido até posterior análise.

179 O RNA total foi extraído de “pools” de 30 oócitos e de suas células do cumulus
180 correspondentes utilizando o kit RNeasy® Micro (Qiagen, Mississauga, Ontario, CA) de
181 acordo com as instruções do fabricante e eluído em 30 µL de água livre de RNase. A
182 concentração de RNA total das células do cumulus foi mensurada por espectrofotômetro
183 NanoDrop® ND 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA), visto que o número de
184 células do cumulus pode ser variável entre as amostras. Em seguida o RNA total (100 ng para
185 as células do cumulus e todo o RNA dos pools de 30 oócitos) foi incubado com DNase
186 (1U/mg; Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) para eliminação de possível contaminação com
187 DNA genômico e então submetido à reação de transcrição reversa (RT) utilizando Randon
188 primers e High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit® (Applied Biosystems, São Paulo,
189 SP, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante. Os reagentes foram incubados a 25°C
190 por 10 min, 37°C por 120 min e então, 85°C por 5 min para a inativação da enzima.

191 A expressão dos genes alvo (*IGF1*, *IGF2*, *IGFR1*, *IGFR2*, *IGFBP2*, *IGFBP4* e *PAPP-*
192 *A*) nos oócitos e células do cumulus foi investigada por ensaio de PCR em tempo real
193 utilizado o sistema Power Sybr®Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, São Paulo, SP,
194 Brasil) no ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, São Paulo, SP,

195 Brasil). As reações foram realizadas com um volume final de 25 μ L e as condições para a
196 amplificação dos genes foram: 95°C por 10 min (1 ciclo), desnaturação a 95°C por 10 seg,
197 seguido pelo anelamento e extensão por 1 min (40 ciclos). A sequência dos primers, tamanho
198 do fragmento e temperatura de anelamento para cada gene alvo estão apresentados na Tabela
199 1. Os dados de fluorescência foram coletados ao final de cada extensão. As reações foram
200 otimizadas a fim de propiciar máxima eficiência de amplificação para cada gene. Cada
201 amostra foi analisada em duplicata e a eficiência e especificidade dos oligonucleotídeos
202 iniciadores dos genes foram avaliadas pelas curvas de amplificação e dissociação,
203 respectivamente.

204 Os genes *GAPDH*, Ciclofilina (*CYC-A*) e Histona (*H2A*) foram testados através do
205 programa geNorm (Microsoft®; Vandesompele et al., 2002) para seleção do controle
206 endógeno mais estável para cada tipo celular analisado. Os resultados indicaram que a *CYC-A*
207 foi o melhor controle endógeno tanto para os oócitos como para as células do cumulus.

208 Os valores de expressão dos genes alvos foram normalizados pela expressão do gene
209 constitutivo. A expressão relativa de cada gene foi calculada utilizando o método $\Delta\Delta C_t$ com
210 correção da eficiência e utilizando uma amostra controle como calibradora (Pfaffl, 2001). Os
211 valores médios de eficiência para cada gene foram calculados através do perfil de
212 amplificação de cada amostra utilizando-se o programa LinRegPCR (Ramakers et al., 2003).

213

214 **Análise estatística**

215

216 Os efeitos das diferentes raças doadoras sobre a expressão dos genes alvo nos oócitos e
217 células do cumulus foram testados por análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre as
218 médias foram determinadas pelo teste de Tukey-Kramer HSD. Os dados de expressão gênica
219 foram transformados para logaritmo quando não apresentaram distribuição normal. Quando

220 os valores, mesmo que transformados em log, não tiveram distribuição normal foi utilizado
221 teste não paramétrico (Kruskall-Wallis). Todas as análises estatísticas foram realizadas
222 utilizando-se o programa JMP (SAS Institute, versão 7.0). Os resultados estão apresentados
223 na forma de média \pm erro padrão da média (EPM). Foram consideradas significativas as
224 diferenças com $P < 0,05$.

Resultados e Discussão

225

226

227 O presente estudo comparou a expressão do RNAm de membros do sistema IGF em
228 COCs provenientes de OPU em vacas das raças Gir (*Bos indicus taurus*), Holandesa (*Bos*
229 *taurus taurus*) e meio sangue (1/2 Holandesa x 1/2 Gir, *Bos indicus/taurus*). Nos oócitos
230 imaturos houve uma maior expressão do RNAm codificante para *IGFR1* em doadoras Gir em
231 relação às 1/2 Holandesa x 1/2 Gir e Holandesas, enquanto a expressão do RNAm da enzima
232 *PAPP-A* foi maior nos oócitos das doadoras Gir e 1/2 Holandesa x 1/2 Gir em comparação
233 com as Holandesas (Figura 1). De forma semelhante, Satrapa e colaboradores (2013),
234 comparando a expressão gênica do sistema IGF em oócitos imaturos de vacas *Bos indicus*
235 *taurus* (Nelore) e *Bos taurus taurus* (Holandesa), encontraram maior expressão do RNAm de
236 *PAPP-A* em oócitos de Nelore quando comparado com de animais Holandeses. Uma vez que
237 a *PAPP-A* é responsável pela degradação de IGFbps (Monget et al., 2003), Satrapa e
238 colaboradores (2013) sugerem que estes resultados indicam uma maior biodisponibilidade de
239 IGF livre em oócitos de Nelore, podendo ser este um fator contribuinte para a superior
240 competência dos oócitos desta raça em relação à raça Holandesa. Estes autores ainda
241 demonstraram que a expressão do RNAm do *IGF1*, *IGF2*, seus receptores *IGFR1* e *IGFR2* e
242 das proteínas de ligação *IGFBP2* e *IGFBP4* foi maior em oócitos imaturos de vacas
243 Holandesas quando comparada aos da raça Nelore (Satrapa et al., 2013). Entretanto, no
244 presente trabalho, utilizando oócitos imaturos de vacas *Bos indicus taurus* da raça Gir e *Bos*
245 *indicus/taurus* da raça Girolando, não foi encontrada diferença na expressão do RNAm do
246 *IGF1*, *IGF2*, *IGFR2*, *IGFBP2* e *IGFBP4* em relação às doadoras Holandesas (Figura 1). Esta
247 discrepância pode estar relacionada ao fato de raças diferentes terem sido utilizadas.

248 É importante notar que um papel fundamental no processo de desenvolvimento e
249 qualidade oocitária é desempenhado pelas células somáticas adjacentes, as células do

250 cumulus. Tais células são especializadas em oferecer suporte nutricional para o oócito,
251 controlando seu crescimento e metabolismo (Haghighat & Van Winkle, 1990). Isto é feito
252 através das junções gap, proporcionando um microambiente folicular favorável (Lolicato et
253 al., 2015) sendo que, a perda prematura desta comunicação prejudica a progressão da
254 maturação oocitária e o desenvolvimento embrionário subsequente (Eppig, 2001; Buccione et
255 al., 1990; Wigglesworth et al., 2013). Sendo assim, este trabalho investigou o padrão de
256 expressão do RNAm de membros do sistema IGF não somente nos oócitos, mas também nas
257 células do cumulus, as quais são capazes de produzir IGF e expressar seus receptores. Vale
258 mencionar que não foram encontrados relatos anteriores que descrevam o padrão de expressão
259 do sistema IGF nas células do cumulus de animais *Bos indicus taurus* versus *Bos taurus*
260 *taurus*.

261 A abundância relativa de RNAm do *IGF2*, *IGFR2* e *IGFBP4* foi maior nas células do
262 cumulus de vacas Holandesas quando comparado às vacas Gir e 1/2 Holandesa x 1/2 Gir
263 (Figura 2). No entanto, a expressão do RNAm da enzima *PAPP-A* foi maior nas células do
264 cumulus das doadoras Gir e 1/2 Holandesa x 1/2 Gir em comparação com as Holandesas
265 (Figura 2). Estes resultados foram semelhantes aos encontrados nos oócitos imaturos por
266 Satrapa e colaboradores (2013) quando avaliaram a expressão de genes do sistema IGF em
267 vacas Holandesas e Nelores. Não houve alteração na expressão dos genes *IGF1*, *IGFR1* e
268 *IGFBP2* nas células do cumulus entre as raças estudadas (Figura 2).

269 Embora a expressão do RNAm dos *IGF2* e *IGFR2* tenha sido maior nas células do
270 cumulus dos animais da raça Holandesa, tais animais tiveram menor expressão de *PAPP-A* e
271 maior expressão de *IGFBP4*. É possível que uma menor biodisponibilidade de IGFs nos
272 COCs, decorrente da menor degradação de IGFBPs pela *PAPP-A*, possa ser um dos fatores
273 que acarretam a menor qualidade dos oócitos e desenvolvimento embrionário normalmente
274 encontrados em animais Holandeses quando comparado com Gir e Girolando (Camargo et al.,

275 2007; Pontes et al., 2010). De fato, em mulheres, altas concentrações de IGF1 e 4
276 associadas com baixos níveis de IGF1 no fluido folicular foram correlacionados com baixo
277 desenvolvimento embrionário *in vitro* (Wang et al., 2006).

278 Vários autores demonstraram que o sistema de IGF desempenha um papel importante
279 na maturação dos oócitos (Lorenzo et al., 1994; Sirotkin et al., 2000; Walters et al., 2006). Os
280 componentes do sistema do IGF expressos em oócitos aceleram a maturação nuclear do
281 oócito e permitem uma maior competência oocitária para o desenvolvimento embrionário
282 (Lorenzo et al., 1994; Sirotkin et al., 2000; Sakaguchi et al., 2002; Walters et al., 2006).

283 Está bem estabelecido que a via de sinalização fosfatidilinositol-3-quinase/serina-
284 treonina quinase (PI3K/Akt) é ativada para mediar as ações do IGF1 e IGF2 em diferentes
285 tipos de células (Adams et al., 2004; Laviola et al., 2007; Mu et al., 2015). A Akt é uma
286 proteína cinase específica de serina/treonina que regula uma ampla variedade de substratos
287 para alterar a transcrição gênica, inibir a atividade de proteínas pró-apoptóticas e modular a
288 utilização do estoque de energia celular (Manning & Cantley, 2007). De fato, a adição de
289 IGF1 durante a maturação *in vitro* (MIV) em bovinos reduz os índices de apoptose no oócito
290 (Wasielak & Bogacki, 2007; revisado por Velazquez et al., 2009) e quando a suplementação
291 foi realizada no meio de cultivo *in vitro* houve redução da incidência de apoptose embrionária
292 (Sirisathien & Brackett, 2003; Bonilla et al., 2011; revisado por Paula-Lopes et al., 2013).

293 Em estudo realizado por Xie et al. (2016), a adição de IGF1 no cultivo de células
294 foliculares ou de folículos ovarianos estimulou a expressão do RNAm e da proteína do
295 receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) nas células foliculares de zebrafish. O
296 EGFR é um receptor dos fatores de crescimento epidermal (EGF) -like que, quando ativado,
297 desencadeia um aumento na atividade de proteíno-quinases ativadas por mitógenos (MAPK),
298 conhecidamente necessárias para a retomada da meiose e maturação dos oócitos (Hsieh et al.,
299 2007; Panigone et al., 2008, Park et al., 2004; Su et al., 2010). Sendo assim, Xie e

300 colaboradores (2016) sugerem que os efeitos benéficos do IGF1 na maturação oocitária se
301 devam, pelo menos em parte, via *EGF-like/EGFR/Mapk*. Apesar dos fatores *EGF-like* serem
302 expressos em folículos ovarianos bovinos e, conhecidamente desempenharem um papel como
303 mediadores das ações do LH na retomada da meiose, maturação oocitária e ovulação folicular
304 (revisado por Richards et al., 2002), os efeitos do IGF nesta via de sinalização ainda
305 necessitam ser avaliados em modelos mamíferos, incluindo os bovinos.

306 Estudos comprovam ainda a importância do sistema IGF na foliculogênese, incluindo o
307 crescimento e desvio folicular (Louhio et al., 2000; Zhao et al., 2001; Itoh et al., 2002;
308 Fortune et al., 2004). Os IGFs são sinérgicos com o FSH para promover o crescimento e
309 produção de estradiol folicular (Fortune et al., 2004). O folículo dominante, no momento do
310 desvio, produz altas concentrações de estradiol e tem maior síntese de PAPP-A e,
311 subsequentemente, menor concentração de IGFBP4 e 5 (Mazerbourg et al., 2001; Rivera et
312 al., 2001; Rivera & Fortune, 2001; Fortune et al., 2004). A baixa concentração de IGFBP4 e 5
313 permite maior quantidade de IGF1 livre, o qual auxilia no crescimento folicular, amplia os
314 efeitos do FSH e a síntese de estradiol (Fortune et al., 2004). Estudos com folículos bovinos
315 demonstraram que existe uma forte relação entre as concentrações de IGF1 e de estradiol
316 presente no fluido folicular e a capacidade destes folículos em alcançar a fase de pré-
317 ovulatória (Mihm et al., 2000; Rivera et al., 2001; Rivera & Fortune, 2001; Beg et al., 2002).

Conclusão

318

319

320 Em conclusão, foi identificado neste trabalho uma maior expressão de *PAPP-A* nos
321 oócitos e células do cumulus de COCs provenientes de doadoras das raças Gir e 1/2 Holandês
322 x 1/2 Gir, além de uma menor expressão de *IGFBP4* nas células do cumulus destas raças,
323 sugerindo uma degradação mais eficiente das IGFBPs. Os dados de expressão gênica
324 encontrados no presente estudo sugerem que há condições favoráveis para uma maior
325 biodisponibilidade de IGFs em COCs das raças Gir (*Bos indicus taurus*) e 1/2 Holandês x 1/2
326 Gir (*Bos indicus/taurus*), fato que estaria contribuindo para a melhor qualidade oocitária
327 destes animais, quando comparado com o gado leiteiro Holandês (*Bos taurus taurus*).

328

Agradecimentos

329 À Fapemig pelo financiamento da pesquisa, à Biotran e à Fazenda Rancho Grande pelo

330 fornecimento dos animais necessários para a realização deste trabalho.

Referências

- 331
332 ADAMS, T. E.; MCKERN, N. M.; WARD, C. W. Signalling by the type 1 insulin-like
333 growth factor receptor: interplay with the epidermal growth factor receptor. **Growth Factors**,
334 v. 22, p. 89-95, 2004.
- 335 ALVARES, C. A.; STAPE, J. L.; SENTELHAS, P. C.; DE MORAES, G.; LEONARDO, J.;
336 SPAROVEK, G. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische**
337 **Zeitschrift**, v.22, n.6, p. 711-728,2013.
- 338 BEG, M. A.; BERGFELT, D. R.; KOT, K.; GINTHER, O. J. Follicle selection in cattle:
339 dynamics of follicular fluid factors during development of follicle dominance. **Biology of**
340 **Reproduction**, v. 66, p. 120–126, 2002.
- 341 BOLS, P. E. J.; YSEBAERT, M. T.; VAN SOOM, A.; DE KRUIF, A. Effects of needle tip
342 bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity of bovine
343 compact cumulus oocyte complexes. **Theriogenology**, v. 47, p. 1221–1236, 1997.
- 344 BONILLA, A. Q. S.; OLIVEIRA, L. J.; OZAWA, M.; NEWSOM, E. M.; LUCY, M. C.;
345 HANSEN, P. J. Developmental changes in thermoprotective actions of insulin-like growth
346 factor-1 on the preimplantation bovine embryo. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.
347 332, p. 170–179, 2011.
- 348 BUCCIONE, R.; SCHROEDER, A. C.; EPPIG, J. J. Interactions between somatic cells and
349 germ cells throughout mammalian oogenesis. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 543–547,
350 1990.
- 351 BYRNE, A. T.; SOUTHGATE, J.; BRISON, D. R.; LEESE, H. J. Regulation of apoptosis in
352 the bovine blastocyst by insulin and the insulin-like growth factor (IGF) superfamily.
353 **Molecular Reproduction and Development**, v. 62, p. 489–495, 2002.

- 354 CAMARGO, L. S. A.; VIANA, J. H. M.; RAMOS, A. A.; SERAPIÃO, R. V.; DE SA, W. F.;
355 FERREIRA, A. M.; GUIMARÃES, M. F. M.; DO VALE FILHO, V. R. Developmental
356 competence and expression of the Hsp 70.1 gene in oocytes obtained from *Bos indicus* and
357 *Bos taurus* dairy cows in a tropical environment. **Theriogenology**, v. 68, p. 626–632, 2007.
- 358 DEMEESTERE, I. Effect of Insulin-Like Growth Factor-I During Preantral Follicular Culture
359 on Steroidogenesis, In Vitro Oocyte Maturation, and Embryo Development in Mice. **Biology**
360 **of Reproduction**, v. 70, p. 1664–1669, 2004.
- 361 EDMONSON, A. J.; LEAN, I. J.; WEAVER, L. D.; FARVER, T.; WEBSTER, G. A Body
362 Condition Scoring Chart for Holstein Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 72, p. 68–78,
363 1989.
- 364 EPPIG, J. J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals.
365 **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 122, p. 829–838, 2001.
- 366 FACÓ, Olivardo; LÔBO, Raimundo Nonato Braga; FILHO, Raimundo Martins; MARTINS,
367 Gabrimar Araújo, OLIVEIRA, Maria Pinheiro de; AZEVÊDO, Danielle Maria Machado
368 Ribeiro. Efeitos genéticos aditivos e não-aditivos para características produtivas e
369 reprodutivas em vacas mestiças Holandês x Gir. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p.
370 48-53, 2008.
- 371 FORTUNE, J.; RIVERA, G.; YANG, M. Follicular development: the role of the follicular
372 microenvironment in selection of the dominant follicle. **Animal Reproduction Science**, v.
373 82-83, p. 109–126, 2004.
- 374 GLISTER, C.; TANNETTA, D. S.; GROOME, N. P.; KNIGHT, P. G. Interactions between
375 follicle-stimulating hormone and growth factors in modulating secretion of steroids and
376 inhibin-related peptides by nonluteinized bovine granulosa cells. **Biology of Reproduction**,

- 377 v. 65, p. 1020–1028, 2001.
- 378 GOULART, I. L.; FERREIRA, A. D. M.; RAMOS, A. D. A.; HENRIQUE, J.; VIANA, M.
379 Embriões F1 (Hol X Gir) produzidos in vitro utilizados a fresco em rebanhos leiteiros
380 comerciais e controlado. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 16, p. 77–82, 2009.
- 381 HAGHIGHAT, N.; VAN WINKLE, L. J. Developmental change in follicular cell-enhanced
382 amino acid uptake into mouse oocytes that depends on intact gap junctions and transport
383 system Gly. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 253, p. 71–82, 1990.
- 384 HERRLER, A.; KRUSCHE, C. A.; BEIER, H. M. Insulin and insulin-like growth factor-I
385 promote rabbit blastocyst development and prevent apoptosis. **Biology of Reproduction**, v.
386 59, p. 1302–1310, 1998.
- 387 HSIEH, M.; LEE, D.; PANIGONE, S.; HORNER, K.; CHEN, R.; THEOLOGIS, A.; LEE, D.
388 C.; THREADGILL, D. W.; CONTI, M. luteinizing hormone-dependent activation of the
389 Epidermal Growth Factor network is essential for ovulation. **Molecular and Cellular**
390 **Biology**, v. 27, p. 1914–1924, 2007.
- 391 ITOH, T.; KACCHI, M.; ABE, H.; SENDAI, Y.; HOSHI, H. Growth, antrum formation, and
392 estradiol production of bovine preantral follicles cultured in a serum-free medium. **Biology of**
393 **Reproduction**, v. 67, p. 1099–1105, 2002.
- 394 KADARMIDEEN, H. N.; MAZZONI, G.; WATANABE, Y. F.; STRØBECH, L.;
395 BARUSELLI, P. S.; MEIRELLES, F. V.; CALESSEN, H.; HYTTTEL, P.; FERRAZ, J. B. S.;
396 NOGUEIRA, M. F. G. Genomic selection of in vitro produced and somatic cell nuclear
397 transfer embryos for rapid genetic improvement in cattle production. **Animal Reproduction**,
398 v. 12, p. 389–396, 2015.

- 399 LAVIOLA, L.; NATALICCHIO, A.; GIORGINO, F. The IGF-I signaling pathway. **Current**
400 **Pharmaceutical Design**, v. 13, p. 663–669, 2007.
- 401 LOLICATO, F.; BROUWERS, J. F.; DE LEST, C. H. A. VAN; WUBBOLTS, R.;
402 AARDEMA, H.; PRIORE, P.; ROELEN, B. A. J.; HELMS, J. B.; GADELLA, B. M. The
403 cumulus cell layer protects the bovine maturing oocyte against fatty acid-induced lipotoxicity.
404 **Biology of Reproduction**, v. 92, p. 16, 2015.
- 405 LONERGAN, P.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; PINTADO, B.; FAIR, T.; WARD, F.; FUENTE,
406 J. D.; BOLAND, M. Relationship between time of first cleavage and the expression of IGF-I
407 growth factor, its receptor, and two housekeeping genes in bovine two-cell embryos and
408 blastocysts produced in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 57, p. 146–
409 152, 2000.
- 410 LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; MOREIRA, P. M.; PINTADO, B.;
411 DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M. P. Temporal divergence in the pattern of messenger RNA
412 expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage in vitro or in vivo.
413 **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 1424–1431, 2003.
- 414 LOPES, A. S.; MARTINUSSEN, T.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Effect of days post-
415 partum, breed and ovum pick-up scheme on bovine oocyte recovery and embryo
416 development. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, p. 196–203, 2006.
- 417 LORENZO, P. L.; ILLERA, M. J.; ILLERA, J. C.; ILLERA, M. Enhancement of cumulus
418 expansion and nuclear maturation during bovine oocyte maturation in vitro by the addition of
419 epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. **Journal of Reproduction and**
420 **Fertility**, v. 101, p. 697–701, 1994.
- 421 LOUHIO, H.; HOVATTA, O.; SJÖBERG, J.; TUURI, T. The effects of insulin, and insulin-

- 422 like growth factors I and II on human ovarian follicles in long-term culture. **Molecular**
423 **Human Reproduction**, v. 6, p. 694–698, 2000.
- 424 MADALENA, F. E.; PEIXOTO, M. G. C. D.; GIBSON J. Dairy cattle genetics and its
425 applications in Brazil. **Livestock Research for Rural Development**, v. 24, p.97, 2012.
- 426 MANNING, B. D.; CANTLEY, L. C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. **Cell**, v.
427 129, p. 1261–1274, 2007.
- 428 MAZERBOURG, S.; OVERGAARD, M. T.; OXVIG, C.; CHRISTIANSEN, M.;
429 CONOVER, C. A.; LAURENDEAU, I.; VIDAUD, M.; TOSSER-KLOPP, G.; ZAPF, J.;
430 MONGET, P. Pregnancy-Associated Plasma Protein-A (PAPP-A) in ovine, bovine, porcine,
431 and equine ovarian follicles: involvement in IGF Binding Protein -4 proteolytic degradation
432 and mRNA expression during follicular development. **Endocrinology**, v. 142, p. 5243–5253,
433 2001.
- 434 MIHM, M.; AUSTIN, E. J.; GOOD, T. E.; IRELAND, J. L.; KNIGHT, P. G.; ROCHE, J. F.;
435 IRELAND, J. J. Identification of potential intrafollicular factors involved in selection of
436 dominant follicles in heifers. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 811–819, 2000.
- 437 MONGET, P.; MAZERBOURG, S.; DELPUECH, T.; MAUREL, M.-C.; MANIÈRE, S.;
438 ZAPF, J.; LALMANACH, G.; OXVIG, C.; OVERGAARD, M. T. Pregnancy-associated
439 plasma protein-A is involved in insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2)
440 proteolytic degradation in bovine and porcine preovulatory follicles: identification of cleavage
441 site and characterization of IGFBP-2 degradation. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 77–86,
442 2003.
- 443 MOREIRA, F.; PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J.; BADINGA, L.; THATCHER, W.
444 W. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on development of in vitro

- 445 derived bovine embryos. **Theriogenology**, v. 57, p. 895–907, 2002.
- 446 MU, Q.; WANG, L.; YU, F.; GAO, H.; LEI, T.; LI, P.; LIU, P.; ZHENG, X.; HU, X.; CHEN,
447 Y.; JIANG, Z.; SAYARI, A. J.; SHEN, J.; HUANG, H. Imp2 regulates GBM progression by
448 activating IGF2/PI3K/Akt pathway. **Cancer Biology & Therapy**, v. 16, p. 623–633, 2015.
- 449 NUTTINCK, F.; CHARPIGNY, G.; MERMILLOD, P.; LOOSFELT, H.; MEDURI, G.;
450 FRERET, S.; GRIMARD, B.; HEYMAN, Y. Expression of components of the insulin-like
451 growth factor system and gonadotropin receptors in bovine cumulus-oocyte complexes during
452 oocyte maturation. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 27, p. 179–195, 2004.
- 453 PALMA, G. A.; MÜLLER, M.; BREM, G. Effect of insulin-like growth factor I (IGF-I) at
454 high concentrations on blastocyst development of bovine embryos produced in vitro. **Journal**
455 **of Reproduction and Fertility**, v. 110, p. 347–353, 1997.
- 456 PANIGONE, S.; HSIEH, M.; FU, M.; PERSANI, L.; CONTI, M. Luteinizing Hormone
457 Signaling in Preovulatory Follicles Involves Early Activation of the Epidermal Growth Factor
458 Receptor Pathway. **Molecular Endocrinology**, v. 22, p. 924–936, 2008.
- 459 PARK, J. Y.; SU, Y. Q.; ARIGA, M.; LAW, E.; JIN, S. L.; CONTI, M. EGF-Like growth
460 factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. **Science**, v. 303, p. 682–684, 2004.
- 461 PAULA-LOPES, F. F.; LIMA, R. S.; SATRAPA, R. A.; BARROS, C. M. Physiology and
462 Endocrinology Symposium: influence of cattle genotype (*Bos indicus* vs. *Bos taurus*) on
463 oocyte and preimplantation embryo resistance to increased temperature. **Journal of Animal**
464 **Science**, v. 91, p. 1143–1153, 2013.
- 465 PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.
466 **Nucleic Acids Research**, v. 29, p. 2002–2007, 2001.

- 467 PONTES, J. H. F.; SILVA, K. C. F.; BASSO, A. C.; RIGO, A. G.; FERREIRA, C. R.;
468 SANTOS, G. M. G.; SANCHES, B. V.; PORCIONATO, J. P. F.; VIEIRA, P. H. S.; FAIFER,
469 F. S.; STERZA, F. A. M.; SCHENK, J. L.; SENEDA, M. M. Large-scale in vitro embryo
470 production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows
471 using sexed sperm. **Theriogenology**, v. 74, p. 1349–1355, 2010.
- 472 RAMAKERS, C.; RUIJTER, J. M.; DEPREZ, R. H. L.; MOORMAN, A. F. M. Assumption-
473 free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience**
474 **Letters**, v. 339, p. 62–66, 2003.
- 475 RICHARDS, J. S.; RUSSELL, D. L.; OCHSNER, S.; ESPEY, L. L. Ovulation: new
476 dimensions and new regulators of the inflammatory-like response. **Annual Review of**
477 **Physiology**, v. 64, p. 69–92, 2002.
- 478 RIVERA, G. M.; CHANDRASEKHER, Y. A.; EVANS, A. C. O.; GIUDICE, L. C.;
479 FORTUNE, J. E. A Potential Role for Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-4
480 Proteolysis in the Establishment of Ovarian Follicular Dominance in Cattle. **Biology of**
481 **Reproduction**, v. 65, p. 102–111, 2001.
- 482 RIVERA, G. M.; FORTUNE, J. E. Development of codominant follicles in cattle is
483 associated with a follicle-stimulating hormone-dependent insulin-like growth factor binding
484 protein-4 protease. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 112–118, 2001.
- 485 SAKAGUCHI, M.; DOMINKO, T.; YAMAUCHI, N.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.;
486 NAGAI, T.; FIRST, N. L. Possible mechanism for acceleration of meiotic progression of
487 bovine follicular oocytes by growth factors in vitro. **Reproduction**, v. 123, p. 135–142, 2002.
- 488 SATRAPA, R. A.; CASTILHO, A. S.; RAZZA, E. M.; PEGORER, M. F.; PUELKER, R.;
489 BARROS, C. M. Differential expression of members of the IGF system in OPU-derived

490 oocytes from Nelore (*Bos indicus*) and Holstein (*Bos taurus*) cows. **Animal Reproduction**
491 **Science**, v. 138, p. 155–158, 2013.

492 SAWAI, K.; KAGEYAMA, S.; MORIYASU, S.; HIRAYAMA, H.; MINAMIHASHI, A.;
493 ONOE, S. Analysis of mRNA transcripts for Insulin-Like Growth Factor Receptors and
494 Binding Proteins in bovine embryos derived from somatic cell nuclear transfer. **Cloning and**
495 **Stem Cells**, v. 7, p. 189–198, 2005.

496 SIQUEIRA, L. G. B.; FONSECA, J. F.; CAMARGO, L. S. A.; VIANA, J. H. M. Factores
497 que afectan a la fecundación in vitro en bovinos. **Spermova**, v. 2, p. 10–12, 2012.

498 SIRISATHIEN, S.; HERNANDEZ-FONSECA, H.; BRACKETT, B. . Influences of
499 epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on bovine blastocyst development in
500 vitro. **Animal Reproduction Science**, v. 77, p. 21–32, 2003.

501 SIRISATHIEN, S.; BRACKETT, B. G. TUNEL analyses of bovine blastocysts after culture
502 with EGF and IGF-I. **Molecular Reproduction and Development**, v. 65, p. 51-56, 2003.

503 SIROTKIN, A. V; DUKESOVÁ, J.; MAKAREVICH, A. V; KUBEK, A.; BULLA, J.
504 Evidence that growth factors IGF-I, IGF-II and EGF can stimulate nuclear maturation of
505 porcine oocytes via intracellular protein kinase A. **Reproduction Nutrition Development**, v.
506 40, p. 559–569, 2000.

507 SU, Y. Q.; SUGIURA, K.; LI, Q.; WIGGLESWORTH, K.; MATZUK, M. M.; EPPIG, J. J.
508 Mouse oocytes enable LH-Induced Maturation of the cumulus-oocyte complex via promoting
509 EGF receptor-dependent signaling. **Molecular Endocrinology**, v. 24, p. 1230–1239, 2010.

510 VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE
511 PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data

- 512 by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, p. 1-11,
513 2002.
- 514 VELAZQUEZ, M. A.; ZARAZA, J.; OROPEZA, A.; WEBB, R.; NIEMANN, H. The role of
515 IGF1 in the in vivo production of bovine embryos from superovulated donors. **Reproduction**
516 (**Cambridge, England**), v. 137, p. 161–180, 2009.
- 517 VIANA, J. H. M.; SIQUEIRA, L. G. B.; PALHÃO, M. P.; CAMARGO, L. S. A. Use of in
518 vitro fertilization Technique in the least decade and its effect on Brazilian embryo industry and
519 animal production. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, p. 661–674, 2010a.
- 520 VIANA, J. H. M.; PALHAO, M. P.; SIQUEIRA, L. G. B.; FONSECA, J. F.; CAMARGO, L.
521 S. A. Ovarian follicular dynamics, follicle deviation, and oocyte yield in Gyr breed (*Bos*
522 *indicus*) cows undergoing repeated ovum pick-up. **Theriogenology**, v. 73, p. 966–972, 2010b.
- 523 VIANA, J. H. M.; SIQUEIRA, L. G. B.; PALHAO, M. P.; CAMARGO, L. S. A. Features
524 and perspectives of the Brazilian in vitro embryo industry. **Animal Reproduction**, v. 9, p. 12-
525 18, 2012.
- 526 WALTERS, K. A.; BINNIE, J. P.; CAMPBELL, B. K.; ARMSTRONG, D. G.; TELFER, E.
527 E. The effects of IGF-I on bovine follicle development and IGFBP-2 expression are dose and
528 stage dependent. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 131, p. 515–523, 2006.
- 529 WANG, T.; CHANG, C.; WU, H.; CHIU, Y.; CHEN, C.; WANG, H. Insulin-like growth
530 factor-II (IGF-II), IGF-binding protein-3 (IGFBP-3), and IGFBP-4 in follicular fluid are
531 associated with oocyte maturation and embryo development. **Fertility and Sterility**, v. 86, p.
532 1392–1401, 2006.
- 533 WASIELAK, M.; BOGACKI, M. Apoptosis inhibition by insulin-like growth factor (IGF)-I

534 during in vitro maturation of bovine oocytes. **The Journal of Reproduction and**
535 **Development**, v. 53, p. 419–426, 2007.

536 WIGGLESWORTH, K.; LEE, K.-B.; O'BRIEN, M. J.; PENG, J.; MATZUK, M. M.; EPPIG,
537 J. J. Bidirectional communication between oocytes and ovarian follicular somatic cells is
538 required for meiotic arrest of mammalian oocytes. **Proceedings of the National Academy of**
539 **Sciences of the United States of America**, v. 110, p. 3723–3729, 2013.

540 WINGER, Q. A. Bovine oviductal and embryonic insulin-like growth factor binding proteins:
541 possible regulators of “embryotrophic” insulin-like growth factor circuits. **Biology of**
542 **Reproduction**, v. 56, p. 1415–1423, 1997.

543 XIE, L.; TANG, Q.; YANG, L.; CHEN, L. Insulin-like growth factor I promotes oocyte
544 maturation through increasing the expression and phosphorylation of epidermal growth factor
545 receptor in the zebrafish ovary. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 419, p. 198–207,
546 2016.

547 YOSHIDA, Y.; MIYAMURA, M.; HAMANO, S.; YOSHIDA, M. Expression of growth
548 factor ligand and their receptor mRNAs in bovine ova during in vitro maturation and after
549 fertilization in vitro. **The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of**
550 **Veterinary Science**, v. 60, p. 549–554, 1998.

551 ZHAO, J.; TAVERNE, M. A.; VAN DER WEIJDEN, G. C.; BEVERS, M. M.; e VAN DEN
552 HURK, R. Effect of activin A on in vitro development of rat preantral follicles and
553 localization of activin A and activin receptor II. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 967–977,
554 2001.

555 ZHOU, J.; BIEVRE, M.; e BONDY, C. A. Reduced GLUT1 expression in Igf1^{-/-} null
556 oocytes and follicles. **Growth Hormone & IGF Research**, v. 10, p. 111–117, 2000.

557 **Tabela 1.** Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores, tamanho do fragmento
 558 amplificado em pares de base (pb) e temperatura de anelamento utilizados para a
 559 amplificação pela PCR em tempo real.

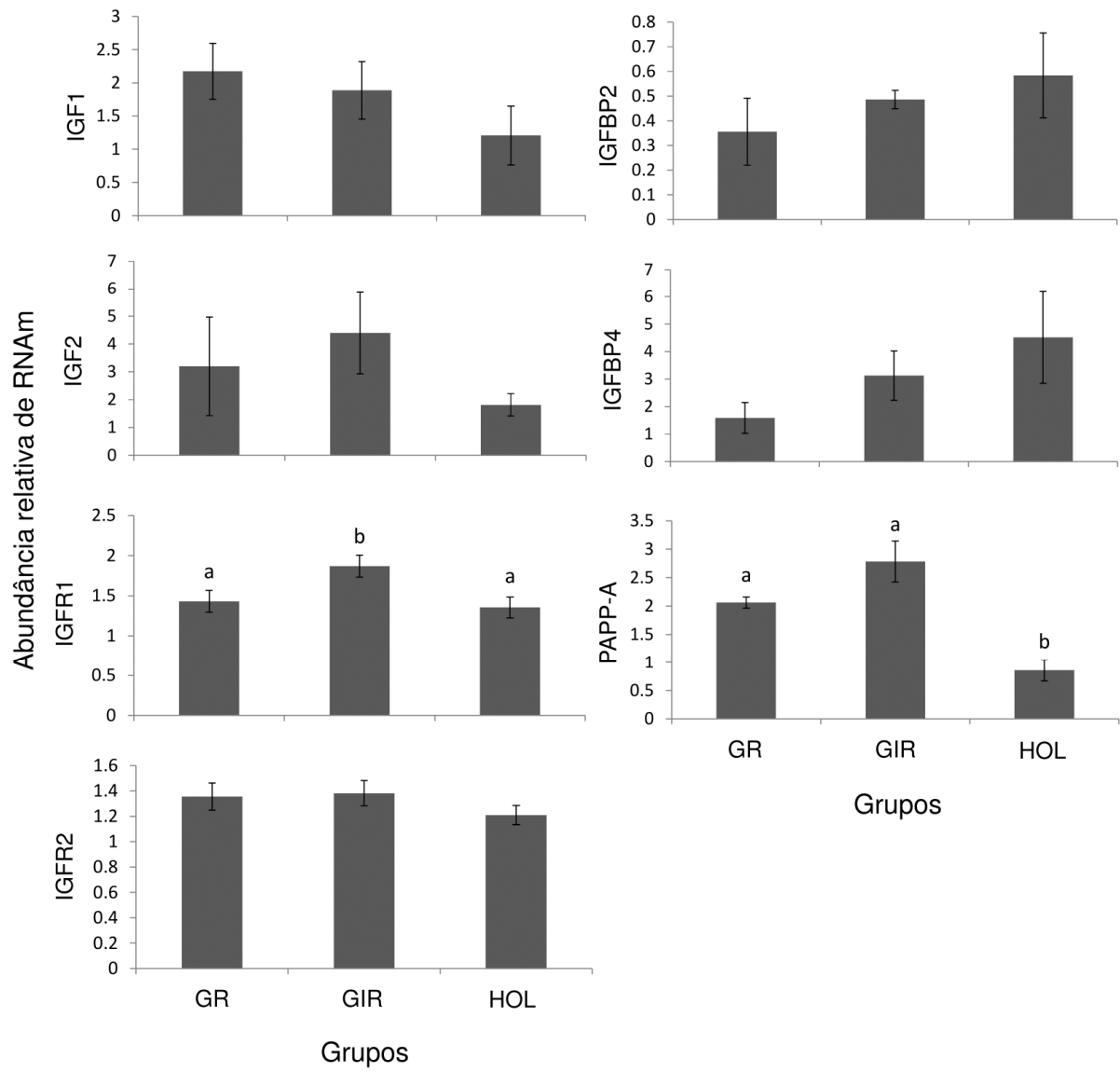
Gene	Sequência	Tamanho do fragmento (pb)	Temperatura de anelamento (°c)	Referência
<i>IGF1</i>	F 5'- ACCCTGGAGTTGGTAGATTGCTGT-3' R 5'- CACCCATGCATTTGTGGCTCTTGA-3'	108	60	AH009378.2
<i>IGF2</i>	F 5'- GACCGCGCTTCTACTTCAG-3' R 5'-AAGAACTTGCCCACGGGGTAT-3'	162	60	NM_174087.3
<i>IGFR1</i>	F 5'-TTGCAAGAACCATGCCTGCAGAAG-3' R 5'-TGGCATTCTCAGGTTCTGGCCATT-3'	110	60	XM_005907389.2
<i>IGFR2</i>	F 5'-TGCGGTGGTGGCCAGAAGATAATA-3' R 5'-TCAAACCTCGTAGAAGCAGCCGTCA-3'	115	62	NM_174352.2
<i>IGFBP2</i>	F 5'-CAGCGGCAGATGGGCAA-3' R 5'-GAAGGCGCATGGTGGAGAT-3'	122	60	NM_174555.1
<i>IGFBP4</i>	F 5'-TGTGTGCGTGTGTGTTAATGAGCC-3' R 5'-TGGGAAACATAACCAGGGCTCTCCT-3'	105	62	NM_174557.4
<i>PAPPA</i>	F 5'- TCCAGATGTTGAGCAGCCCTGTAA-3' R 5'-ACCCAAACGGTCAAAGACTCAGGA-3'	161	56	AF421141.1
<i>CYCA</i>	F 5'- GCCATGGAGCGCTTTGG-3' R 5'-CCACAGTCAGCAATGGTGATCT-3'	65	60	Caixeta et al., 2013

560 F = *forward primer*; R = *reverse primer*; pb = pares de base.

561

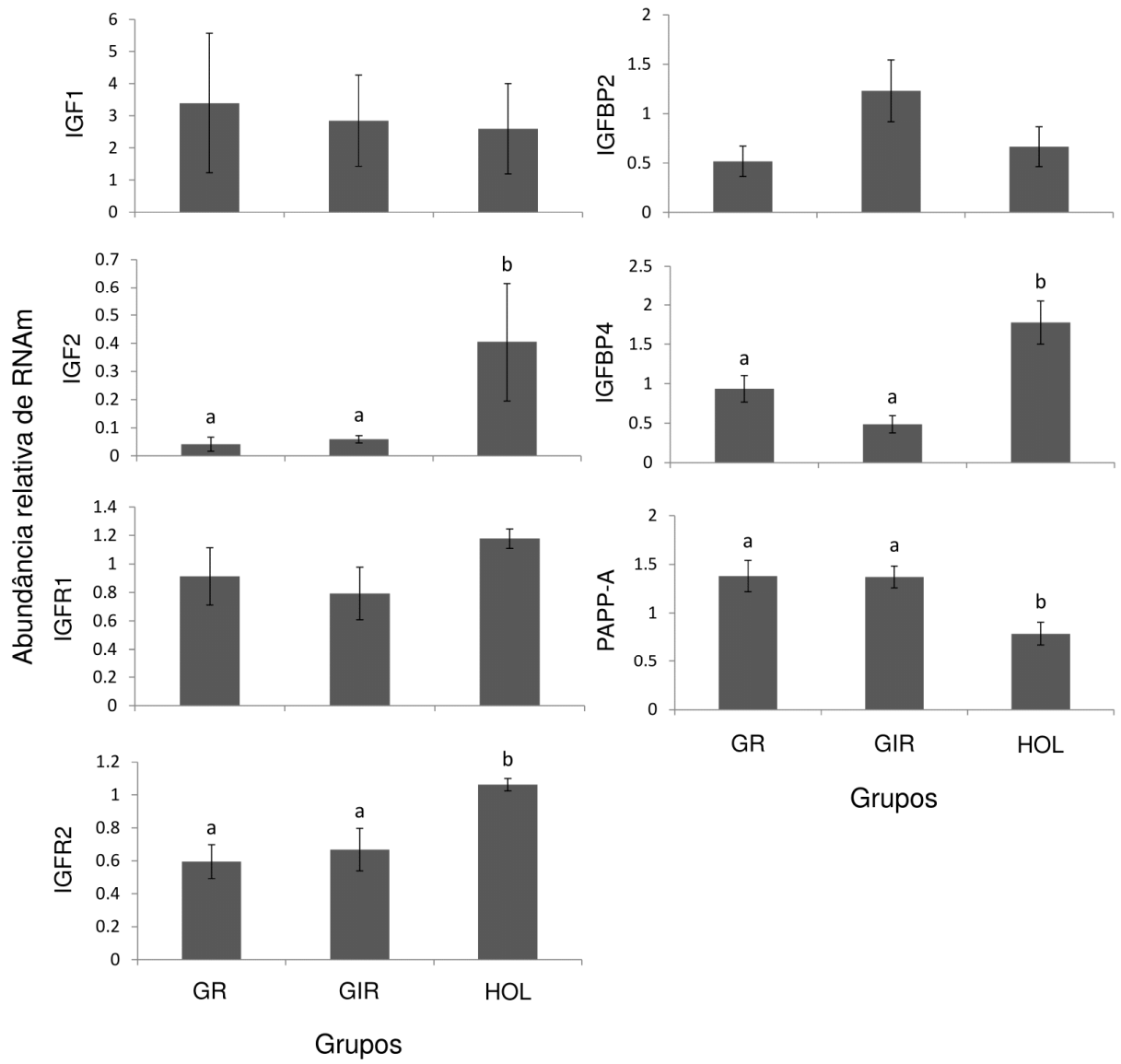
562 **Figura 1.** Efeitos das diferentes raças, 1/2 Holandesa x 1/2 Gir (GR), Gir (GIR) e Holandesa
563 (HOL), na expressão do RNAm de IGF1, IGF2, IGFR1, IGFR2, IGFBP2, IGFBP4 e PAPP-A
564 nos oócitos provenientes de COCs imaturos obtidos por aspiração folicular guiada por
565 ultrassonografia. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média. A
566 quantificação relativa do RNAm foi determinada pelo método de $\Delta\Delta C_t$ e normalizada pelo
567 gene constitutivo Ciclofilina-A (CYC-A). As barras com diferentes letras indicam valores
568 significativamente diferentes ($P < 0,05$). Os dados foram obtidos a partir de quatro réplicas
569 para grupo experimental.
570

Figura 1



572 **Figura 2.** Efeitos das diferentes raças, 1/2 Holandesa x 1/2 Gir (GR), Gir (GIR) e Holandesa
573 (HOL), na expressão do RNAm de IGF1, IGF2, IGFR1, IGFR2, IGFBP2, IGFBP4 e PAPP-A
574 nas células do cumulus provenientes de COCs imaturos obtidos por aspiração folicular guiada
575 por ultrassonografia. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média. A
576 quantificação relativa do RNAm foi determinada pelo método de $\Delta\Delta\text{Ct}$ e normalizada pelo
577 gene constitutivo Ciclofilina-A (CYC-A). As barras com diferentes letras indicam valores
578 significativamente diferentes ($P < 0,05$). Os dados foram obtidos a partir de quatro réplicas
579 para grupo experimental.
580

Figura 2



4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, G. P. *et al.* Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, Madison, v. 94, n. 1, p. 177–188, jan. 1992.
- ALBERTINI, D. F. *et al.* Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. **Reproduction (Cambridge, England)**, Boston, v. 121, n. 1, p. 647–653, maio 2001.
- AL-KATANANI, Y. M.; PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, Gainesville, v. 85, n.2, p. 390–396, fev. 2002.
- ARMSTRONG, D. G. *et al.* Expression of mRNA encoding IGF-I, IGF-II and type 1 IGF receptor in bovine ovarian follicles. **The Journal of Endocrinology**, Midlothian, v. 165, n. 1, p. 101–113, abr. 2000.
- ARMSTRONG, D. G. *et al.* Insulin-like growth factor (IGF) system in the oocyte and somatic cells of bovine preantral follicles. **Reproduction (Cambridge, England)**, Midlothian, v. 123, n. 6, p. 789–797, jun. 2002.
- AUSTIN, E. J. *et al.* Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during selection of follicles in the first follicular wave of the bovine estrous cycle. **Biology of Reproduction**, Dublin, v. 64, n. 3, p. 839–848, mar. 2001.
- BACHELOT, A. *et al.* Growth hormone is required for ovarian follicular growth. **Endocrinology**, Paris, v. 143, n. 10, p. 4104–4112, out. 2002.
- BAO, B.; GARVERICK, H. A. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. **Journal of Animal Science**, Columbia, v. 76, n. 7, p. 1903–1921, jul. 1998.
- BAXTER, R. C. Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, Sydney, v. 278, n. 6, p. 967–976, jun. 2000.
- BEG, M. A. *et al.* Follicular-fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. **Biology of Reproduction**, Wisconsin, v. 64, n. 2, p. 432–441, fev. 2001.
- BEG, M. A. *et al.* Follicle selection in cattle: dynamics of follicular fluid factors during development of follicle dominance. **Biology of Reproduction**, Wisconsin, v. 66, n. 1, p. 120–126, jan. 2002.
- BLONDIN, P. *et al.* Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, Quebec, v. 66, n. 1, p. 38–43, jan. 2002.

BO, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MARTINEZ, M. F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, Córdoba, v. 78, n. 1, p. 307–326, out. 2003.

BONILLA, A. Q. S. *et al.* Developmental changes in thermoprotective actions of insulin-like growth factor-1 on the preimplantation bovine embryo. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Gainesville, v. 332, n. 1, p. 170–179, jan. 2011.

BYRNE, A. T. *et al.* Regulation of apoptosis in the bovine blastocyst by insulin and the insulin-like growth factor (IGF) superfamily. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 62, n. 1, p. 489–495, ago. 2002.

CAMARGO, L. S. A. *et al.* Developmental competence and expression of the Hsp 70.1 gene in oocytes obtained from *Bos indicus* and *Bos Taurus* dairy cows in a tropical environment. **Theriogenology**, Juiz de Fora, v. 68, n. 4, p. 626–232, set. 2007.

DAFTARY, S. S.; GORE, A. C. IGF-1 in the brain as a regulator of reproductive neuroendocrine function. **Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)**, New York, v. 230, n. 5, p. 292–306, maio 2005.

DE ROOVER, R. *et al.* Effects of ovum pick-up frequency and FSH stimulation: a retrospective study on seven years of beef cattle in vitro embryo production. **Reproduction in Domestic Animals**, Liège, v. 43, n. 2, p. 239–245, abr. 2008.

DEEMESTERE, C. *et al.* Effect of Insulin-like Growth Factor-I during preantral follicular culture on steroidogenesis, in vitro oocyte maturation, and embryo development in mice. **Biology of Reproduction**, Belgium, v. 70, n. 6, p. 1664–1669, jun. 2004.

DELAFONTAINE, P.; SONG, Y. H.; LI, Y. Expression, regulation, and function of IGF-1, IGF-1R, and IGF-1 Binding Proteins in blood vessels. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, New Orleans, v. 24, n. 3, p. 435–444, mar. 2004.

DONNINSON, M.; PFEFFER, P. L. Isolation of genes associated with developmentally competent bovine oocytes and quantitation of their levels during development. **Biology of reproduction**, Hamilton, v. 71, n. 6, p. 1813–1821, dez. 2004.

DULAK, N. C.; TEMIN, H. M. A partially purified polypeptide fraction from rat liver cell conditioned medium with multiplication-stimulating activity for embryo fibroblasts. **Journal of Cellular Physiology**, Kansas City, v. 81, n. 2, p. 153–160, abr. 1973.

ELVIN, J. A.; MATZUK, M. M. Mouse models of ovarian failure. **Reviews of Reproduction**, Houston, v. 3, n. 3, p. 183–195, set. 1998.

FACÓ, O. *et al.* Efeitos genéticos aditivos e não-aditivos para características produtivas e reprodutivas em vacas mestiças Holandês x Gir. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, n. 1, p. 48-53, jan. 2008.

FELIUS, M. **Cattle Breeds: an encyclopaedia**. [S.l. : s.n.], 1995. (Nota técnica).

FORTUNE, J.; RIVERA, G.; YANG, M. . Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Animal Reproduction Science**, Ithaca, v. 82-83, n. 1, p. 109–126, jul. 2004.

FORTUNE, J. E. *et al.* Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. **Biology of Reproduction**, Ithaca, v. 65, n. 3, p. 648–654, set. 2001.

Generalidades. **Associação Brasileira dos Criadores de Girolando**. Uberaba - MG. 2016. Disponível em: < <http://girolando.com.br/index.php?paginasSite/girolando,2,pt>>. Acesso em 06 ago. 2016.

GEORGE ALVES. **A raça no Brasil. Associação Brasileira de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa**. Curitiba - PR. 02 de Fevereiro de 2015. Disponível em: < <http://gadoholandes.com.br/no-brasil/>>. Acesso em: 06 ago. 2016.

GILCHRIST, R. B.; LANE, M.; THOMPSON, J. G. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. **Human Reproduction Update**, Adelaide, v. 14, n. 2, p. 159–177, mar./abr. 2008.

GINTHER, O. J. *et al.* Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**, Cross Plains, v. 78, n. 1, p. 239–257, out. 2003.

GIUDICE, L. C. Insulin-like growth factors and ovarian follicular development. **Endocrine Reviews**, California, v. 13, n. 4, p. 641–669, nov. 1992.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo : Varela, 2002. p. 347–356.

GOUGEON, A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. **Endocrine Reviews**, Clamart, v. 17, n. 2, p. 121–155, abr. 1996.

GOULART, I. L. *et al.* Embriões F1 (Hol X Gir) produzidos in vitro utilizados a fresco em rebanhos leiteiros comerciais e controlado. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 2, p. 77–82, maio/ago. 2009.

GUNTUR, A. R.; ROSEN, C. J. IGF-1 regulation of key signaling pathways in bone. **Bonekey Reports**, Scarborough, v. 2, n. 1, p. 1-6, out. 2013.

GUTIERREZ, C. *et al.* Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in vitro. *Biol Reprod.* **Biology of Reproduction**, Midlothian, v. 62, n. 5, p. 1322–1328, maio 2000.

HAGHIGHAT, N.; VAN WINKLE, L. J. Developmental change in follicular cell-enhanced amino acid uptake into mouse oocytes that depends on intact gap junctions and transport system Gly. **The Journal of Experimental Zoology**, Downers Grove, v. 253, n. 1, p. 71–82, jan. 1990.

HORIO, T. *et al.* Production and autocrine/paracrine effects of endogenous insulin-like growth factor-1 in rat cardiac fibroblasts. **Regulatory Peptides**, Tokyo, v. 124, n. 1, p. 65–72, ago. 2005.

HOUGHTON, F. L. **Holstein-Friesian cattle. A history of the breed and its development in America. A complete list of all private and authenticated milk and butter yields; methods of breeding, handling, feeding and showing.** By Frederick L.Houghton. Brattleboro, Vt.,: Press of the Holstein-Friesian Register, 1897.

- ISAAC, E. On the domestication of cattle: zoology and cultural history both illuminate the view that the original motive was religious, not economic. **Science**, Staten Island, v. 137, n. 1, p. 195–204, jul. 1962.
- JONES, J. I.; CLEMMONS, D. R. Insulin-like growth factors and their binding proteins: Biological actions. **Endocrine Reviews**, Chapel Hill, v. 16, n. 1, p. 3-34, fev. 1995.
- KADARMIDEEN, H. N. *et al.* Genomic selection of in vitro produced and somatic cell nuclear transfer embryos for rapid genetic improvement in cattle production. **Animal Reproduction**, Assis, v. 12, n. 3, p. 389–396, jul./set. 2015.
- KAYE, P. L.; The insulin-like growth factors; structure and biological functions. **FEBS Letters**, Oxford, v. 310, n. 1, p. 94–95, fev. 1993.
- KHACHAR, Satyajit. O Gir na sua origem. **Jasdan**. Paraopeba - MG. 24 de Julho de 2013. Acesso em: 5 de agosto de 2015. Disponível em: <http://www.girjasdan.com.br/site/index.php?option=com_content&view=article&id=35&Itemid=174>. Acesso em: 06 ago. 2016.
- LAWRENCE, J. B. *et al.* The insulin-like growth factor (IGF)-dependent IGF binding protein-4 protease secreted by human fibroblasts is pregnancy-associated plasma protein-A. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Irvine, v. 96, n. 6, p. 3149–3153, mar. 1999.
- LONERGAN, P. *et al.* Relationship between time of first cleavage and the expression of IGF-I growth factor, its receptor, and two housekeeping genes in bovine two-cell embryos and blastocysts produced in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, County Dublin, v. 57, n. 2, p. 146–152, out. 2000.
- LONERGAN, P. *et al.* Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage in vitro or in vivo. **Biology of Reproduction**, County Dublin, v. 69, n. 4, p. 1424–1431, out. 2003.
- LOPES, A. S. *et al.* Effect of days post-partum, breed and ovum pick-up scheme on bovine oocyte recovery and embryo development. **Reproduction in Domestic Animals**, Tjele, v. 41, n. 3, p. 196–203, jun. 2006.
- LOUHIO, H. *et al.* The effects of insulin, and insulin-like growth factors I and II on human ovarian follicles in long-term culture. **Molecular Human Reproduction**, Helsinki, v. 6, n. 8, p. 694–698, ago. 2000.
- MADALENA, F. E.; PEIXOTO, M. G. C. D.; GIBSON J. Dairy cattle genetics and its applications in Brazil. **Livestock Research for Rural Development**, Juiz de Fora, v. 24, n. 1, p.97, jun. 2012.
- MAGALHÃES, D. M. *et al.* Hormônio do crescimento (GH) e fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I): importantes reguladores das foliculogêneses in vivo e in vitro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 36, n. 1, p. 32–38, jan./mar. 2012.

MARCATTI NETO, A.; RUAS, J. R. M.; BORGES, L. E. Desenvolvimento e performance produtiva e reprodutiva de fêmeas F1 Holandês/Zebu. In: ENCONTRO DE PRODUTORES DE GADO DE LEITE F1. **Anais...** Belo Horizonte: UFMG - Escola de Veterinária, 2004. p. 91–115.

MAZERBOURG, S. *et al.* Pregnancy-Associated Plasma Protein-A (PAPP-A) in ovine, bovine, porcine, and equine ovarian follicles: involvement in igf binding protein -4 proteolytic degradation and mRNA expression during follicular development. **Endocrinology**, Nouzilly, v. 142, n. 1, p. 5243–5253, dez. 2001.

MERTON, J. S. *et al.* Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. **Animal Reproduction Science**, Arnhem, v. 59, n. 2, p. 651–674, jan. 2003.

MIHM, M. *et al.* Identification of potential intrafollicular factors involved in selection of dominant follicles in heifers. **Biology of Reproduction**, Ballsbridge, v. 63, n. 3., p. 811–819, set. 2000.

MONGET P. *et al.* Insulin-like growth factor-binding proteins and ovarian folliculogenesis. **Horm Res (Basel)**, Nouzilly, v. 45, n. 1, p. 211–217, mar. 1996.

MONGET, P.; MONNIAUX, D.; DURAND, P. Localization, characterization and quantification of insulin-like growth factor-I-binding sites in the ewe ovary. **Endocrinology**, Nouzilly, v. 125, n. 5, p. 2484–2493, nov. 1989.

MOREIRA, F. *et al.* Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on development of in vitro derived bovine embryos. **Theriogenology**, Gainesville, v. 57, n. 2, p. 895–907, jan. 2002.

NUTTINCK, F. *et al.* Expression of components of the insulin-like growth factor system and gonadotropin receptors in bovine cumulus-oocyte complexes during oocyte maturation. **Domestic Animal Endocrinology**, Maisons-Alfort, v. 27, n. 2, p. 179–195, ago. 2004.

O Gir Leiteiro. **Associação dos Criadores Gaúchos de Zebu**. Esteio - RS. 2012. Disponível em: <http://www.acgz.com.br/secao_racas.php?pagina=5>. Acesso em: 5 ago. 2015.

ODLE, J.; ZIJLSTRA, R. T.; DONOVAN, S. M. Intestinal effects of milkborne growth factors in neonates of agricultural importance. **Journal of Animal Science**, Raleigh, v. 74, n. 1, p. 2509–2522, out. 1996.

PALMA, G. A.; MÜLLER, M.; BREM, G. Effect of insulin-like growth factor I (IGF-I) at high concentrations on blastocyst development of bovine embryos produced in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, Badersfeld, v. 110, n. 2, p. 347–353, jul. 1997.

PAULA-LOPES, F. F. *et al.* Physiology and Endocrinology Symposium: influence of cattle genotype (*Bos indicus* vs. *Bos taurus*) on oocyte and preimplantation embryo resistance to increased temperature. **Journal of Animal Science**, Diadema, v. 91, n. 3, p. 1143–1153, jan. 2013.

PONTES, J. H. F. *et al.* Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. **Theriogenology**, Londrina, v. 74, n. 1, p. 1349–1355, nov. 2010.

- QUIRK, S. M. *et al.* Ovarian follicular growth and atresia: the relationship between cell proliferation and survival. **Journal Animal Science**, Ithaca, v. 82, n. 1, p. 40–52, fev. 2004.
- RATH, D.; JHONSON, L. A. Application and commercialization of flow cytometrically sexsorted semen. **Reproduction in Domestic Animals**, Neustadt, v. 43, n. 1, p. 338–346, jul. 2009.
- REED, C. A. A History of Domesticated Animals. Frederick E. Zeuner. **American Anthropologist**, Hutchinson, v. 66, n. 1, p. 188–191, jan. 1964.
- RIVERA, G. M.; FORTUNE, J. E. Development of codominant follicles in cattle is associated with a follicle-stimulating hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein-4 protease. **Biology of Reproduction**, Ithaca, v. 65, n. 1, p. 112–118, jul. 2001.
- RIVERA, G. M.; FORTUNE, J. E. Proteolysis of Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins -4 and -5 in Bovine Follicular Fluid: Implications for Ovarian Follicular Selection and Dominance. **Endocrinology**, Ithaca, v. 144, n. 1, p. 2977–2987, jul. 2003.
- SAKAGUCHI, M. *et al.* Possible mechanism for acceleration of meiotic progression of bovine follicular oocytes by growth factors in vitro. **Reproduction (Cambridge, England)**, Hokkaido, v. 123, n. 1, p. 135–142, jan. 2002.
- SARTORI, R. *et al.* Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. **Journal of Dairy Science**, Madison, v. 85, n. 1, p. 2803–2812, nov. 2002.
- SATRAPA, R. A. T. *et al.* Influence of sire breed (*Bos indicus* versus *Bos taurus*) and interval from slaughter to oocyte aspiration on heat stress tolerance of in vitroproduced bovine embryos. **Theriogenology**, Botucatu, v. 76, n. 1, p. 1162–1167, out. 2011.
- SATRAPA, R. A. *et al.* Differential expression of members of the IGF system in OPU-derived oocytes from Nelore (*Bos indicus*) and Holstein (*Bos taurus*) cows. **Animal Reproduction Science**, Botucatu, v. 138, n. 1, p. 155–158, maio 2013.
- SAWAI, K. *et al.* Analysis of mRNA transcripts for Insulin-Like Growth Factor Receptors and Binding Proteins in bovine embryos derived from somatic cell nuclear transfer. **Cloning and Stem Cells**, Hokkaido, v. 7, n. 3, p. 189–198, jul. 2005.
- SIRARD, M.-A. *et al.* Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, Quebec, v. 65, n. 1, p. 126–136, jan. 2006.
- SIRISATHIEN, S.; HERNANDEZ-FONSECA, H.; BRACKETT, B. . Influences of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on bovine blastocyst development in vitro. **Animal Reproduction Science**, Athens, v. 77, n. 1, p. 21–32, maio 2003.
- SPICER, L. J. Proteolytic degradation of insulin-like growth factor binding proteins by ovarian follicles: a control mechanism for selection of dominant follicles. **Biology of Reproduction**, Oklahoma, v. 70, n. 5, p. 1223–1230, maio 2004.
- SPICER, L. J.; ECHTERNKAMP, S. E. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. **Endocrinology**, Oklahoma, v. 12, n. 3, p. 223–245, jul. 1995.

- SPICER, L. J.; STEWART, R. E. Interaction among bovine somatotropin, insulin, and gonadotrophins on steroid production by bovine granulosa and thecal cells. **Journal of Dairy Science**, Stillwater, v. 79, n. 1, p. 813–821, maio 1996.
- THOMAS, F. H. *et al.* Effects of IGF-I bioavailability on bovine preantral follicular development in vitro. **Reproduction (Cambridge, England)**, Edinburgh, v. 133, n. 6, p. 1121–1128, jun. 2007.
- VAN VUURE, T. History, morphology and ecology of the aurochs (*Bos primigenius*). **Europe**, n. 1, Verão 2000, p. 1–16, set. 1998.
- VELAZQUEZ, M. A. *et al.* The role of IGF1 in the in vivo production of bovine embryos from superovulated donors. **Reproduction (Cambridge, England)**, Neustadt-Mariensee, v. 137, n. 2, p. 161–180, fev. 2009.
- VERNEQUE, R. S. *et al.* **Heterose ou Vigor Híbrido**. ca. 2010 Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_234_21720039248.html>. Acesso em: 15 jul. 2016.
- VIANA, J. H. M. *et al.* Use of in vitro fertilization Technique in the last decade and its Effect on Brazilian Embryo Industry and Animal Production. **Acta Scientiae Veterinariae**, Juiz de Fora, v. 38, n. 1, p. 661–674, jan. 2010.
- VIANA, J. H. M. *et al.* Factores que afectan a la fecundación in vitro en bovinos. **Spermova**, Juiz de Fora, v. 2, n. 1, p. 10–12, fev. 2012a.
- VIANA, J. H. M. *et al.* Features and perspectives of the Brazilian In-vitro embryo industry. **Animal Reproduction**, Juiz de Fora, v. 9, n. 1, p. 00-00, jan./mar. 2012b
- WALTERS, K. A. *et al.* The effects of IGF-I on bovine follicle development and IGFBP-2 expression are dose and stage dependent. **Reproduction (Cambridge, England)**, Edinburgh, v. 131, n. 3, p. 515–523, mar. 2006.
- WASIELAK, M.; BOGACKI, M. Apoptosis inhibition by insulin-like growth factor (IGF)-I during in vitro maturation of bovine oocytes. **The Journal of Reproduction and Development**, Olsztyn, v. 53, n. 2, p. 419–426, abr. 2007.
- WATANABE, Y. F. *et al.* Aspecto comercial de embriões produzidos in vitro. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. (Eds.). **Biotécnicas Aplicadas a Reprodução Animal**. 2. ed. São Paulo : Roca, 2008. p. 293–302.
- WATSON, A. J.; WESTHUSIN, M. E.; WINGER, Q. A. IGF paracrine and autocrine interactions between conceptus and oviduct. **Journal of Reproduction and Fertility**, London, v. 54, n. 1, p. 303–315, jun. 1999. Suplemento.
- WEBB, R. *et al.* Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. **Reproduction (Cambridge, England)**, Loughborough, v. 61, n. 1, p. 71–90, fev. 2003, Suplemento.
- WINGER, Q. A. Bovine oviductal and embryonic insulin-like growth factor binding proteins: possible regulators of “embryotrophic” insulin-like growth factor circuits. **Biology of Reproduction**, London, v. 56, n. 6, p. 1415–1423, jun. 1997.

WOLFENSON, D. *et al.* Effect of heat stress on follicular development during the estrous cycle in lactating dairy cattle. **Biology of Reproduction**, Rehovot, v. 52, n. 5, p. 1106–1113, maio 1995.

YAKAR, S. *et al.* Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density. **Journal of Clinical Investigation**, Maryland, v. 110, n. 1, p. 771–781, set. 2002.

YOSHIDA, Y. *et al.* Expression of growth factor ligand and their receptor mRNAs in bovine ova during in vitro maturation and after fertilization in vitro. **The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science**, Shizuoka, v. 60, n. 5, p. 549–554, maio 1998.

YOSHIMURA, Y. Insulin-like growth factors and their binding proteins – potential relevance to reproductive physiology. **Reproductive Medicine and Biology**, California, v. 2, n. 1, p. 1–24, jan. 2003.

YUAN, W. *et al.* Follicular dominance in cattle is associated with divergent patterns of ovarian gene expression for insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-II, and IGF binding protein-2 in dominant and subordinate follicles. **Domestic Animal Endocrinology**, Columbia, v. 15, n. 1, p. 55–63, jan. 1998.

ZAPF, J. *et al.* Serum levels of insulin-like growth factor (IGF) and its carrier protein in various metabolic disorders. **Acta Endocrinologica**, Zürich, v. 95, n. 3, p. 505–517, set. 1980.

ZHAO, J. *et al.* Effect of activin A on in vitro development of rat preantral follicles and localization of activin A and activin receptor II. **Biology of Reproduction**, Utrecht, v. 65, n. 3, p. 967–977, set. 2001.

ZHOU, J.; BIEVRE, M.; BONDY, C. A. Reduced GLUT1 expression in Igf1^{-/-} null oocytes and follicles. **Growth Hormone & IGF Research**, Bethesda, v. 10, n. 3, p. 111–117, jun. 2000.

PESQUISA AGROPECUÁRIA BRASILEIRA

ANEXO - DIRETRIZES PARA AUTORES

Escopo e política editorial

A revista Pesquisa Agropecuária Brasileira (PAB) é uma publicação mensal da Embrapa, que edita e publica trabalhos técnico-científicos originais, em português, espanhol ou inglês, resultantes de pesquisas de interesse agropecuário. A principal forma de contribuição é o Artigo, mas a PAB também publica Notas Científicas e Revisões a convite do Editor.

Análise dos artigos

A Comissão Editorial faz a análise dos trabalhos antes de submetê-los à assessoria científica. Nessa análise, consideram-se aspectos como escopo, apresentação do artigo segundo as normas da revista, formulação do objetivo de forma clara, clareza da redação, fundamentação teórica, atualização da revisão da literatura, coerência e precisão da metodologia, resultados com contribuição significativa, discussão dos fatos observados em relação aos descritos na literatura, qualidade das tabelas e figuras, originalidade e consistência das conclusões. Após a aplicação desses critérios, se o número de trabalhos aprovados ultrapassa a capacidade mensal de publicação, é aplicado o critério da relevância relativa, pelo qual são aprovados os trabalhos cuja contribuição para o avanço do conhecimento científico é considerada mais significativa. Esse critério é aplicado somente aos trabalhos que atendem aos requisitos de qualidade para publicação na revista, mas que, em razão do elevado número, não podem ser todos aprovados para publicação. Os trabalhos rejeitados são devolvidos aos autores e os demais são submetidos à análise de assessores científicos, especialistas da área técnica do artigo.

Forma e preparação de manuscritos

Os trabalhos enviados à PAB devem ser inéditos (não terem dados – tabelas e figuras – publicadas parcial ou integralmente em nenhum outro veículo de divulgação técnico-científica, como boletins institucionais, anais de eventos, comunicados técnicos, notas científicas etc.) e não podem ter sido encaminhados simultaneamente a outro periódico científico ou técnico. Dados publicados na forma de resumos, com mais de 250 palavras, não devem ser incluídos no trabalho.

- São considerados, para publicação, os seguintes tipos de trabalho: Artigos Científicos, Notas Científicas e Artigos de Revisão, este último a convite do Editor.
- Os trabalhos publicados na PAB são agrupados em áreas técnicas, cujas principais são: Entomologia, Fisiologia Vegetal, Fitopatologia, Fitotecnia, Fruticultura, Genética, Microbiologia, Nutrição Mineral, Solos e Zootecnia.
- O texto deve ser digitado no editor de texto Microsoft Word, em espaço duplo, fonte Times New Roman, corpo 12, folha formato A4, com margens de 2,5 cm e com páginas e linhas numeradas.

Informações necessárias na submissão on-line de trabalhos

No passo 1 da submissão (Início), em “comentários ao editor”, informar a relevância e o aspecto inédito do trabalho.

No passo 2 da submissão (Transferência do manuscrito), carregar o trabalho completo em arquivo Microsoft Word.

No passo 3 da submissão (Inclusão de metadados), em “resumo da biografia” de cada autor, informar o link do sistema de currículos lattes (ex.: <http://lattes.cnpq.br/0577680271652459>). Clicar em “incluir autor” para inserir todos os coautores do trabalho, na ordem de autoria.

Ainda no passo 3, copiar e colar o título, resumo e termos para indexação (key words) do trabalho nos respectivos campos do sistema.

No passo 4 da submissão (Transferência de documentos suplementares), carregar, no sistema on-line da revista PAB, um arquivo Word com todas as cartas (mensagens) de concordância dos coautores coladas conforme as explicações abaixo:

- Colar um e-mail no arquivo word de cada coautor de concordância com o seguinte conteúdo:

“Eu, ..., concordo com o conteúdo do trabalho intitulado “.....” e com a submissão para a publicação na revista PAB.

Como fazer:

Peça ao coautor que lhe envie um e-mail de concordância, encaminhe-o para o seu próprio e-mail (assim gerará os dados da mensagem original: assunto, data, de e para), marque todo o e-mail e copie e depois cole no arquivo word. Assim, teremos todas as cartas de concordâncias dos coautores num mesmo arquivo.

Organização do Artigo Científico

A ordenação do artigo deve ser feita da seguinte forma:

- Artigos em português - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumo, Termos para indexação, título em inglês, Abstract, Index terms, Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusões, Agradecimentos, Referências, tabelas e figuras.
- Artigos em inglês - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Abstract, Index terms, título em português, Resumo, Termos para indexação, Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References, tables, figures.
- Artigos em espanhol - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumen, Términos para indexación; título em inglês, Abstract, Index terms, Introducción, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión, Conclusiones, Agradecimientos, Referencias, cuadros e figuras.
- O título, o resumo e os termos para indexação devem ser vertidos fielmente para o inglês, no caso de artigos redigidos em português e espanhol, e para o português, no caso de artigos redigidos em inglês.
- O artigo científico deve ter, no máximo, 20 páginas, incluindo-se as ilustrações (tabelas e figuras), que devem ser limitadas a seis, sempre que possível.

Título

- Deve representar o conteúdo e o objetivo do trabalho e ter no máximo 15 palavras, incluindo-se os artigos, as preposições e as conjunções.
- Deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.
- Deve ser iniciado com palavras chaves e não com palavras como “efeito” ou “influência”.
- Não deve conter nome científico, exceto de espécies pouco conhecidas; neste caso, apresentar somente o nome binário.
- Não deve conter subtítulo, abreviações, fórmulas e símbolos.
- As palavras do título devem facilitar a recuperação do artigo por índices desenvolvidos por bases de dados que catalogam a literatura.

Nomes dos autores

- Grafar os nomes dos autores com letra inicial maiúscula, por extenso, separados por vírgula; os dois últimos são separados pela conjunção “e”, “y” ou “and”, no caso de artigo em português, espanhol ou em inglês, respectivamente.
- O último sobrenome de cada autor deve ser seguido de um número em algarismo arábico, em forma de expoente, entre parênteses, correspondente à chamada de endereço do autor.

Endereço dos autores

- São apresentados abaixo dos nomes dos autores, o nome e o endereço postal completos da instituição e o endereço eletrônico dos autores, indicados pelo número em algarismo arábico, entre parênteses, em forma de expoente.
- Devem ser agrupados pelo endereço da instituição.
- Os endereços eletrônicos de autores da mesma instituição devem ser separados por vírgula.

Resumo

- O termo Resumo deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda, e separado do texto por travessão.
- Deve conter, no máximo, 200 palavras, incluindo números, preposições, conjunções e artigos.
- Deve ser elaborado em frases curtas e conter o objetivo, o material e os métodos, os resultados e a conclusão.

- Não deve conter citações bibliográficas nem abreviaturas.
- O final do texto deve conter a principal conclusão, com o verbo no presente do indicativo.

Termos para indexação

- A expressão Termos para indexação, seguida de dois-pontos, deve ser grafada em letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Os termos devem ser separados por vírgula e iniciados com letra minúscula.
- Devem ser no mínimo três e no máximo seis, considerando-se que um termo pode possuir duas ou mais palavras.
- Não devem conter palavras que componham o título.
- Devem conter o nome científico (só o nome binário) da espécie estudada.
- Devem, preferencialmente, ser termos contidos no AGROVOC: Multilingual Agricultural Thesaurus ou no Índice de Assuntos da base SciELO.

Introdução

- A palavra Introdução deve ser centralizada e grafada com letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.
- Deve apresentar a justificativa para a realização do trabalho, situar a importância do problema científico a ser solucionado e estabelecer sua relação com outros trabalhos publicados sobre o assunto.
- O último parágrafo deve expressar o objetivo de forma coerente com o descrito no início do Resumo.

Material e Métodos

- A expressão Material e Métodos deve ser centralizada e grafada em negrito; os termos Material e Métodos devem ser grafados com letras minúsculas, exceto as letras iniciais.
- Deve ser organizado, de preferência, em ordem cronológica.
- Deve apresentar a descrição do local, a data e o delineamento do experimento, e indicar os tratamentos, o número de repetições e o tamanho da unidade experimental.
- Deve conter a descrição detalhada dos tratamentos e variáveis.
- Deve-se evitar o uso de abreviações ou as siglas.
- Os materiais e os métodos devem ser descritos de modo que outro pesquisador possa repetir o experimento.
- Devem ser evitados detalhes supérfluos e extensas descrições de técnicas de uso corrente.
- Deve conter informação sobre os métodos estatísticos e as transformações de dados.
- Deve-se evitar o uso de subtítulos; quando indispensáveis, grafá-los em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda da página.

Resultados e Discussão

- A expressão Resultados e Discussão deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Todos os dados apresentados em tabelas ou figuras devem ser discutidos.
- As tabelas e figuras são citadas sequencialmente.
- Os dados das tabelas e figuras não devem ser repetidos no texto, mas discutidos em relação aos apresentados por outros autores.
- Evitar o uso de nomes de variáveis e tratamentos abreviados.
- Dados não apresentados não podem ser discutidos.
- Não deve conter afirmações que não possam ser sustentadas pelos dados obtidos no próprio trabalho ou por outros trabalhos citados.
- As chamadas às tabelas ou às figuras devem ser feitas no final da primeira oração do texto em questão; se as demais sentenças do parágrafo referirem-se à mesma tabela ou figura, não é necessária nova chamada.
- Não apresentar os mesmos dados em tabelas e em figuras.
- As novas descobertas devem ser confrontadas com o conhecimento anteriormente obtido.

Conclusões

- O termo Conclusões deve ser centralizado e grafado em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Devem ser apresentadas em frases curtas, sem comentários adicionais, com o verbo no presente do indicativo.
- Devem ser elaboradas com base no objetivo do trabalho.
- Não podem consistir no resumo dos resultados.
- Devem apresentar as novas descobertas da pesquisa.
- Devem ser numeradas e no máximo cinco.

Agradecimentos

- A palavra Agradecimentos deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Devem ser breves e diretos, iniciando-se com “Ao, Aos, À ou Às” (pessoas ou instituições).
- Devem conter o motivo do agradecimento.

Referências

- A palavra Referências deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Devem ser de fontes atuais e de periódicos: pelo menos 70% das referências devem ser dos últimos 10 anos e 70% de artigos de periódicos.
- Devem ser normalizadas de acordo com a NBR 6023 da ABNT, com as adaptações descritas a seguir.
- Devem ser apresentadas em ordem alfabética dos nomes dos autores, separados por ponto-e-vírgula, sem numeração.
- Devem apresentar os nomes de todos os autores da obra.
- Devem conter os títulos das obras ou dos periódicos grafados em negrito.
- Devem conter somente a obra consultada, no caso de citação de citação.
- Todas as referências devem registrar uma data de publicação, mesmo que aproximada.
- Devem ser trinta, no máximo.

Citações

- Não são aceitas citações de resumos, comunicação pessoal, documentos no prelo ou qualquer outra fonte, cujos dados não tenham sido publicados. - A autocitação deve ser evitada. - Devem ser normalizadas de acordo com a NBR 10520 da ABNT, com as adaptações descritas a seguir.
 - Redação das citações dentro de parênteses
 - Citação com um autor: sobrenome grafado com a primeira letra maiúscula, seguido de vírgula e ano de publicação.
 - Citação com dois autores: sobrenomes grafados com a primeira letra maiúscula, separados pelo "e" comercial (&), seguidos de vírgula e ano de publicação.
 - Citação com mais de dois autores: sobrenome do primeiro autor grafado com a primeira letra maiúscula, seguido da expressão et al., em fonte normal, vírgula e ano de publicação.
 - Citação de mais de uma obra: deve obedecer à ordem cronológica e em seguida à ordem alfabética dos autores.
 - Citação de mais de uma obra dos mesmos autores: os nomes destes não devem ser repetidos; colocar os anos de publicação separados por vírgula.
 - Citação de citação: sobrenome do autor e ano de publicação do documento original, seguido da expressão “citado por” e da citação da obra consultada.
 - Deve ser evitada a citação de citação, pois há risco de erro de interpretação; no caso de uso de citação de citação, somente a obra consultada deve constar da lista de referências.
 - Redação das citações fora de parênteses
 - Citações com os nomes dos autores incluídos na sentença: seguem as orientações anteriores, com os anos de publicação entre parênteses; são separadas por vírgula.
- Fórmulas, expressões e equações matemáticas

- Devem ser iniciadas à margem esquerda da página e apresentar tamanho padronizado da fonte Times New Roman.
- Não devem apresentar letras em itálico ou negrito, à exceção de símbolos escritos convencionalmente em itálico.

Tabelas

- As tabelas devem ser numeradas seqüencialmente, com algarismo arábico, e apresentadas em folhas separadas, no final do texto, após as referências.
- Devem ser auto-explicativas.
- Seus elementos essenciais são: título, cabeçalho, corpo (colunas e linhas) e coluna indicadora dos tratamentos ou das variáveis.
- Os elementos complementares são: notas-de-rodapé e fontes bibliográficas.
- O título, com ponto no final, deve ser precedido da palavra Tabela, em negrito; deve ser claro, conciso e completo; deve incluir o nome (vulgar ou científico) da espécie e das variáveis dependentes.
- No cabeçalho, os nomes das variáveis que representam o conteúdo de cada coluna devem ser grafados por extenso; se isso não for possível, explicar o significado das abreviaturas no título ou nas notas-de-rodapé.
- Todas as unidades de medida devem ser apresentadas segundo o Sistema Internacional de Unidades.
- Nas colunas de dados, os valores numéricos devem ser alinhados pelo último algarismo.
- Nenhuma célula (cruzamento de linha com coluna) deve ficar vazia no corpo da tabela; dados não apresentados devem ser representados por hífen, com uma nota-de-rodapé explicativa.
- Na comparação de médias de tratamentos são utilizadas, no corpo da tabela, na coluna ou na linha, à direita do dado, letras minúsculas ou maiúsculas, com a indicação em nota-de-rodapé do teste utilizado e a probabilidade.
- Devem ser usados fios horizontais para separar o cabeçalho do título, e do corpo; usá-los ainda na base da tabela, para separar o conteúdo dos elementos complementares. Fios horizontais adicionais podem ser usados dentro do cabeçalho e do corpo; não usar fios verticais.
- As tabelas devem ser editadas em arquivo Word, usando os recursos do menu Tabela; não fazer espaçamento utilizando a barra de espaço do teclado, mas o recurso recuo do menu Formatar Parágrafo.
- Notas de rodapé das tabelas
- Notas de fonte: indicam a origem dos dados que constam da tabela; as fontes devem constar nas referências.
- Notas de chamada: são informações de caráter específico sobre partes da tabela, para conceituar dados. São indicadas em algarismo arábico, na forma de expoente, entre parênteses, à direita da palavra ou do número, no título, no cabeçalho, no corpo ou na coluna indicadora. São apresentadas de forma contínua, sem mudança de linha, separadas por ponto.
- Para indicação de significância estatística, são utilizadas, no corpo da tabela, na forma de expoente, à direita do dado, as chamadas ns (não-significativo); * e ** (significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente).

Figuras

- São consideradas figuras: gráficos, desenhos, mapas e fotografias usados para ilustrar o texto.
- Só devem acompanhar o texto quando forem absolutamente necessárias à documentação dos fatos descritos.
- O título da figura, sem negrito, deve ser precedido da palavra Figura, do número em algarismo arábico, e do ponto, em negrito.
- Devem ser auto-explicativas.
- A legenda (chave das convenções adotadas) deve ser incluída no corpo da figura, no título, ou entre a figura e o título.
- Nos gráficos, as designações das variáveis dos eixos X e Y devem ter iniciais maiúsculas, e devem ser seguidas das unidades entre parênteses.
- Figuras não-originais devem conter, após o título, a fonte de onde foram extraídas; as fontes devem ser referenciadas.

- O crédito para o autor de fotografias é obrigatório, como também é obrigatório o crédito para o autor de desenhos e gráficos que tenham exigido ação criativa em sua elaboração. - As unidades, a fonte (Times New Roman) e o corpo das letras em todas as figuras devem ser padronizados.
- Os pontos das curvas devem ser representados por marcadores contrastantes, como: círculo, quadrado, triângulo ou losango (cheios ou vazios).
- Os números que representam as grandezas e respectivas marcas devem ficar fora do quadrante.
- As curvas devem ser identificadas na própria figura, evitando o excesso de informações que comprometa o entendimento do gráfico.
- Devem ser elaboradas de forma a apresentar qualidade necessária à boa reprodução gráfica e medir 8,5 ou 17,5 cm de largura.
- Devem ser gravadas nos programas Word, Excel ou Corel Draw, para possibilitar a edição em possíveis correções.
- Usar fios com, no mínimo, 3/4 ponto de espessura.
- No caso de gráfico de barras e colunas, usar escala de cinza (exemplo: 0, 25, 50, 75 e 100%, para cinco variáveis).
- Não usar negrito nas figuras.
- As figuras na forma de fotografias devem ter resolução de, no mínimo, 300 dpi e ser gravadas em arquivos extensão TIF, separados do arquivo do texto.
- Evitar usar cores nas figuras; as fotografias, porém, podem ser coloridas.

Notas Científicas

- Notas científicas são breves comunicações, cuja publicação imediata é justificada, por se tratar de fato inédito de importância, mas com volume insuficiente para constituir um artigo científico completo.

Apresentação de Notas Científicas

- A ordenação da Nota Científica deve ser feita da seguinte forma: título, autoria (com as chamadas para endereço dos autores), Resumo, Termos para indexação, título em inglês, Abstract, Index terms, texto propriamente dito (incluindo introdução, material e métodos, resultados e discussão, e conclusão, sem divisão), Referências, tabelas e figuras.
- As normas de apresentação da Nota Científica são as mesmas do Artigo Científico, exceto nos seguintes casos:
 - Resumo com 100 palavras, no máximo.
 - Deve ter apenas oito páginas, incluindo-se tabelas e figuras.
 - Deve apresentar, no máximo, 15 referências e duas ilustrações (tabelas e figuras).

Outras informações

- Não há cobrança de taxa de publicação.
- Os manuscritos aprovados para publicação são revisados por no mínimo dois especialistas.
- O editor e a assessoria científica reservam-se o direito de solicitar modificações nos artigos e de decidir sobre a sua publicação.
- São de exclusiva responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos.
- Os trabalhos aceitos não podem ser reproduzidos, mesmo parcialmente, sem o consentimento expresso do editor da PAB.

Contatos com a secretaria da revista podem ser feitos por telefone: (61)3448-4231, via e-mail: sct.pab@embrapa.br ou pelos correios:

Embrapa Informação Tecnológica Pesquisa Agropecuária Brasileira – PAB
Caixa Postal 040315 CEP 70770 901 Brasília, DF

