

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

EFEITO DA ADIÇÃO DA MISTURA DE PRÓPOLIS NA
DIETA DE NOVILHAS NELORE NA QUALIDADE DE
OÓCITOS E PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

Autora: Fernanda Amarante Mendes de Oliveira
Orientador: Prof. Dr. Luiz Paulo Rigolon

MARINGÁ
Estado do Paraná
Dezembro - 2012

EFEITO DA ADIÇÃO DA MISTURA DE PRÓPOLIS NA DIETA DE NOVILHAS NELORE NA QUALIDADE DE OÓCITOS E PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

Autora: Fernanda Amarante Mendes de Oliveira
Orientador: Prof. Dr. Luiz Paulo Rigolon

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá - Área de Concentração Produção Animal.

MARINGÁ
Estado do Paraná
Dezembro - 2012

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

C482e Oliveira, Fernanda Amarante Mendes de
Efeito da adição da mistura de própolis na dieta de novilhas nelore na qualidade de oócitos e produção *in vitro* de embriões / Fernanda Amarante Mendes de Oliveira. -- Maringá, 2012.
24 f. : il., color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Paulo Rigolon.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia - Área de Concentração Produção Animal, 2012.

1. Eficiência reprodutiva. 2. Nutrição. 3. OPU-PIV. 4. Complexo cumulus-oócitos. I. Rigolon, Luiz Paulo, orient. II. Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia - Área de Concentração Produção Animal. III. Título.

CDD 21.ed. 636.2085

AHS-001225



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**EFEITO DA ADIÇÃO DA MISTURA DE PRÓPOLIS NA
DIETA DE NOVILHAS NELORE NA QUALIDADE DE
OÓCIDOS E PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES**

Autora: Fernanda Amarante Mendes de Oliveira
Orientador: Prof. Dr. Luiz Paulo Rigolon

TITULAÇÃO: Mestre em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal

APROVADA em 07 de dezembro de 2012.

Prof. Dr. Gentil Vanini de Moraes

Prof. Dr. Thales Ricardo
Rigo Barreiros

Prof. Dr. Luiz Paulo Rigolon
(Orientador)

“O correr da vida, embrulha tudo,
A vida é assim...
Esquenta, esfria,
Aperta e daí afrouxa,
Sossega e depois deseinquieta,
O que ela quer da gente é **CORAGEM.**”

João Guimarães Rosa

Aos meus pais,
Jose e Sheila,
pelo amor, incentivo
e por acreditarem em mim sempre.
Minha eterna gratidão.

Aos meus irmãos,
Mariana, Arthur e Thomas
pelo apoio, amizade
e amor incondicional.

DEDICO!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar e dar forças durante esta jornada e em todos os momentos de minha vida.

À minha família, em especial ao meu pai Jose e minha mãe Sheila, por todo o carinho e exemplo. Obrigada pela boa educação, pelo amor e pelo constante incentivo.

Aos meus irmãos, Mariana, Arthur e Thomas, pela amizade, união e ajuda na conquista dos meus objetivos.

Ao meu avô, Oswaldo Francisco, pelo exemplo de vida.

Aos meus primos, Stella Maris e Daniel Augusto, que me apoiaram, me suportaram e auxiliaram muito nesta etapa.

À Universidade Estadual de Maringá, pela possibilidade de realização do curso de Mestrado em Zootecnia.

Ao Centro Universitário de Maringá, por concederem a estrutura, área, animais, laboratório e sua equipe para realização do trabalho.

Ao professor Luiz Paulo Rigolon, pela orientação, apoio e conhecimentos transmitidos.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, pelos ensinamentos, profissionalismo e dedicação transmitidos

durante o Mestrado. Em especial, agradeço ao professor Carlos Antonio Lopes de Oliveira, pelo auxílio nas análises estatísticas.

Aos professores Fabio Luiz Bim Cavaliere e Paulo Emílio Fernandes Prohmann e funcionários, Natalício Piola, Ana Paula Piola, Milena Seko, Edileuza Silva, Cícero Silva e Manoel Lima, e toda a equipe do Centro Universitário de Maringá, pelos ensinamentos, profissionalismo, e pronta disposição durante a realização do projeto.

À professora Lúcia Maria Zeoula e sua equipe, em especial ao amigo Emerson Enri Yoshimura, pela competência, dedicação e por guiarem o experimento a campo.

À minha grande amiga, Catarina Stefanello e aos amigos e colegas de Pós-graduação, obrigada pelos bons momentos de aprendizado, trabalho e descontração.

Aos amigos, João Marujo, Letícia Moreno, Lizandra Leite, Lucas Lara, Polianna Pereira, amigos desde a graduação.

Aos amigos de longa data, Márcia Langer, Herica Langer, Paulini Rigão, Rodrigo Martins, Maria Cláudia Pimenta, sempre presentes mesmo que distantes.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa.

Enfim, agradeço a todos que colaboraram, diretamente ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

FERNANDA AMARANTE MENDES DE OLIVEIRA, filha de Jose Mendes de Oliveira e Sheila Amarante Francisco de Oliveira, nasceu em Cascavel, Paraná, no dia 25 de setembro de 1986.

Em julho de 2009, concluiu o curso de Medicina Veterinária pela Universidade Estadual do Norte do Paraná – *Campus* Luiz Meneghel (UENP – CLM, Bandeirantes/Estado do Paraná).

Em março de 2010, matriculou-se no Programa de Pós-graduação em Zootecnia, nível de Mestrado, área de concentração Produção Animal, na Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos na área de Reprodução de Bovinos.

Em sete de dezembro de 2012 submeteu-se à banca para defesa da Dissertação.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT.....	xi
I- INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Efeitos da nutrição na reprodução	3
1.2. Aditivos alimentares.....	4
1.2.1. Ionóforos: Monensina sódica.....	5
1.2.2. Própolis	6
1.3. Produção <i>in vitro</i> de embriões - PIVE	8
1.3.1. Qualidade dos oócitos	9
1.4. Literatura citada	11
II – Efeito da adição da mistura de própolis na dieta de novilhas nelore na qualidade de oócitos e produção <i>in vitro</i> de embriões	15
INTRODUÇÃO.....	17
MATERIAIS E MÉTODOS	18
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
CONCLUSÕES.....	23
LITERATURA CITADA	23

LISTA DE TABELAS

	Página
I- Introdução	
Tabela 1 – Classificação de oócitos com escala de 1 a 4.....	10
II- Efeito da adição da mistura de própolis na dieta de novilhas nelore na qualidade de oócitos e produção <i>in vitro</i> de embriões	
Tabela 1 – Composição dos suplementos experimentais (g/kg).....	19
Tabela 2 – Médias e erros padrão de números de oócitos totais e as probabilidades de ocorrência de oócitos viáveis, embriões e de eclosão.....	21

LISTA DE FIGURAS

	Página
I- Introdução	
Figura 1 – Constituição do complexo <i>cumulus</i> -oócito viável, de qualidade 1	9

RESUMO

O efeito da adição de própolis na dieta foi avaliado sobre a qualidade dos oócitos e a produção *in vitro* de embriões. Objetivou-se avaliar o uso da adição de própolis e de monensina sódica sobre a qualidade dos oócitos e a produção *in vitro* de embriões de novilhas da raça nelore. Utilizou-se 36 novilhas, com 24 meses de idade, distribuídas em um delineamento experimental inteiramente casualizado com três tratamentos. Os tratamentos consistiam de uma dieta controle negativo sem adição; um grupo com adição de própolis e um grupo controle positivo com o aditivo alimentar monensina sódica. Não houve efeito da adição de própolis ou da monensina sódica sobre o número de oócitos viáveis, a produção *in vitro* de embriões (D7) e a eclosão dos embriões (D9). Entretanto, observou-se um maior número de oócitos totais dos grupos própolis e controle em relação ao grupo monensina sódica, porém os resultados não diferiram quanto à probabilidade de número de oócitos viáveis dentro do total de oócitos recuperados. A adição de própolis na dieta de novilhas não alterou as características reprodutivas: melhora da qualidade do oócito e aumento da produção de embriões *in vitro*.

Palavras-Chave: eficiência reprodutiva, nutrição, OPU-PIV, complexo *cumulus*-oócito

ABSTRACT

The effect of food addition of propolis in the diet was evaluated on the oocytes quality and the embryo *in vitro* production. This study was carried out with the objective of evaluating the use of propolis and monensin on oocytes quality and embryos *in vitro* production of nellore heifers. Thirty-six heifers, at 24 months of age, were used, and distributed in a completely randomized experimental design with three treatments. The treatments consisted of a negative control group diet with no addition; a group with addition of propolis and a positive control group with the food additive monensin. There was no effect of addition of propolis or the monensin on the number of viable oocytes, embryos *in vitro* production (D7) and embryos hatched (D9). However, there was a higher number of total oocytes on propolis and control group compared to the monensin group. But the results did not differ regarding the probability of the number of viable oocytes within the total oocytes retrieved. The addition of propolis in the diet heifers' did not alter the reproductive features: improvement of oocytes quality and increased embryos *in vitro* production.

Key Words: reproductive efficiency, nutrition, OPU-IVP, *cumulus*-oocyte complex

I- INTRODUÇÃO

A pecuária brasileira ainda está em busca de melhores índices produtivos e de precocidade do rebanho. Isto porque 80% do rebanho brasileiro é composto por animais zebuínos (ABIEC, 2012), notadamente menos precoces que os de origem européia. Progressos neste sentido foram obtidos com seleção genética, manejo nutricional e sanitário. Os ruminantes alimentam-se basicamente de alimentos fibrosos, sua grande capacidade ingestiva associada à simbiose com microrganismos ruminais responsáveis pela digestão celulolítica, obtém a principal fonte de energia para o seu crescimento, produção e reprodução.

O desempenho reprodutivo é o maior determinante da eficiência produtiva das fêmeas bovinas de leite e de corte, pois são os principais sistemas de produção. A obtenção de embriões pela técnica de produção *in vitro* (PIV) tem crescido nos últimos anos, oriundos de oócitos colhidos de doadoras vivas pela aspiração folicular guiada por ultrassonografia (Ovum pick-up, OPU). No entanto, a proporção de embriões produzidos é variável, e o complexo *cumulus*-oócitos (CCOs) é um importante fator para a PIV de embriões. Em vista disso, o número e a qualidade dos oócitos recuperados e a sua viabilidade para o desenvolvimento *in vitro* são importantes para aperfeiçoar a produção (Webb e Armstrong, 1998; Castilho e Garcia, 2005; Meirelles et al., 2008).

Os nutrientes da dieta têm ação sobre o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal e afetam fatores de origem sistêmica ou local que controlam direta ou indiretamente a função ovariana (Sartori et al., 2010). Vários mediadores bioquímicos podem atuar em mecanismos secundários ligados à reprodução e atuar de forma positiva ou negativa nas funções reprodutivas. A glicose é o principal mediador que atua no fornecimento de energia (Hess et al., 2005). Na literatura, observaram-se diferentes resultados quanto ao efeito dos níveis energéticos e suas respostas na reprodução, porém uma adequada

nutrição é necessária para que o processo reprodutivo tenha o mínimo de influência negativa da nutrição.

A maioria dos estudos reprodutivos foi conduzida em animais destinados à produção de leite e tem mostrado que, em fêmeas, a suplementação e a restrição alimentar afetam a ovulação, a qualidade dos oócitos e dos embriões, bem como, o crescimento fetal e a viabilidade dos recém-nascidos (Kendrick et al., 1999, Sartori e Mollo, 2007). Ocorre, então, um paradoxo quanto às estratégias alimentares dentro das diferentes categorias zootécnicas. De qualquer modo, o manejo nutricional adequado se faz necessário e algumas estratégias têm sido propostas no intuito de melhorar o aproveitamento do alimento consumido, como a utilização de aditivos alimentares.

A introdução de aditivos à alimentação dos bovinos, com o objetivo de aumentar a eficiência produtiva pela manipulação da fermentação ruminal, se tornou uma prática comum nas últimas décadas (Simoni, 2011). Há inúmeros aditivos alimentares usados na alimentação dos ruminantes, tais como os ionóforos, probióticos, agentes defaunantes, entre outros. Dentre os mais utilizados, destacam-se os ionóforos, os quais são adicionados às dietas e visam diminuir a proporção acetato:propionato no rúmem, além de promover um aumento na concentração plasmática de glicose (Artunduaga et al., 2008). Porém, devido a restrições e proibições quanto ao uso de ionóforos pelos órgãos oficiais da União Européia, com o objetivo de prevenir o desenvolvimento de resistência bacteriana, muitos pesquisadores têm concentrado esforços em busca de alternativas para substituir os aditivos antibióticos na produção animal.

A própolis surge como uma opção à manipulação do ecossistema ruminal por ter ação antibacteriana (Salomão et al., 2008), principalmente sobre as bactérias gram-positivas (Antunes et al., 1996), e por ser um produto natural (Stradiotti Júnior et al., 2004) Ao testar a própolis sobre a microbiota ruminal, Broudiscou et al. (2000) observaram que a produção de propionato aumentou em 10,3%, principal precursor da glicose. Contudo, não existem relatos do efeito da própolis sobre a reprodução de fêmeas bovinas, independente da categoria zootécnica.

1.1. Efeitos da nutrição na reprodução

A relação entre nutrição e reprodução é complexa e suas respostas variam (Boland et al., 2001). Alguns mediadores bioquímicos atuam em mecanismos secundários ligados à reprodução, sendo a glicose o principal mediador que atua no fornecimento de energia (Hess et al., 2005). O propionato é convertido em glicose no fígado e é o principal substrato energético para animais ruminantes. O rúmen é colonizado por vários tipos de microrganismos, em que alguns digerem carboidratos estruturais como a celulose e, outros produzem ácidos graxos voláteis (AGVs) como acetato, propionato e butirato.

A quantidade produzida de cada AGV é relacionada à dieta. Por isso, em uma alimentação rica em compostos fibrosos há maior produção de acetato. No entanto, em dietas à base de grãos há maior produção de propionato. Assim, pode-se manipular a composição da dieta e do manejo alimentar com o objetivo de aumentar o suprimento de energia para as fêmeas bovinas, o que pode resultar em melhorias para o desempenho reprodutivo desses animais.

A glicose e o propionato são substâncias que estimulam a secreção de insulina. Desta forma, dietas com alto nível de amido degradável no rúmen aumentam a produção de glicose pelo fígado, a concentração de glicose e a insulina no plasma (Theurer et al., 1996). A insulina é um hormônio envolvido na regulação da concentração de glicose na circulação, promove o transporte de glicose para o interior das células, sendo utilizada como principal fonte energética para o ovário (Souza et al., 2009). Há demonstrações que o melhor *status* energético aumenta os níveis do fator de crescimento semelhantes à insulina - I (IGF-I) e insulina no plasma e no líquido folicular de bovinos (Santos e Sá Filho, 2006). A glicose é indispensável para a síntese de ácido desoxirribonucléico (DNA) durante a maturação do oócito e o IGF-I juntamente com a insulina estimulam a proliferação das células foliculares e a esteroidogênese (Alves et al., 2009).

Portanto, os parâmetros endócrinos, o crescimento folicular, a produção de esteróides e a atividade secretória uterina são influenciados pelo estado nutricional e metabólico da fêmea (Santos e Sá Filho, 2006). Deste modo, dietas que aumentem o propionato ruminal resultam em maiores concentrações de glicose e insulina no sangue e, possivelmente, melhorem a eficiência reprodutiva. No ambiente ovariano, a insulina é

um importante modulador do desenvolvimento folicular, esteroidogênese, maturação oocitária e subsequente desenvolvimento embrionário (Yaseen et al., 2001).

Gutierrez et al. (2010) observaram um aumento nas concentrações plasmáticas de insulina em novilhas com elevada ingestão de nutrientes e esta elevação foi associada a um aumento no número de folículos pequenos nos primeiros três dias do ciclo estral, além de terem verificado também um aumento nas concentrações de IGF-I outro mediador do efeito nutricional no desenvolvimento folicular.

Kendrick et al. (1999) avaliaram o efeito do balanço energético e intervalo pós-parto na qualidade dos oócitos em vacas lactentes e observaram que vacas com dieta altamente energética apresentavam folículos menores do que as alimentadas com baixa concentração energética. No entanto, as vacas alimentadas com alta concentração energética produziram oócitos de melhor qualidade. E a análise do líquido folicular revelou menores níveis de IGF-I na dieta com baixa concentração de energia.

As populações de folículos ovarianos dos ruminantes são muito sensíveis à manipulação nutricional. Assim, esta ferramenta poderá ser utilizada a fim de incrementar a foliculogênese e o número de folículos aptos à aspiração. As concentrações plasmáticas de glicose, insulina e IGF-I foram positivamente correlacionadas com os nutrientes da dieta e são mediadores chave que modulam o efeito da nutrição sobre a função ovariana. As pesquisas relacionadas aos efeitos da nutrição e a qualidade do oócito ainda são escassas e poucos estudos relatam os efeitos de fatores nutricionais na morfologia do oócito, havendo necessidade de novos estudos que visem maiores elucidacões a respeito.

1.2. Aditivos alimentares

Durante muitos anos, pesquisadores demonstram interesse em pesquisar formas de manipular o ecossistema microbiano do rúmen, com o objetivo de melhorar a eficiência produtiva dos ruminantes domésticos. Atualmente, o método empregado para manipular a fermentação ruminal, envolve, basicamente, a adição de aditivos alimentares que podem ser enzimas, ionóforos, cultura microbiana viva, probióticos, entre outros (Goes et al., 2005).

A Instrução Normativa Nº13, de 30 de novembro de 2004, considera aditivo alimentar: “substância, microrganismo ou produto formulado, adicionado intencionalmente aos produtos, que não é utilizado normalmente como ingrediente,

tenha ou não valor nutritivo e que melhore as características dos produtos destinados à alimentação animal ou dos produtos animais, melhore o desempenho dos animais sadios e atenda às necessidades nutricionais ou tenha efeito anticoccidiano” (MAPA, 2004).

A utilização de aditivos alimentares na alimentação de ruminantes objetiva a manipulação da fermentação ruminal para aumentar a produção de propionato, diminuir a formação de metano, reduzir a proteólise e desaminação das proteínas dietéticas do rúmen (Salman et al., 2006), visando, melhorar a eficiência de utilização dos alimentos consumidos.

Os ionóforos são os aditivos alimentares mais utilizados na dieta dos ruminantes. Inicialmente, foram utilizados como coccidiostáticos na avicultura e, a partir de 1975, passaram a ser utilizados como promotores de crescimento em bovinos (Goodrich et al., 1984). Existem mais de 120 ionóforos descritos. No Brasil, somente a monensina sódica e a lasalocida são liberados para uso em ruminantes, sendo a monensina sódica a mais estudada e utilizada.

No entanto, a utilização de ionóforos como aditivos alimentares possui restrições principalmente pela União Européia, através do Regulamento nº1831/2003, em vigor desde janeiro de 2006, a qual proibiu a utilização de antibióticos e coccidiostáticos como aditivos alimentares em bovinos. Esta postura almeja prevenir os efeitos de uma possível relação entre o aumento da incidência de microrganismos resistentes aos antibióticos na medicina humana, com a utilização dessas substâncias na alimentação animal, e a possível ocorrência de resíduos nos produtos. Em função de tal restrição, existe uma procura por aditivos que possuam ações semelhantes aos ionóforos, mas não apresentem riscos à saúde humana.

1.2.1. Ionóforos: Monensina sódica

Ionóforos são assim chamados por sua propriedade transportadora de íons, apresenta a capacidade de formar complexos lipossolúveis com cátions e mediar seu transporte através das membranas lipídicas. Isto é, são moléculas lipofílicas envolvidas no transporte iônico nas membranas celulares. A monensina sódica é constituída por moléculas de baixo peso molecular, que ligam íons de minerais e direcionam seus movimentos através das membranas celulares. É um ionóforo poliéter carboxílico que tem sido utilizado na nutrição animal porque inibe seletivamente bactérias gram-positivas (produtoras de acetato, butirato, lactato, H₂ e metano). As bactérias gram-positivas não possuem sistema de transporte de elétrons acoplado à síntese de ATP,

como as gram-negativas (produtoras de propionato), e assim, a maioria não sobrevive à ação do ionóforo.

De acordo com Russel e Strobel (1989), a diferença no modo de ação dos ionóforos entre os microrganismos se deve à diferença entre os envoltórios celulares das bactérias. As bactérias gram-negativas possuem uma parede celular e uma membrana lipídica externa que contém canais de proteína (porinas), com tamanho limite de aproximadamente 600 Daltons. As bactérias gram-positivas apresentam apenas uma membrana porosa, não seletiva e, portanto, são mais sensíveis aos ionóforos.

A monensina foi pesquisada por melhorar quimicamente a eficiência alimentar através da regulação da fermentação ruminal e de seus produtos (Rumsey, 1984). Também pode aumentar a via metabólica de produção do propionato, diminuindo a produção de metabólitos intermediários utilizados na produção de metano, os quais representam ineficiência na utilização de energia. Isso melhora a taxa de crescimento corporal de novilhas e produz uma resposta endócrina, que influi nos mecanismos reguladores da puberdade (Salles et al., 2001). Goodrich et al. (1984) relataram que a monensina sódica proporciona melhoria da eficiência alimentar quando adicionada a diferentes dietas, dentre os diferentes tipos bovinos e sobre condições ambientais variáveis.

1.2.2. Própolis

A própolis é uma mistura complexa, formada por material resinoso e balsâmico coletado pelas abelhas dos ramos, flores, pólen, brotos e exsudados de árvores, adicionados a secreções salivares e enzimas. Suas propriedades biológicas são relatadas por apresentarem ação antibacteriana, antiprotozoária, antiviral, antifúngica, antiinflamatória, antioxidante, entre outras propriedades biológicas (Amoros et al., 1992; Hayashi et al., 1999; Pinto et al., 2001; Pereira et al., 2002; Kumazawa et al., 2004; Sawaya et al., 2004; Salomão et al., 2008; Cottica et al., 2011).

A própolis bruta contém entre 50 a 60% de resinas e bálsamos, 30 a 40% de ceras, e 5 a 10% de óleos essenciais, 5% de grãos de pólen e 5% de outras substâncias incluindo matéria orgânica (Pereira et al., 2002; Lustosa et al., 2008). Os compostos químicos isolados da própolis incluem ácidos e ésteres aromáticos, aldeídos, cetonas, alcoóis, esteróides, açúcares, ácidos graxos, aminoácidos, proteínas, terpenóides, flavonóides, além de vitaminas e minerais (Menezes, 2005).

As propriedades da própolis estão ligadas à sua composição química, a qual varia com a flora da região, época da colheita e com a técnica empregada, bem como, com a espécie da abelha. Ao se considerar a biodiversidade brasileira, observa-se grande variação nas diferentes composições da própolis (Pereira et al., 2002).

Uma menor variação, na composição química da própolis é observada nas regiões de clima temperado. A maior amplitude farmacológica da própolis ocorre em regiões tropicais e reflete a diversidade vegetal dessas regiões (Menezes, 2005). Nas regiões de clima temperado, a resina é coletada principalmente de árvores da espécie *Populus* e, a atividade antibacteriana está associada aos flavonóides. Entretanto, nas regiões tropicais, esta espécie não é nativa e, por esta razão, as abelhas utilizam diferentes plantas para extração da resina (Sawaya et al., 2004).

O melhor indicador da origem botânica é a análise da sua composição química comparada com a provável fonte vegetal (Bankova, 2005). Alguns componentes estão presentes em todas as amostras de própolis, enquanto outros ocorrem somente em própolis derivadas de espécies particulares de plantas. O conhecimento sobre a fonte da própolis não é só de interesse acadêmico, é útil também no processo de padronização da própolis (Bankova et al., 2000; Lustosa et al., 2008).

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de própolis, antecedido pela China (Lustosa et al., 2008). Na própolis brasileira, os principais derivados bioativos presentes são artepillin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico), ácido p-cumárico, ácido caféico, kaempferol, entre outros (Sawaya et al., 2004). O artepillin C é um do ácido fenólico que confere atividade antimicrobiana à própolis (Salomão et al., 2008), assim como o ácido caféico. O ácido p-cumárico, outro ácido fenólico é ligado à ação antioxidante.

Na experimentação animal, a própolis é objeto de pesquisa dentro da área zootécnica com experimentos em diferentes espécies animais. O maior número de trabalhos tem sido relatado em ruminantes, devido aos possíveis efeitos do extrato de própolis sobre o ambiente ruminal. Por sua atividade antibacteriana, e sua maior eficiência sobre as bactérias gram-positivas (Antunes et al., 1996). No entanto, dentro do ambiente ruminal, somente os produtos da fermentação ruminal foram mensurados, sem relatos sobre sua ação sobre as diferentes bactérias ruminais. O mecanismo da atividade antibacteriana da própolis ainda não foi elucidado, mas está provavelmente baseado na inibição da RNA-polimerase bacteriana (Bosio et al., 2000), ação decorrente do sinergismo entre seus componentes (Sforcin et al., 2000).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) desestimula o consumo de carne de animais submetidos a antibióticos como aditivo alimentar e a União Européia proíbe o uso dos ionóforos. A própolis, por ser um produto natural, é uma alternativa como aditivo alimentar de manipulação ruminal.

1.3. Produção *in vitro* de embriões - PIVE

A demanda por oócitos bovinos para Produção *in vitro* de embriões (PIVE) ou ainda, para utilização em clonagem por transferência nuclear (TN) ou transgênese (TG) tem sido cada vez mais intensa. Embora estas técnicas ainda tenham uma maior aplicação para pesquisa, também existe uma aplicação comercial. Segundo a Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) a América do Sul foi responsável por 59% (268 mil) dos embriões produzidos *in vitro* em 2010. O Brasil, líder global em PIVE detém cerca de 265 mil embriões produzidos *in vitro* e transferidos em 2010. Em rebanhos bovinos, a PIVE tem sido utilizada em larga escala por mais de duas décadas (Leal e Adona, 2006; Lonergan, 2008; Stroud e Callesen, 2012).

A PIVE é composta por três etapas: a maturação *in vitro* de oócitos (MIV), a fecundação *in vitro* (FIV) dos oócitos maduros e o cultivo *in vitro* (CIV) das estruturas embrionárias (Palma, 2008). No entanto, apesar dos muitos estudos e grandes avanços nessas áreas, a obtenção de oócitos competentes para o desenvolvimento embrionário tem se mantido nos últimos anos relativamente estável na faixa dos 30-40% de blastocistos após a PIVE (Leal e Adona, 2006).

A MIV é uma importante tecnologia reprodutiva porque pode gerar oócitos maduros que são capazes de sustentar o desenvolvimento embrionário inicial e todo o desenvolvimento a termo. Um desafio fundamental é o de compreender o que constitui a qualidade do oócito e os mecanismos que o regem (Gilchrist, 2008). Mesmo após rigorosa seleção de oócitos viáveis à maturação, a taxa de produção de embriões viáveis é menor em oócitos maturados *in vitro* do que naqueles produzidos *in vivo*. Existem evidências sobre a influência significativa da origem folicular no potencial de desenvolvimento do oócito, uma vez que, quando o oócito é removido do folículo sua capacidade de desenvolvimento é limitada. As condições de cultivo durante a PIVE podem ter impacto sobre o potencial de desenvolvimento inicial do embrião, e a qualidade intrínseca do oócito é o principal fator que determina a proporção de oócitos que se desenvolverão até o estágio de blastocisto (Lonergan, 2008).

1.3.1. Qualidade dos oócitos

Sabe-se que a remoção do oócito do ambiente folicular, prática realizada para obtenção de oócitos para maturação *in vitro* (MIV), resulta na retomada na meiose espontânea dos mesmos. Os oócitos utilizados na PIV são, em geral, aspirados do interior de folículos com diâmetro entre 2 e 8 mm, antes da divergência folicular. Os oócitos presentes em folículos menores que 2 mm de diâmetro geralmente não são competentes para reiniciar a meiose, ao passo que uma elevada porcentagem dos oócitos presentes em folículos maiores que 8 mm já está em processo de atresia (Sirard e Blondin, 1996; Leal e Adona, 2006; Gonçalves et al., 2008).

Os oócitos tem seu potencial de maturação, fecundação e capacidade de desenvolvimento embrionário estimado em parte pela aparência do complexo *cumulus*-oócito (CCO). Morfologicamente, oócitos com maior potencial de viabilidade devem apresentar ooplasma homogêneo com granulações finas, coloração marrom e estar completamente envolto por várias camadas de células do *cumulus* dispostas de forma compacta (Figura 1); (Gonçalves et al., 2008).

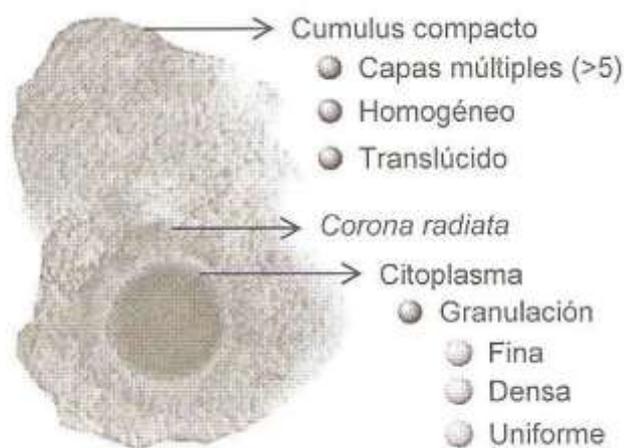


Figura 1 – Constituição do complexo *cumulus*-oócito viável, de qualidade 1 (Palma, 2008).

O método mais prático para diferenciar os oócitos viáveis é a determinação da constituição e morfologia das células do *cumulus*. Em condições fisiológicas o *cumulus* desaparece na tuba uterina em períodos de 3 a 6 horas ou em até 10 horas depois da ovulação na maioria das espécies (Palma, 2008). Em condições de cultivo *in vitro*, o *cumulus* do oócito imaturo é composto por células da corona radiata, que são as camadas de células mais próximas da zona pelúcida do oócito e comunica-se com este através de pontes celulares. É necessário manter uma ótima comunicação entre o oócito

e as células do *cumulus* para promover o desenvolvimento e capacitação do oócito durante a MIV. A presença do *cumulus* também se caracteriza por melhorar a fecundação na maioria das espécies mamíferas (Viana e Bols, 2005).

As categorias de classificação variam segundo os autores, o que diferencia são o número de categorias de cada classificação. A mais utilizada na área de pesquisa é a classificação proposta por Leibfried e First (1979), composta por quatro categorias, ou seja, quatro qualidades (Tabela 1).

Tabela 1 – Classificação de oócitos com escala de 1 a 4

Classificação	Características
Qualidade 1	<i>Cumulus</i> compacto presente, contendo mais de três camadas de células. Ooplasma com granulações finas e homogêneas, preenchendo o interior da zona pelúcida e de coloração marrom.
Qualidade 2	<i>Cumulus</i> compacto parcialmente presente em volta do oócito ou rodeando-o por completo, com menos de três camadas celulares. Ooplasma com granulações distribuídas de modo heterogêneo, podendo estar mais concentrada no centro e mais claras na periferia, ou condensadas em um só local aparentando uma mancha escura. O ooplasma preenche o espaço do interior da zona pelúcida.
Qualidade 3	<i>Cumulus</i> presente mais expandido. Ooplasma contraído, degenerado, vacuolado, ou fragmentado, com espaço entre a membrana celular e a zona pelúcida, preenchendo irregularmente o espaço perivitelino.
Qualidade 4	Oócito desnudo sem <i>cumulus</i> .

Fonte: Leibfried e First, 1979.

Ward et al. (2000) realizaram experimento procurando avaliar o efeito da morfologia do oócito sobre o potencial de desenvolvimento de blastocistos. Os oócitos recuperados foram classificados em quatro qualidades, classificação proposta por Leibfried e First (1979). Apenas oócitos qualidade 1 e 2 produziram blastocisto, com a produção de oócitos qualidade 1 significativamente maior que os oócitos qualidade 2 (21, 7% vs. 10,3%, respectivamente).

Merton et al. (2003) ao classificarem os CCOs levaram em consideração apenas as células do *cumulus*, sendo de qualidade 1 os oócitos completamente envoltos em por células do *cumulus* de forma compacta, e qualidade 3 os oócitos completamente desnudos, todas as formas restantes de morfologia do *cumulus* entre 1 e 3 definida como qualidade 2, e CCOs com *cumulus* expandido e/ou degenerados recebia classificação de qualidade 4. Concluíram que a qualidade dos CCOs obtidos por aspiração folicular

afetou as taxas de PIVE e que CCO de qualidade 1 resulta em taxa de blastocisto de 29,6%, independente do número de oócitos recuperados e processo adotado para PIVE.

A eficiência da tecnologia PIVE é fundamentalmente limitada pela qualidade do oócito ou pela competência de desenvolvimento intrínseca do mesmo. Apesar da limitação intrínseca de se maturar oócitos *in vitro*, se trata de uma tecnologia de reprodução artificial muito valiosa que lida com uma população variada de oócitos coletados de folículos em diferentes estágios de desenvolvimento, dominância e atresia (Gilchrist, 2008). Somente oócitos competentes possuem capacidade de sofrer a maturação completa. A maturação do oócito culmina com a aquisição da capacidade de ser fecundado e desenvolver-se em um embrião (Dode, 2006).

1.4. Literatura citada

- Alves, N.G.; Pereira, M.N.; Coelho, R.M. Nutrição e reprodução em vacas leiteiras. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, n. 6, p. 118-124, 2009.
- Amoros, M., Sauvager, F., Girre, L., Cormier, M. *In vitro* antiviral activity of propolis. *Apidologie*, v. 23, p. 231-240, 1992.
- Antunes, R.M.P.; Catão, R.M.R.; Ceballos, B.S.O. Atividade antimicrobiana da própolis. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 77, p. 15-18, 1996.
- Artunduaga, M.A.T.; Fortes, R.V.S.; Coelho, S.G.; Reis, R.B.; Lana, A.M.Q.; Carvalho, A.U.; Marques Júnior, A.P. Atividade ovariana de vacas leiteiras em dietas com propilenoglicol ou monensina no período de transição. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 60, p. 289-293, 2008.
- Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes – ABIEC. 2012. <www.abiec.com.br>
- Bankova, V.S. Recent trends and important developments in propolis research. Oxford University Press, *eCAM* v. 2, p. 29-32, 2005.
- Bankova, V.S., Castro, S.L., Marcucci, M.C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, v. 31, p 3-15, 2000.
- Boland, M.P.; Lonergan, P.; O’Calaghan, D. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. *Theriogenology*, v. 55, p. 1323-1340, 2001.
- Bosio, K.; Avanzini, C.; D’Avolio, A.; Ozino, O.; Savoia, D. *In vitro* activity of própolis against *Streptococcus pyogenes*. *Letters in applied Microbiology*, v. 31, p. 174-177, 2000.
- Brodiscou, L.P.; Papon, Y.; Brodiscou, A.F. Effects of dry plant extracts on fermentation and methanogenesis in continuous culture rumen microbes. *Animal Feed Science and Technology*, v. 87, p. 263-277, 2000.
- Castilho, C.; Garcia, J.M. Divergência no crescimento folicular: efeito na competência oocitária para produção *in vitro* de embriões – Revisão. *Archives of Veterinary Science*, v. 10, p. 17-23, 2005.
- Cottica, S.M.; Sawaya, A.C.H.F.; Eberlin, M.N.; Franco, S.L.; Zeoula, L.M.; Visentainer, J.V. Antioxidant activity and Composition of Propolis Obtained by

- Different Methods of Extraction. Journal of Brazilian Chemical Society, v. 22, p. 929-933, 2011.
- Dode, M.A.N. Avanços na maturação oocitária em bovinos. Acta Scientiae Veterinariae, v. 34, p. 115-129, 2006.
- Gilchrist, R.B., Interações oócito-células do cumulus regulando a qualidade do oócito. Acta Scientiae Veterinariae, v. 36, p. 257-268, 2008.
- Goes, R.H.T.B.; Alves, D.D.; Valacares Filho, S.C.; Marson, E.P. Utilização de aditivos alimentares microbianos na alimentação de bovinos de corte e leite: Revisão. Arquivos de Ciência Veterinária e Zootecnia UNIPAR, v. 8, p. 47-56, 2005.
- Goodrich, R.D.; Garret, J.E.; Gast, D.R.; Kirick, M.A.; Larson, D.A.; Meiske, J.C. Influence of Monensin on the Performance of Cattle. Journal of Animal Science, v. 58, p. 1484-1498, 1984.
- Gonçalves, P.B.D.; Oliveira, M.A.L.; Mezzalana, A.; Montagner, M.M.; Visintin, J.A.; Costa, L.F.S. Produção *in vitro* de Embriões. In: Gonçalves, P.B.D.; Figueiredo, J.R.; Freitas, V.J.F. Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal, 2008, 2ed., p.261-291.
- Gutierrez, C.G.; Oldham, J.; Bramley, T.A.; Gong, J.G.; Campbell, B.K.; Webb, R. The recruitment of ovarian follicles is enhanced by increased dietary intake in heifers. Journal of Animal Science, v. 75, p. 1876-1884, 2010.
- Hayashi, K., Komura, S., Isaji, N., Ohishi, N., Yagi, K. Isolation of antioxidant compounds from Brazilian propolis: 3,4-dihydroxy-5-prenylcinnamic acid, a novel potent antioxidant. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, v. 47, p. 1521-1524, 1999.
- Hesse, B.W.; Lake, S.L.; Scholljegerdes, E.J.; Weston, T.R.; Nayigihugu, V.; Molle, J.D.C.; Moss, G.E. Nutritional controls of beef cows reproduction. Journal of Animal Science, v. 83, p. 90-106, 2005.
- Instrução Normativa Nº13, de 30 de novembro de 2004. Regulamento Técnico sobre Aditivos para Produtos destinados à Alimentação Animal. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA, 2004.
- Kendrick, K.W.; Bailey, T.L.; Garst, A.S.; Pryor, A.W.; Ahmadzadeh, A.; Akers, R.M.; Eyestone, W.E.; Pearson, R.E.; Gwazdauskas, F.C. Effects of energy balance on hormones, ovarian activity, and recovered oocytes in lactating Holstein cows using transvaginal follicular aspiration. Journal of Dairy Science, v. 82, p. 1731-1740, 1999.
- Kumazawa, S.; Hamasaka, T.; Nakayama, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. Food Chemistry, v. 84, p. 329-339, 2004.
- Leal, C.L.V.; Adona, P.R. O bloqueio meiótico e a maturação *in vitro*. Acta Scientiae Veterinariae, v. 34, p. 131-144, 2006.
- Leibfried, L.; First, N.L. Characterization of Bovine Follicular Oocytes and Their Ability to Mature *In Vitro*. Journal of Animal Science, v. 48, p. 76-86, 1979.
- Lonergan, P. Produção *in vitro* de embriões bovinos – Lidando com problemas. Acta Scientiae Veterinariae, v. 35, p. 857-862, 2008.
- Lustosa, S.R.; Galindo, A.B.; Nunes, L.C.C.; Randau, K.P.; Rolim Neto, P.J. Própolis: atualização sobre a química e a farmacologia. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 18, p. 447-454, 2008.
- Meirelles, F.V.; Merigue, G.K.F.; Santos-Biase, W.K.; Biase, F.H.; Picada, I.E.; Pimentel, J.R.V.; Perecin, F.; Miranda, M.S.; DeBem, T.C.; Bressan, F.; Sangalli, J.R.; Providelo, F.D. Perspectivas para as técnicas de FIV, clonagem e transgenia. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 3, 2008, Londrina. Anais..., Londrina: FMVZ/USP, 2008, v. único, p.195-205.

- Menezes, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. *Arquivos do Instituto Biológico (São Paulo)*, v. 72, p. 405-411, 2005.
- Merton, J.S.; De Roos, A.P.W.; Mullaart, E.; De Ruigh, L.; Kaal, L.; Vos, P.L.A.M.; Dieleman, S.J. Factor affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*, v. 59, p. 651-674, 2003.
- Palma, G.A. Producción *in vitro* de embriones bovinos. In: Palma, G.A. *Biología de la Reproducción*, 2008, 3ed., p. 857-862.
- Pereira, A.S., Seixas, F.R.M.S., Aquino Neto, F.R. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Química Nova*, v. 25, p. 321-326, 2002.
- Pinto, M.S., Faria, J.E., Message, D., Cassini, S.T.A., Pereira, C.S., Gioso, M.M. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 38, p. 278-283, 2001.
- Regulamento (CE) N°1831/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho de 22 de setembro de 2003 relativo aos aditivos destinados a alimentação animal. *Jornal Oficial da União Europeia L268/29*, 18/10/2003.
- Rumsey, T.S. Monensin in cattle: Introduction. *Journal of Animal Science*, v. 58, p. 1461-1464, 1984.
- Russel, J.B.; Strobel, H.J. Mini-review: the effect of ionophores on ruminal fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 55, p. 01-06, 1989.
- Salles, M.S.V.; Zanetti, M.A.; Conti, R.M.C.; De Lima, C.G. Efeitos da monensina no desempenho de bezerras leiteiras em crescimento. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 30, p. 1293-1298, 2001.
- Salman, A.K.D.; Paziani, S.F.; Soares, J.P.G. Utilização de ionóforos para bovino de corte. Rondônia: EMBRAPA, 2006. Documentos 101.
- Salomão, K.; Pereira, P.R.S.; Campos, L.C.; Borba, C.M.; Cabello, P.H.; Marcucci, M.C.; Castro, S.L. Brazilian Propolis: correlation between chemical composition and antimicrobial activity. *eCAM*, v. 5, p. 317-324, 2008.
- Santos, J.E.P.; Sá Filho, M.F. Nutrição e reprodução. In: *Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada*, 2, 2006, Londrina. Anais... Londrina: FMVZ/USP, 2006, v. único, p. 30-54.
- Sartori, R.; Guardieiro, S.M.; Surjus, R.S.; Bastos, M.R. Fatores nutricionais que influenciam a qualidade embrionária em bovinos. In: *Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada*, 4, 2010, Londrina. Anais... Londrina: FMVZ/USP, 2010, v. único, p. 56-67.
- Sartori, R.; Mollo, M.R. Influência da ingestão alimentar na fisiologia reprodutiva da fêmea bovina. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 31, p. 197-204, 2007.
- Sawaya, A.C.H.F., Souza, K.S., Marcucci M.C., Cunha, I.B.S., Shimizu, M.T. Analysis of the composition of Brazilian propolis extracts by chromatography and evaluation of their *in vitro* activity against gram-positive bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 35, p. 104-109, 2004.
- Sforcin, J.M.; Fernandes, Junior, A.; Lopes, C.A.M.; Bankova, V.; Funari, S.R.C. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 73, p. 243-249, 2000.
- Stradiotti Júnior, D.; Queiroz, A.C.; Lana, R.P.; Pacheco, C.G.; Eifert, E.C.; Nunes, P.M.M. Ação da própolis sobre a desaminação de aminoácidos e a fermentação ruminal. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 33, p. 1086-1092, 2004.

- Stroud, B.; Callesen, H. Declaração da IETS sobre estatísticas mundiais de transferência de embriões para 2010. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 26, 2012, Foz do Iguaçu. Anais...Foz do Iguaçu: SBTE, 2012, v. único, p. 111-117.
- Simoni, F.L. Propólis como aditivo alimentar para Bovinos de corte. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2011, 01p. Tese Doutorado.
- Sirard, M.A.; Blondin, P. Oocyte maturation and IVF in cattle. *Theriogenology*, v. 51 , p. 417-426, 1996.
- Souza, F.A.; Canisso, I.F., Borges, A.M.; Vale Filho, V.R.; Lima, A.L.; Silva, E.C. Restrição alimentar e os mecanismos endócrinos associados ao desenvolvimento folicular ovariano em vacas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 33, p. 61-65, 2009.
- Theurer, C.B.; Huber, J.T.; Delgado-Elourdy, A. Steam flaking improves starch utilization and Milk production parameters. In: Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers. Proceeding..., Rochester: Cornell University, p. 121-130, 1996.
- Viana, J.H.M.; Bols, P.E.J. Variáveis biológicas associadas a recuperação de complexos cumulus-oócitos por aspiração folicular. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 33, p. 01-04, 2005.
- Ward, F.A.; Lonergan, P.; Enright, B.P.; Boland, M.P. Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production in vitro using Ovum pick-up technology. *Theriogenology*, v. 54, p. 433-446, 2000.
- Webb, R. Armstrong, D.G. Control of ovarian function; effect of local interactions and environmental influences on follicular turnover in cattle: a review. *Livestock Production Science*, v. 53, p. 95-112, 1998.
- Yassen, M.A.; Wrenzycki, C.; Herrmann, D.; Carnwath, J.W.; Niemann, H. Changes in the relative abundance of mRNA transcripts for insulin-like growth factor (IGF-I and IGF-II) ligands and their receptors (IGF-IR/IGF-IIR) in preimplantation bovine embryos derived from different in vitro systems. *Reproduction*, v. 122, p. 601-610, 2001.

II – Efeito da adição da mistura de própolis na dieta de novilhas nelore na qualidade de oócitos e produção *in vitro* de embriões

Resumo

Objetivou-se avaliar o efeito da adição de própolis a dieta sobre a qualidade dos oócitos e a produção *in vitro* de embriões de novilhas, da raça Nelore. Utilizou-se 36 novilhas, com 24 meses de idade, distribuídas em um delineamento experimental inteiramente casualizado com três tratamentos. Os tratamentos consistiram de uma dieta controle negativo sem adição; um grupo com adição de própolis e um grupo controle positivo com o aditivo alimentar monensina sódica (Rumensin[®] 200, Elanco). Não houve efeito da adição de própolis ou monensina sódica sobre a probabilidade de ocorrência de oócitos viáveis, a produção de embriões (D7) e a eclosão dos embriões (D9). Entretanto, observou-se maior número de oócitos totais dos grupos própolis e controle ($9,4 \pm 1,7$ e $8,5 \pm 1,7$ respectivamente) em relação ao grupo monensina sódica ($6,0 \pm 1,8$). Porém os resultados não diferiram quanto à probabilidade do número de oócitos viáveis dentro do total de oócitos recuperados entre os grupos controle (0,48), própolis (0,54) e monensina sódica (0,60). A adição de própolis na dieta das novilhas não melhorou a qualidade dos oócitos e produção embriões *in vitro*.

Palavras-Chave: eficiência reprodutiva, nutrição, OPU-PIV, complexo *cumulus*-oócito

II- Effect of addition of propolis in the diet of nellore heifers on the quality of oocytes and embryos *in vitro* production

Abstract

This study carried out with the objective of evaluating the effect of propolis added to nellore heifers diet on oocytes quality and embryos *in vitro* production. Thirty-six heifers were used, at 24 months of age, distributed in a completely randomized design with three treatments. The treatments consisted of a negative control diet with no addition; a group with addition of propolis and a positive control group with the food additive monensin (Rumensin[®] 200, Elanco). There was no effect of addition of propolis or monensin on probability occurrence of viable oocytes, embryos *in vitro* production (D7) and embryos hatched (D9). However, there was a higher number of total oocytes retrieved on propolis and control groups (9.4 ± 1.7 e 8.5 ± 1.7 , respectively) compared to the monensin group (6.0 ± 1.8). But the results did not differ regarding the probability of the number of viable oocytes within the total of oocytes recovered between the control (0.48), propolis (0.54) and monensin (0.60) groups. The addition of propolis in the diet of heifers did not improve the oocytes quality and embryos *in vitro* production.

Key Words: reproductive efficiency, nutrition, OPU-IVP, *cumulus*-oocyte complex

INTRODUÇÃO

O estudo da própolis na alimentação de animais ruminantes está baseado nas suas várias propriedades biológicas: antibacteriana, antifúngica, antiprotozoária, antioxidante, antiinflamatória, imunomoduladora, hepatoprotetora, entre outras (Banskota et al., 2000). Por se tratar de um produto natural, torna-se uma alternativa a manipulação do ecossistema ruminal frente ao atual cenário de restrições à utilização de aditivos na alimentação animal. A atividade biológica da própolis está associada principalmente a compostos fenólicos, como os flavonóides, e derivados do ácido hidroxicinâmico. Estudos comprovaram a atividade antibacteriana da própolis contra bactérias gram-positivas e atividade limitada contra gram-negativas. Entretanto, pesquisas que relatam sua ação sobre as bactérias ruminais ainda são escassas (Antunes et al., 1996; Marcucci et al., 2001; Lu et al., 2005; Rezende et al., 2006).

O ionóforo monensina sódica tem sido utilizado na alimentação de bovinos de corte por mais de 25 anos, por melhorar a eficiência alimentar, por meio da regulação da fermentação ruminal e seus produtos (Goodrich et al., 1984). A monensina sódica possui ação contra as bactérias gram-positivas, pois estas não possuem o sistema de transporte de íons através da membrana celular, como as gram-negativas (produtoras de propionato); (Rumsey, 1984). Assim, a monensina aumenta a via metabólica de produção de propionato, e promove um aumento na concentração plasmática de glicose (Artunduaga et al, 2008).

O propionato, após absorvido pela parede ruminal, é conduzido ao fígado e metabolizado até glicose através da gliconeogênese (O'Callaghan et al., 2000), o que eleva o nível de glicose circulante (Leury et al., 1990) e, por sua vez, o nível de insulina sanguínea (Gutiérrez et al., 1997). A insulina é um hormônio essencialmente envolvido na regulação da concentração de glicose na circulação, promove o transporte de glicose para o interior das células e a glicose é utilizada como principal fonte energética pelo ovário (Souza et al., 2009). No ambiente ovariano, a insulina é um importante modulador do desenvolvimento folicular, da esteroidogênese, da maturação oocitária e do subsequente desenvolvimento embrionário (Yaseen et al., 2001). A glicose também participa da maturação oocitária por ser indispensável para a síntese de DNA (Alves et al., 2009).

Segundo Webb e Armstrog (1998), o hormônio de crescimento (GH), o fator de crescimento semelhante a insulina – I (IGF-I) e a insulina regulam a foliculogênese, o

que aumenta o *pool* de folículos responsivos ou dependentes de gonadotrofinas hipofisárias ou, de alguma forma, atua diminuindo o mecanismo de atresia folicular, ao que reflete em um maior número de folículos disponíveis para aspiração folicular.

A demanda por oócitos bovinos para produção *in vitro* (PIV) de embriões tem sido cada vez mais intensa (Lonergan, 2008), e a qualidade do oócito recuperado um fator limitante para a eficiência da técnica (Gilchrist, 2008). Segundo a Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS), o número total de embriões transferidos oriundos da PIV no mundo em 2010 foi de 339 mil. O Brasil é o líder global no setor, e, em 2010, foram transferidos 265 mil embriões PIV no país (Stroud & Callesen, 2012).

Desta forma, a manipulação do ecossistema ruminal visa aumentar a eficiência da utilização das dietas consumidas pelos ruminantes, podendo resultar em uma melhor eficiência reprodutiva. Objetivou-se, avaliar os efeitos da adição de própolis na dieta sobre a qualidade de oócitos e a produção *in vitro* de embriões em novilhas da raça Nelore.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Fazenda Escola do Centro Universitário de Maringá no período de dezembro de 2010 a março de 2011. A produção dos embriões foi realizada no Laboratório de Produção *in vitro* de Embriões Bovinos do Centro Universitário de Maringá, também localizado na Fazenda Escola do Centro Universitário de Maringá.

Utilizou-se 36 novilhas cíclicas, da raça nelore, com 24 meses de idade e peso médio inicial de $305,6 \pm 11,7$ kg. Todos os animais foram identificados por meio de ferro cadente e também por brincos com cores diferentes por tratamento. Para formação dos lotes, as novilhas foram distribuídas ao acaso nos diferentes tratamentos.

A área experimental constituiu-se por três piquetes de Tifton 85 *Cynodon Dactylon* (L.) Pers, com área total de 8,7 hectares (2,9 ha/piquete). Os piquetes foram providos de bebedouro e comedouro de plástico (0,5m/animal) para fornecimentos dos tratamentos.

Previamente ao início do experimento, as novilhas foram alocadas por 28 dias nos piquetes para adaptação à pastagem e aos tratamentos: controle negativo – sem aditivos (CON); própolis (PRO) e controle positivo – monensina sódica (MON).

O método de pastejo adotado foi de lotação contínua com carga variável. Foram utilizados 12 animais “testers”, por piquete, mais os reguladores. Os tratamentos permaneceram fixos nos piquetes em todo o experimento. Os animais reguladores foram utilizados para ajustar a carga animal e garantir a oferta de forragem homogênea entre os tratamentos.

A concentração do produto à base de própolis foi entre 5 e 30 g de própolis e diluição alcoólica entre 60 a 93.8% (v/v) e foi preparado de acordo com a metodologia desenvolvida por Franco e Bueno (1999) e constituído em um extrato seco de própolis, registrado no Instituto Nacional de Propriedade Industrial sob nº 0605768-3. Subsequentemente, o conteúdo alcoólico foi evaporado com auxílio de uma rotaevaporador e o extrato foi seco em um *spray dryer*. A quantificação de flavonóides foi obtida por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e 33,24 mg/animal/dia de flavonóides totais em apigenina foi fornecido.

A quantidade de monensina sódica fornecida foi de 100 mg/animal/dia (Rumensin[®] 200, Elanco). Os tratamentos e o suplemento mineral foram veiculados juntamente com milho moído, sendo esta mistura (250 g/animal) fornecida diariamente às 17 h (Tabela 1).

Tabela 1 - Composição dos tratamentos experimentais (g/Kg)
Table 1 - Composition of experimental treatments (g/Kg)

Ingredientes (g/Kg)	CON ³	PRO ⁴	MON ⁵
Milho moído	800,0	780,0	780,0
Minerais ¹	200,0	200,0	200,0
Própolis	-	20,0	-
Monensina sódica ²	-	-	20,0

¹ Suplemento mineral (P40, Fortmix): Ca: 110 g.kg⁻¹, P: 40 g.kg⁻¹, Na: 140 g.kg⁻¹, S: 8 g.kg⁻¹, Mg: 750 mg.kg⁻¹, Co: 45 mg.kg⁻¹, I: 45 mg.kg⁻¹, Co: 825 mg.kg⁻¹, Se: 13 mg.kg⁻¹, Zn: 2200 mg.kg⁻¹, F: 400mg.kg⁻¹.

² Rumensin[®] 200 (Eli Lilly do Brasil - Elanco).

³CON: tratamento controle.

⁴PRO: própolis.

⁵MON: monensina sódica.

Ao final do experimento, os ovários das doadoras foram aspirados para obtenção dos oócitos, pelo método de punção folicular com agulha acoplada a uma bomba de vácuo guiada por ultrassonografia transvaginal.

Para coleta do conteúdo folicular, foi utilizado tubo cônico de polipropileno de 50 mL contendo 2 mL de solução de punção (1% de soro fetal bovino – SFB, 5 UI/mL de heparina sódica e 99% de solução salina fosfatada tamponada – PBS) a temperatura de 36 °C. O tubo foi acoplado a uma bomba de vácuo (WTA[®] 3D-003, Brasil), programada a uma pressão de 85 a 100 mmHg e ao sistema de punção. O sistema é composto por

uma guia transvaginal acoplada a um mandril com agulha para a punção folicular, foi utilizada agulha 20 G, e por um transdutor microconvexo de 5 Mhz ligado ao aparelho de ultrassom (Aloka[®] SSD-500, Japão).

Os oócitos recuperados foram quantificados e classificados quanto à sua viabilidade. A classificação foi de acordo com a morfologia do complexo *cumulus*-oócito (CCO) em quatro qualidades, classificação proposta por Leibfried e First (1979). Qualidade 1 – multicamadas compactas de células do *cumulus* circundando o oócito (contendo mais de três camadas de células), ooplasma homogêneo e com granulações finas de coloração marron; qualidade 2 – células do *cumulus* compactas, parcialmente presente ou rodeando o oócito por completo com menos de três camadas de células, ooplasma com granulações de distribuição heterogênea pode apresentar coloração escura; qualidade 3 – células do *cumulus* presente e expandidas e ooplasma contraído, degenerado, vacuolado ou fragmentado e qualidade 4 – oócitos desnudos. Apenas oócitos de qualidade 1 e 2 foram classificados como viáveis à maturação *in vitro*.

A produção *in vitro* seguiu a sequência de maturação dos oócitos, fecundação dos oócitos maduros e cultivo das estruturas embrionárias. Cada etapa possui meio e tempo de cultivo específicos. Para isto foram utilizadas placas de petri, contendo gotas de 70 µL de meio de cultivo e cada uma foi imersa em óleo mineral, o meio variou de acordo com cada etapa. Em todo o processo, as respectivas placas foram mantidas em incubadoras a 38,8 °C, 5% de CO₂ e umidade saturada.

A maturação foi realizada em meio TCM199 com sais de Earles, glutamina e bicarbonato de sódio, suplementado com 10% SFB, 22 µg/mL de piruvato, 50 µg/mL de gentamicina, 0,5 µg/mL de hormônio folículo estimulante (FSH), 50 µg/mL de hormônio luteinizante (LH), 1 µg/mL de estradiol. O tempo da maturação *in vitro* foi de 24 h.

A fecundação foi realizada em meio Fert-TALP suplementado com 10 µg/mL de heparina, 22 µg/mL de piruvato, 50 µg/mL de gentamicina, albumina sérica bovina (BSA) livre de ácidos graxos, solução de PHE (2 µM de penicilina, 1 µM de hipotaurina 0,25 µM de epinefrina). Foi utilizado sêmen congelado, de um touro da raça nelore. O sêmen foi descongelado a 36 °C por 30 segundos. O método de seleção e capacitação espermática empregado foi o de Gradiente Percoll[®], e a diluição feita para obter a concentração de 1X10⁶ espermatozoides/mL. O tempo de fecundação *in vitro* foi de 22 a 24 h.

Após a fecundação, as estruturas embrionárias foram cultivadas em meio SOF (Synthetic oviduct fluid) suplementado com 10% de SFB. Foi avaliada a produção de embriões (blastocistos) no sétimo dia após a fecundação, classificação segundo o Manual da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões (Stringfellow e Seidel, 1998). No nono dia pós-fecundação, foi avaliada a taxa de eclosão dos embriões.

As variáveis avaliadas foram número de oócitos totais recuperados pela punção folicular, dentro deste total o número de oócitos viáveis (qualidade 1 e 2), a produção de embriões ao sétimo dia e o número de embriões eclodidos ao nono dia, pós-fecundação.

A análise estatística dos resultados experimentais foi realizada utilizando o PROC GENMOD do Sistema Computacional SAS (versão 9.0). Foi utilizada a metodologia de Modelos Lineares Generalizados, implementado a Análise de Deviance para a variável número de oócitos aspirados. Considerou-se a Distribuição de Poisson com função de ligação logarítmica, estimaram-se as diferenças nas probabilidades de ocorrência de oócitos viáveis, embriões produzidos e embriões eclodidos em função dos tratamentos, considerando a Distribuição Binominal com função de ligação logit.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve efeito da adição de própolis e de monensina sódica sobre o aumento da probabilidade de ocorrência de oócitos viáveis, dentro do total de oócitos recuperados (Tabela 2), Sabe-se que os oócitos têm seu potencial de maturação, fecundação e capacidade de desenvolvimento embrionário estimado pela aparência do complexo *cumulus*-oócito (CCO) e que oócitos de melhor qualidade apresentam maior probabilidade de produzirem embriões *in vitro* (Leal & Adona, 2006).

Tabela 2 – Médias e erros padrão de números de oócitos totais e as probabilidades de ocorrência de oócitos viáveis, embriões produzidos e de embriões eclodidos
Table 2 – Averages and standard error of the total oocytes recovered and likelihood of occurrence of viable oocytes, embryos production and embryos hatched

Tratamentos	Oóc. Totais	Oóc. Viáveis	Embriões	Eclosão
Controle negativo	8,5 ± 1,7 a	0,48	0,72	0,94
Própolis	9,4 ± 1,7 a	0,54	0,62	0,97
Monensina	6,0 ± 1,8 b	0,60	0,70	0,96

a>b Médias seguidas de letras diferentes, diferem entre si na coluna

Merton et al. (2003), ao classificarem os CCOs levaram em consideração apenas as células do *cumulus*, e observaram que a qualidade dos CCOs obtidos por aspiração

folicular afetaram as taxas de embriões produzidos *in vitro*. Adicionalmente, os CCO de qualidade 1 resultaram em maior taxa de blastocisto (29,6%) , independente do número de oócitos recuperados.

No estudo de Ward et al. (2000), que avaliaram o efeito da morfologia do oócito sobre o potencial de desenvolvimento de blastocistos, os oócitos recuperados também foram classificados nas quatro qualidades propostas por Leibfried e First (1979), e somente os oócitos qualidade 1 e 2 produziram blastocisto, com a produção de oócitos qualidade 1 significativamente maior que os oócitos qualidade 2 (21,7 vs. 10,3%, respectivamente).

Quanto ao número de oócitos recuperados, houve um maior número de oócitos totais do grupo própolis e do grupo controle ($9,4 \pm 1,7$ e $8,5 \pm 1,7$ respectivamente) em relação ao grupo monensina ($6,0 \pm 1,8$) (Tabela 2). Porém, isso não refletiu na qualidade dos oócitos recuperados e sua capacidade de produzir embriões *in vitro*.

A probabilidade de produção *in vitro* de embriões e de eclosão dos embriões no nono dia pós-fecundação não sofreu interferência dos tratamentos utilizados (Tabela 2). Porém o grupo própolis apresenta um maior valor numérico de probabilidade de eclosão.

As populações *in vivo* de folículos ovarianos dos ruminantes são muito sensíveis a manipulação nutricional e esta ferramenta possivelmente afeta a foliculogênese e o número de folículos aptos à aspiração. Tendo em vista que as concentrações plasmáticas de glicose, insulina e IGF-I são positivamente correlacionadas com os nutrientes da dieta, e são importantes mediadores, que modulam o efeito da nutrição sobre a função ovariana.

Isto ao se considerar que o aumento nas concentrações plasmáticas de insulina em novilhas com elevada ingestão de nutrientes foi associado a um maior número de folículos pequenos nos primeiros três dias do ciclo estral e também ao aumento nas concentrações plasmáticas de IGF-I (Gutierrez et al. (2010).

Kendrick et al. (1999) avaliaram o efeito do balanço energético e do intervalo pós-parto na qualidade dos oócitos em vacas lactentes e observaram que vacas alimentadas com dieta altamente energética apresentavam folículos menores, quando comparadas às vacas que foram alimentadas com dieta de baixa concentração energética. No entanto, as vacas alimentadas com dieta com alta concentração energética produziam oócitos de melhor qualidade e a análise do líquido folicular revelou menores níveis de IGF-I na dieta com baixa concentração de energia.

CONCLUSÕES

A adição de própolis na alimentação de novilhas não influenciou a qualidade dos oócitos e a produção *in vitro* de embriões. Não foi observado efeito sobre a qualidade dos oócitos (refletido no número de oócitos viáveis), produção de embriões (blastocistos) e os embriões eclodidos no nono dia pós-fecundação *in vitro*. Entretanto, o uso de monensina sódica obteve o menor número de oócitos recuperados por punção, quando comparado ao grupo própolis e o grupo controle.

LITERATURA CITADA

- Alves, N.G.; Pereira, M.N.; Coelho, R.M. Nutrição e reprodução em vacas leiteiras. Revista Brasileira de Reprodução Animal, n.6, p.118-124, 2009.
- Antunes, R.M.P.; Catão, R.M.R.; Ceballos, B.S.O. Atividade antimicrobiana da própolis. Revista Brasileira de Farmácia, v.77, n.1, p. 15-18, 1996.
- Artunduaga, M.A.T.; Fortes, R.V.S.; Coelho, S.G.; Reis, R.B.; Lana, A.M.Q.; Carvalho, A.U.; Marques Júnior, A.P. Atividade ovariana de vacas leiteiras em dietas com propilenoglicol ou monensina no período de transição. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.60, n.2, p. 289-293, 2008.
- Bankova, V.S., Castro, S.L., Marcucci, M.C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. Apidologie, v.31, p. 3-15, 2000.
- Franco, S.L.; Bueno, J.H.F. Otimização de processo extrativo de própolis. Infarma, v.11, n.11/12, p. 48-51, 1999.
- Gilchrist, R.B., Interações oócito-células do cumulus regulando a qualidade do oócito. Acta Scientiae Veterinariae, v.36, n.1, p. 257-268, 2008.
- Goodrich, R.D.; Garret, J.E.; Gast, D.R.; Kirick, M.A.; Larson, D.A.; Meiske, J.C. Influence of Monensin on the Performance of Cattle. Journal of Animal Science, v.58, n.6, p. 1484-1498, 1984.
- Gutierrez, C.G.; Oldham, J.; Bramley, T.A.; Gong, J.G.; Campbell, B.K.; Webb, R. The recruitment of ovarian follicles is enhanced by increased dietary intake in heifers. Journal of Animal Science, v. 75, p. 1876-1884, 2010.
- Kendrick, K.W.; Bailey, T.L.; Garst, A.S.; Pryor, A.W.; Ahmadzadeh, A.; Akers, R.M.; Eyestone, W.E.; Pearson, R.E.; Gwazdauskas, F.C. Effects of energy balance on hormones, ovarian activity, and recovered oocytes in lactating Holstein cows using transvaginal follicular aspiration. Journal of Dairy Science, v. 82, n. 8, p. 1731-1740, 1999.
- Leal, C.L.V.; Adona, P.R. O bloqueio meiótico e a maturação *in vitro*. Acta Scientiae Veterinariae, v. 34, n.1, p. 131-144, 2006.
- Leibfried, L.; First, N.L. Characterization of Bovine Follicular Oocytes and Their Ability to Mature *In Vitro*. Journal of Animal Science, v. 48, n. 1, p. 76-86, 1979.
- Leury, B.J.; Murray, P.J.; Rowe, J.B. Effect of nutrition on the response in ovulation rate in Merino ewes following short-term supplementation and insulin administration. Journal of Agricultural Research, v. 41, n. 4, p. 751-759, 1990.
- Lonergan, P. Produção *in vitro* de embriões bovinos – Lidando com problemas. Acta Scientiae Veterinariae, v. 35, n. 1, p. 857-862, 2008.

- Lu, L.; Chen, Y.; Chou, C. Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*, v. 102, p. 213-220, 2005.
- Marcucci, M.C.; Ferreres, F.; García-Viguera, C.; Bankova, V.S.; De Castro, S.L.; Dantsa, A.P.; Valente, P.H.M. Paulino, N. Phenolic compounds from Brazilian própolis with pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 74, p. 105-112, 2001.
- Merton, J.S.; De Roos, A.P.W.; Mullart, E.; De Ruigh, L.; Kaal, L.; Vos, P.L.A.M.; Dieleman, S.J. Factor affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*, v. 59, p. 651-674, 2003.
- O'Callaghan, P.; Yaakub, H.; Hyttel, P.; Spicer, L.; Boland, M.P. Effect of nutrition and superovulation on oocytes morphology, follicular fluid composition and systemic hormone concentrations in ewes. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 118, p. 303-313, 2000.
- Rezende, G.P.S.R; Pimenta, F.C.; Costa, L.R.R.S. Antimicrobial activity of two Brazilian commercial propolis. *Journal of Oral Science*, v. 5, n.16, p.967-970, 2006.
- Rumsey, T.S. Monensin in cattle: Introduction. *Journal of Animal Science*, v. 58, n. 6, p. 1461-1464, 1984.
- Souza, F.A.; Canisso, I.F., Borges, A.M.; Vale Filho, V.R.; Lima, A.L.; Silva, E.C. Restrição alimentar e os mecanismos endócrinos associados ao desenvolvimento folicular ovariano em vacas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 33, n. 2, p. 61-65, 2009.
- Stringfellow, D.A.; Seidel, S.M. Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. Illinois: IETS, 1998. 113 p.
- Stroud, B.; Callesen, H. Declaração da IETS sobre estatísticas mundiais de transferência de embriões para 2010. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 26, 2012, Foz do Iguaçu. Anais... Foz do Iguaçu: SBTE, 2012, v. único, p. 111-117.
- Ward, F.A.; Lonergan, P.; Enright, B.P.; Boland, M.P. Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production in vitro using Ovum pick-up technology. *Theriogenology*, v. 54, p. 433-446, 2000.
- Webb, R. Armstrong, D.G. Control of ovarian function; effect of local interactions and environmental influences on follicular turnover in cattle: a review. *Livestock Production Science*, v. 53, n. 2, p. 95-112, 1998.
- Yassen, M.A.; Wrenzycki, C.; Herrmann, D.; Carnwath, J.W.; Niemann, H. Changes in the relative abundance of mRNA transcripts for insulin-like growth factor (IGF-I and IGF-II) ligands and their receptors (IGF-IR/IGF-IIR) in preimplantation bovine embryos derived from different in vitro systems. *Reproduction*, v. 122, p. 601-610, 2001.