

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

FELIPE BORGES ROSA

**PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS DE NOVILHAS MISTIÇAS
ZEBUÍNAS SUPLEMENTADAS COM DIETAS ENRIQUECIDAS COM
DIFERENTES FONTES DE ÁCIDOS GRAXOS**

CAMPOS DOS GOYTACAZES

Fevereiro - 2013

FELIPE BORGES ROSA

**PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS DE NOVILHAS MISTIÇAS
ZEBUÍNAS SUPLEMENTADAS COM DIETAS ENRIQUECIDAS COM
DIFERENTES FONTES DE ÁCIDOS GRAXOS**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, na área de concentração de Melhoramento Animal e Biotecnologia da Reprodução.

Orientador: Prof. Angelo José Burla Dias

Campos dos Goytacazes

Fevereiro - 2013

FELIPE BORGES ROSA

**PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS DE NOVILHAS MISTIÇAS
ZEBUÍNAS SUPLEMENTADAS COM DIETAS ENRIQUECIDAS COM
DIFERENTES FONTES DE ÁCIDOS GRAXOS**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, na área de concentração de Melhoramento Animal e Biotecnologia da Reprodução.

Aprovada em 26 de Fevereiro de 2013.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Angelo José Burla Dias (Doutor, Biociências e Biotecnologia)-UENF.
(Orientador)

Prof. Kelen Salaroli Viana (Doutora, Ciência Animal)-UFRJ.

Prof. Alberto Magno Fernandes (Doutor, Zootecnia)–UENF.

Prof. José Frederico S. Silva (Doutor, Medicina Veterinária)-UENF.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, por ter-me proporcionado esta realização por meio de sua excelente equipe docente.

À CAPES, pelo recurso financeiro para a minha bolsa.

À Fazenda Passarinho, de propriedade do Sr. Nelson Lamego, e ao seu funcionário Valtinho, pela oportunidade de realização do experimento.

Aos professores, pela dedicação ao ensino dos alunos e ao progresso da Universidade no campo da pesquisa.

Ao meu orientador, Prof. Angelo Burla, pessoa de muita grandeza moral que incansavelmente dispõe de total interesse e dedicação pelo seu compromisso com a Universidade, além de sua compreensão e paciência com todos seus alunos e principalmente comigo.

Aos meus amigos e técnicos do laboratório LRMGA, sempre ao meu lado apoiando e auxiliando nas pesquisas e nos experimentos.

Aos meus dois grandes amigos, Bruno Pena e Fernanda Costa, que estiveram sempre ao meu lado em todos os momentos, apoiando-me e auxiliando-me nas pesquisas e, diretamente, no experimento. Pessoas realmente amigas pelas quais tenho grande admiração, e lhes agradeço ainda pelos momentos de descontração na padaria.

Agradeço a meus pais, sempre presentes, estimulando-me nos momentos de fraqueza e dando-me todo o suporte, não apenas nas atividades escolares e acadêmicas, mas em toda minha vida.. Sem eles, jamais teria conseguido chegar até aqui.

Agradeço também aos meus irmãos que, apesar da distância, torcem muito pelo meu sucesso e desenvolvimento na vida.

A minha noiva Stéphanie, pessoa muito especial na minha vida, lutando junto comigo em todos os momentos e ajudando-me a prosseguir sempre sem desanimar, com grande paciência nos piores momentos.

Aos meus tios Cecília e Beto que, como segundos pais, ajudaram-me e continuam ajudam-me sem medir esforços. Muito obrigado por tudo.

Muito obrigado a todos!!

RESUMO

ROSA, Felipe Borges, M.S., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Fevereiro 2013. Produção *in vitro* de embriões bovinos de novilhas mestiças zebuínas suplementadas com dietas enriquecidas com diferentes fontes de ácidos graxos. Orientador: Prof. Angelo José Burla Dias.

O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da suplementação de novilhas zebuínas com óleos de canola, soja e girassol, sobre o diâmetro dos folículos ovarianos, o percentual de recuperação ovocitária na OPU e a taxa de produção *in vitro* de embriões. Os animais foram alimentados com as respectivas dietas por 70 dias. Foram utilizadas 20 novilhas mestiças zebu, divididas aleatoriamente em quatro tratamentos. Semanalmente, foram realizadas aspirações foliculares de todos os animais e os COCs foram encaminhados para PIV. Os resultados foram analisados e mostraram uma diferença ($P < 0,05$) entre os grupos canola e girassol. Animais suplementados com canola apresentaram menor quantidade de folículos no momento da aspiração. Não houve diferença na taxa de recuperação ovocitária ($P > 0,05$) entre os grupos analisados. Os resultados obtidos mostraram não haver diferença no tamanho do folículo dominante entre os tratamentos. Os tratamentos não interferiram na taxa de clivagem, diferentemente do ocorrido com a taxa de blastocistos, quando os animais suplementados com soja apresentaram uma redução significativa em relação à do controle. Conclui-se que a suplementação com os óleos testados não melhorou o rendimento da PIV e que animais tratados com óleo de soja apresentaram o menor desempenho na PIV. Sendo a soja um importante componente das rações para bovinos, torna-se importante avaliar mais detalhadamente seus efeitos sobre a reprodução bovina.

Termos para indexação: blastocistos, bovino, ácidos graxos poli-insaturados

ABSTRACT

ROSA, Felipe Borges, M.S., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. February 2013. *In vitro* production of bovine embryos from zebu crossbred heifers supplemented with diets enriched with different fatty acid sources. Advisor: Angelo José Burla Dias.

The objective of this study was to evaluate the effect of supplementation of zebu heifers with canola, soybean and sunflower oil, about the size of ovarian follicles, the percentage of oocyte retrieval in OPU and the rate of *in vitro* production of embryos. The animals were fed with their respective diets for 70 days. Were used twenty crossbred heifers zebu, randomly divided in four treatments. Weekly were performed ovum pick up of all heifers and COCs were sent to PIV. Results were analyzed and showed a difference ($P < 0.05$) between the group canola and sunflower. Animals supplemented with canola had fewer follicles at the time of ovum pick up. There was no difference in the rate of oocyte retrieval ($P > 0.05$) between the groups. The results showed no difference in the size of the dominant follicle between treatments. The treatments did not affect the cleavage rate, unlike what happened in the blastocyst rate where animals supplemented with soy showed a significant reduction compared to control. It was concluded that supplementation with the oils did not improve the yield of PIV and animals treated with soy oil showed the lowest performance PIV. Since soybean an important component of cattle feed, it becomes important to evaluate further their effects on reproduction bovine.

Index terms: blastocysts, bovine, polyunsaturated fatty acids

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1. INTRODUÇÃO	08
2. OBJETIVOS	10
2.1. OBJETIVO GERAL.....	10
2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	10
3. REVISÃO DE LITERATURA	11
3.1. PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES (PIVE).....	11
3.2. CLASSIFICAÇÃO E NOMENCLATURA DOS ÁCIDOS GRAXOS.....	12
3.2.1. Ácidos graxos essenciais	13
3.3. ÁCIDOS GRAXOS E METABOLISMO RUMINAL.....	14
3.4. ÁCIDOS GRAXOS E REPRODUÇÃO.....	15
3.4.1. Efeito nutricional sobre a dinâmica folicular	19
3.4.2. Efeito nutricional sobre o ovócito	21
3.4.3. Efeito nutricional sobre a atividade luteal	22
3.5. METABOLISMO DAS PROSTAGLANDINAS.....	24
4. MATERIAL E METODOS	26
4.1. LOCAL E DURAÇÃO DO EXPERIMENTO.....	26
4.2. ÁREA EXPERIMENTAL.....	26
4.3. TRATAMENTOS.....	27
4.4. ANIMAIS.....	27
4.5. PERÍODO DE SUPLEMENTAÇÃO.....	27
4.6. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	28
4.7. ASPIRAÇÃO FOLICULAR <i>IN VIVO</i> (<i>ovum pick up</i> -OPU).....	28
4.8. PRODUÇÃO DE EMBRIÕES <i>IN VITRO</i> (PIV).....	29
4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
5. RESULTADOS	31
6. DISCUSSÃO	34

7. CONCLUSÃO.....	37
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, com aproximadamente 209 milhões de cabeças (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, IBGE, 2010), além de ser o maior exportador de carne bovina do mundo. Apesar de possuir um rebanho tão numeroso e uma posição tão expressiva no mercado mundial, a produtividade do rebanho bovino brasileiro ainda é baixa. Dessa forma, é de grande importância para o país aumentar a produtividade de seu rebanho e assim poder garantir a competitividade da carne brasileira no mercado internacional.

Dentre as inúmeras ferramentas disponíveis para assegurar uma maior produtividade da pecuária bovina, as biotecnologias reprodutivas assumem um papel de destaque, já que possibilitam a multiplicação de genótipos superiores. Entre elas, a inseminação artificial, a transferência de embriões e a produção *in vitro* de embriões (PIV) são as de maior destaque. A produção nacional de embriões bovinos produzidos *in vitro* tornou-se uma valiosa tecnologia de reprodução assistida em sistemas de criação de gado bovino. Essa biotecnologia tem-se tornado um método de escolha para a multiplicação comercial de bovinos geneticamente superiores (ADONA, 2002).

Apesar dos inúmeros estudos realizados nos últimos anos, a PIV de embriões bovinos ainda é considerada um processo pouco eficiente. Enquanto a maturação e a fertilização ocorrem aparentemente de modo normal, a proporção de embriões que atinge o estágio de blastocisto raramente é superior a 40% dos ovócitos colocados para maturar *in vitro* (ADONA, 2002).

Por outro lado, fisiologicamente, existem inúmeros fatores que afetam o desempenho reprodutivo de bovinos, e a nutrição talvez seja o que tenha maior impacto nesse processo. Em geral, animais mal nutridos apresentam baixo desempenho reprodutivo. Nos últimos anos, tem sido estabelecido o impacto de vários nutrientes sobre a reprodução das vacas. Lucy et al. (1991) demonstraram que dietas com níveis adequados de vitamina promovem a melhoria na qualidade de embriões bovinos. Outros nutrientes também são de suma importância para um bom

desempenho reprodutivo. Dentre os nutrientes requeridos por vacas em reprodução, a energia é o principal deles, e seu fornecimento inadequado na dieta tem efeitos deletérios sobre a eficiência reprodutiva de fêmeas bovinas (SANTOS, 1998; LAMB, 2003).

Lipídeos na dieta de vacas podem melhorar o desempenho reprodutivo, independentemente de sua contribuição energética, visto que os ácidos graxos podem modificar algumas vias metabólicas específicas e influenciar o metabolismo de alguns hormônios (esteroides e eicosanoides) que modulam os processos metabólicos nos ovários e no útero, além de exercer efeitos diretos na transcrição de genes que codificam proteínas essenciais à reprodução (MATTOS et al., 2000).

A suplementação de energia é bastante utilizada em gado de leite, principalmente pelo seu papel no aumento da densidade energética da dieta. Porém, devido às diferenças na ingestão de matéria seca e no nível de produção de leite, os resultados das pesquisas com gado de leite não são necessariamente aplicáveis aos animais para produção de carne. Além disso, poucos trabalhos avaliaram o efeito dos ácidos graxos na produção e desenvolvimento de embriões produzidos *in vivo*, não havendo ainda um consenso se os ácidos graxos são mais importantes para o embrião em si ou para sua implantação (RYAN et al., 1992).

Os mecanismos pelos quais a suplementação lipídica na dieta de fêmeas bovinas melhora o desempenho reprodutivo parecem envolver, principalmente, o aumento na capacidade funcional do ovário, na concentração de progesterona circulante e na vida útil do corpo lúteo, além de alterar o perfil de ácidos graxos das membranas plasmáticas das células (ARMSTRONG et al., 2002). Dessa forma, a suplementação alimentar de doadoras de ovócitos para PIV com ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) a partir de óleos vegetais pode, além de aumentar o número de folículos e a qualidade ovocitária em novilhas, contribuir para maior quantidade e melhor qualidade dos embriões produzidos *in vitro*.

Como o ambiente de origem dos ovócitos e as condições de maturação podem interferir na quantidade de embriões produzidos, tornam-se necessários estudos mais aprofundados sobre o efeito específico dos ácidos graxos poli-insaturados na reprodução.

2. OBJETIVOS:

2.1.OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da suplementação de novilhas zebuínas com diferentes fontes de ácidos graxos sobre a produção *in vitro* de embriões.

2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- determinar o efeito da suplementação sobre o diâmetro folicular de novilhas F1 (*Bos indicus* x *Bos taurus*);
- avaliar a influência dos tratamentos sobre a taxa de recuperação ovocitária;
- determinar o efeito da suplementação com óleos vegetais sobre a taxa de produção *in vitro* de embriões.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES (PIVE)

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) foi desenvolvida como uma alternativa para a produção de embriões *in vivo* por superovulação, também denominada transferência de embriões convencional (TE). Até o final da década de 90, a PIVE no Brasil era uma atividade basicamente restrita a laboratórios de pesquisa e, portanto, sem expressão comercial. O aprimoramento das condições de cultivo *in vitro* bem como das técnicas de recuperação de ovócitos *in vivo* tornou viável a aplicação da PIVE em escala comercial, sendo importante seu desenvolvimento dentro do atual contexto de incremento da produtividade na pecuária e em pesquisa de novas biotecnologias (GARCIA et al., 2004).

Por ser um processo tecnicamente complexo e com elevado investimento de implantação, pensava-se que a produção de embriões em laboratório seria utilizada apenas por instituições de pesquisas ou por um grupo seletivo de pecuaristas, ocupando apenas nichos específicos de mercado. Entretanto, em um período de apenas 5 anos o país tornou-se o maior produtor mundial e referência no uso de PIVE em bovinos (VIANA et al., 2010)

A PIVE envolve um conjunto sequencial de procedimentos realizados em laboratório. A compreensão de vários fenômenos e mecanismos biológicos que ocorrem desde a maturação dos ovócitos, capacitação espermática, fertilização e início do desenvolvimento embrionário em fase de pré-implantação têm sido fundamental para maximizar a produção de blastocistos, o que atualmente não ultrapassa os 40% em relação ao número de ovócitos viáveis recuperados (Viana et al., 2010).

Vários avanços vêm sendo alcançado nessa técnica, mas a PIVE ainda apresenta algumas limitações, tais como, os baixos índices de blastocistos e a baixa taxa de gestação obtida com embriões criopreservados, o que não ocorre com embriões produzidos *in vivo*. Os embriões produzidos *in vitro* ainda apresentam

diferenças morfológicas e metabólicas daqueles produzidos *in vivo*, geralmente provocadas pelas condições de cultivo *in vivo*. Alguns autores reportam que a maior sensibilidade dos embriões de PIVE ao congelamento esteja relacionada ao conteúdo elevado de lipídios contido nos mesmos (SÁ et al., 2003).

Com objetivo de maximizar o potencial da PIVE, diversas pesquisas vêm sendo realizadas a fim de enumerar os possíveis fatores que, de alguma forma, possam aperfeiçoar essa técnica, bem como, desenvolver metodologias para viabilizá-los. Uma dieta diferenciada para animais incluídos em programas de PIVE pode ser uma alternativa eficiente em vários aspectos. Trabalhos realizados com dietas ricas em ácidos graxos poli-insaturados, por exemplo, demonstraram aumento no diâmetro de folículo pré-ovulatório (BILBY et al., 2006) e aumento no número de folículos médios (THOMAS E WILLIAMS, 1996).

3.2. CLASSIFICAÇÃO E NOMENCLATURA DOS ÁCIDOS GRAXOS

Os ácidos graxos são cadeias carbônicas compostas de C, O e H que contêm um grupo carboxila em uma das extremidades e um grupo metil na extremidade oposta. Essa cadeia carbônica varia de tamanho dependendo do número de carbonos ligados a ela. A cadeia carbônica, quando apresenta menos de 4 carbonos, é classificada como cadeia curta; quando possui de 6 a 12 carbonos, é classificada como cadeia média; e como cadeia longa, aquelas com mais de 14 carbonos. Além do número de carbonos ligados, os lipídios são classificados como saturados, sem duplas ligações, ou insaturados, com presença de dupla entre os átomos de carbono. Os ácidos graxos insaturados podem ser classificados como monoinsaturados, quando possuem apenas uma dupla ligação, ou poli-insaturados, quando têm mais de uma dupla ligação (LEHNINGHER, 1995).

A numeração dos carbonos de uma cadeia carbônica de ácidos graxos se inicia a partir do grupamento carboxila, cujo carbono é considerado o número 1. O carbono número 2 é também denominado como alfa, e o carbono número 3 é denominado beta. O carbono do grupo metil é conhecido como carbono ômega. Nos ácidos graxos insaturados, as famílias são denominadas pela posição da primeira dupla ligação, sendo a contagem iniciada pelo carbono ômega, ou seja, uma cadeia

carbônica com a primeira dupla ligação no carbono de número 3 a partir do carbono ômega é chamada de ômega 3 (SANTOS & GRECO, 2010). A figura 1 mostra alguns tipos de ácidos graxos ômega.

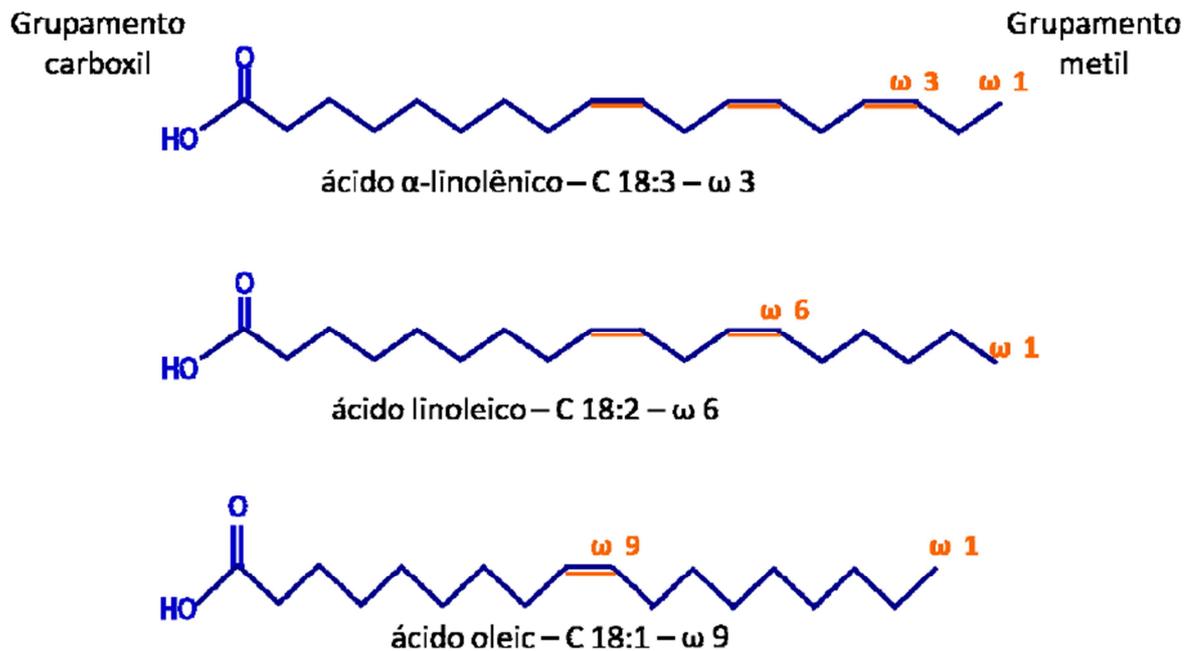


Figura1. Exemplo das três famílias ôegas de ácidos graxos insaturados.

3.2.1. Ácidos Graxos Essenciais

Os ruminantes possuem a capacidade de produzir ácidos graxos a partir de ácidos graxos voláteis produzidos no trato digestivo ou a partir da glicose. Na síntese *de novo* de ácidos graxos, a acetil CoA é convertida em malonil CoA pela enzima acetil CoA carboxilase. A partir desse ponto, a enzima ácido graxo sintase condensa grupamentos de acetil CoA até que o ácido graxo atinja 16 carbonos. Nesse ponto, a enzima elongase adiciona dois carbonos de cada vez, de maneira que a cadeia carbônica possa atingir até 24 carbonos. Enzimas dessaturases adicionam duplas ligações entre os carbonos. Sabe-se que os mamíferos não têm a capacidade de expressar o gene para as enzimas dessaturases, também chamadas de Δ -dessaturases, além do carbono de número 9. Assim, ácidos graxos insaturados com insaturações a partir do carbono 9 não podem ser sintetizados pelos

mamíferos. A única forma de suprir a necessidade desses ácidos graxos é a sua ingestão de forma contínua na dieta, caso isso não ocorra, pode ocorrer deficiência que prejudica o animal. Dessa forma, torna-se indispensável aos ruminantes certos ácidos graxos na composição de sua dieta, assim como outros nutrientes. (SANTOS & GRECO, 2010).

Burr (1930), ao realizar experimentos com ratos e cobaias, foi o primeiro a reportar que mamíferos necessitam consumir certos ácidos graxos. Em seus experimentos, o autor pôde observar que ratos alimentados com dietas com pouca gordura tiveram o desenvolvimento comprometido, apresentaram problemas de saúde e alterações no ciclo reprodutivo. Esses problemas puderam ser resolvidos com a inclusão dos ácidos graxos poli-insaturados, linoleico e linolênico (BURR, 1930). Posteriormente, foi demonstrado que esses ácidos graxos eram fundamentais para a síntese de outros ácidos graxos indispensáveis para o controle celular e dos eicosanoides, substâncias críticas para o estabelecimento de respostas inflamatórias e imunes e para o controle dos processos reprodutivos (BURR, 1930).

3.3. ÁCIDOS GRAXOS E METABOLISMO RUMINAL

Nos bovinos, o rúmen é responsável por algumas transformações nos lipídios da dieta, alterando, com isso, sua composição e o perfil dos ácidos graxos que chegam ao duodeno, devido aos processos de lipólise e bio-hidrogenação. A lipólise é a etapa inicial do metabolismo dos lipídios na flora ruminal, sendo fundamental para a posterior reação de bio-hidrogenação (FRANCO, 2007).

No rúmen os triglicerídeos são hidrolisados pela ação das lipases existentes na microbiota ruminal. O produto final da hidrólise dos lipídios no rúmen são ácidos graxos livres, galactose e glicerol, os quais são metabolizados rapidamente até se tornarem ácidos graxos voláteis. Os ácidos graxos poli-insaturados como o oleico e o linoleico são hidrogenados pelas bactérias presentes no rúmen, produzindo inicialmente o ácido esteárico, o qual é um ácido graxo saturado. No entanto, as membranas das células animais necessitam de ácidos graxos insaturados para manter sua estrutura, fluidez e função (BONDI, 1988).

Menos de 10% dos ácidos graxos poli-insaturados escapam da bio-hidrogenação ruminal, chegando ao duodeno, basicamente, pequenas quantidades de ácidos graxos poli-insaturados, ácidos graxos saturados, e lipídios microbianos. Essa pequena quantidade de ácidos graxos poli-insaturados que passa pelo rúmen parece ser suficiente para atender às exigências dos ruminantes, pois os mesmos parecem não apresentar deficiências desses ácidos graxos (CAVALIERI et al., 2005).

A bio-hidrogenação de ácidos graxos livres depende do tipo de ácido graxo, sendo que os poli-insaturados são mais susceptíveis que os monoinsaturados. É um processo de ocorrência intracelular que envolve várias enzimas microbianas, dentre elas, as isomerases e as redutases. As isomerases atuam na cadeia carbônica dos ácidos graxos livres, o que resulta na formação de ácidos graxos com a configuração *trans*. As redutases adicionam hidrogênio nos carbonos da dupla ligação, resultando na saturação da cadeia carbônica.

Segundo Oliveira et al. (2004), para reduzir a bio-hidrogenação e, conseqüentemente, aumentar a disponibilidade de ácidos graxos poli-insaturados que chegam ao intestino delgado, é de grande importância fornecer dietas ricas com grandes concentrações destes ácidos, mas também, dietas que possam elevar o pH do rúmen.

Os ácidos graxos poli-insaturados podem ser oferecidos na dieta com o uso de sementes de oleaginosas como soja, canola e girassol. Essas sementes são bastante interessantes pelas altas concentrações de lipídios e por apresentarem taxa de liberação desejáveis de óleo, que ocorre quando o animal tritura o alimento pela mastigação (COPPOCK & WILKS, 1991).

3.4. ÁCIDOS GRAXOS E REPRODUÇÃO

Com o aumento na produtividade dos rebanhos, tem sido relatado um acréscimo na demanda por nutrientes pelos animais, tanto para a produção de leite quanto para a de carne. Esse exacerbado aumento nos requerimentos nutricionais pode levar a alterações nas funções reprodutivas, se o animal não tiver um aumento compensatório na ingestão de nutrientes. Dentre os nutrientes exigidos na

composição da alimentação dos ruminantes, a energia é um dos nutrientes que mais afeta a reprodução em fêmeas bovinas, e sua deficiência na alimentação animal está correlacionada com o desempenho reprodutivo insatisfatório, aumento no intervalo da primeira ovulação, atraso na puberdade e uma baixa taxa de concepção e de prenhez (LAMB, 2003; SANTOS, 2005). Algumas estratégias para o incremento energético na dieta de ruminantes incluem a adição de gorduras na ração.

Coppock e Wilks (1991) sugerem que a inclusão de ácidos graxos na dieta de vacas, geralmente, melhora a fertilidade, cujas respostas são observadas independentemente do incremento energético da dieta. Sugerem ainda que as respostas sobre a fertilidade são alteradas conforme o tipo de ácidos graxos presente na dieta, sendo que os poli-insaturados tendem a apresentar maior benefício.

Apesar dos benefícios dessa prática relacionados ao incremento energético, vários mecanismos do sistema reprodutivo podem ser modificados com o aumento da ingestão de ácidos graxos, como por exemplo, o efeito sobre o eixo hipófise – ovário – útero (MATTOS et al., 2000). Willians & Stanko (2000) demonstraram efeitos relacionados à modulação do metabolismo do ácido araquidônico e das prostaglandinas, aumento nos níveis circulantes de IGF-I, e produção de colesterol, progesteronas e hormônios esteroides. Em sincronia, estes efeitos proporcionam uma melhoria da fertilidade.

Tem sido proposto que a suplementação da dieta com ácidos graxos pode melhorar a fertilidade de bovinos por influenciar o crescimento folicular e a ovulação (LUCY et al., 1993), devido às ações sobre o hipotálamo e hipófise, incluindo efeitos sobre liberação de GnRH, na síntese e liberação de FSH, LH e hormônio de crescimento (GH), além de tais ácidos promoverem também alterações no metabolismo dos esteroides (WEBB et al., 2004).

Alguns estudos têm mostrado que o diâmetro do folículo dominante é maior em vacas alimentadas com dietas ricas em ácidos graxos poli-insaturados quando comparado com o das vacas alimentadas com fontes ricas em monoinsaturados, (STAPLES et al., 2000; BILBY et al., 2006). Santos et al. (2008) relataram um aumento de 3,2 mm no diâmetro médio do folículo dominante de vacas suplementadas com gordura, representando um aumento de 23%, gerando, por consequência, um corpo lúteo de maior tamanho, incrementando a concentração de progesterona na fase lútea, a modificação na síntese de prostaglandinas e a melhor

qualidade de ovócitos e embriões. Estas respostas dependem do tipo de ácido graxo suplementado, sendo os da família Ômega 3 e Ômega 6 os que têm apresentado melhores resultados.

Outras ações dos ácidos graxos sobre a fertilidade incluem modificações no nível da estrutura celular. Os ácidos graxos poli-insaturados são de suma importância para a composição celular, fazendo parte das membranas celulares. A quantidade e o tipo de ácidos graxos nas membranas modificam a composição das mesmas. O conteúdo de ácidos graxos nos blastômeros exerce uma influência sobre o desenvolvimento embrionário, a qualidade dos embriões e, conseqüentemente, a taxa de prenhez (ZERON, 2002; BILBY et al., 2006).

Muitas pesquisas continuam sendo realizadas em busca de um melhor entendimento dos efeitos dos ácidos graxos sobre a reprodução animal, visto que existem ainda vários questionamentos sobre a utilização das gorduras na alimentação de ruminantes. Quantidades elevadas de gordura na dieta de ruminantes podem diminuir o consumo de alimentos, o que poderia gerar uma diminuição no consumo de energia total (BERCHIELLI et al., 2006).

Nos ruminantes, especialmente nos bovinos, a dieta não deve apresentar grandes concentrações de ácidos graxos, porque haveria possibilidade de ocorrer distúrbios na digestão dos carboidratos, além do efeito tóxico sobre os microrganismos do rúmen. Sais de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa são boas fontes de gordura que permitem aumentar a densidade energética da dieta sem deprimir a função microbiana ruminal. Podem ainda evitar a hidrogenação ruminal dos ácidos graxos insaturados, principalmente o ácido linoleico (18:2) e linolênico (18:3) (BERCHIELLI et al., 2006). A inclusão de sebo animal, ácidos graxos saturados de sais de cálcio e óleo de peixe tem sido mostrada ter menor efeito no crescimento folicular que aquele causado por óleos de origem vegetal (SANTOS, 2005).

A dieta dos ruminantes pode ser enriquecida com ácidos graxos mediante o fornecimento de sementes de oleaginosas, como soja, girassol e canola. Essas sementes são bastante utilizadas pelas altas concentrações de lipídios e por apresentarem características desejáveis quanto à taxa de liberação do óleo, que ocorre à medida que o animal consome o alimento por meio da mastigação, chegando em pequenas frações ao rúmen (COPPOCK e WILKS, 1991).

A canola (*Brassica napus* L. var *oleifera*) é uma oleaginosa que foi desenvolvida por melhoramento genético convencional da colza, grão que apresentava teores elevados de ácido erúxico e de glicosinolatos (TOMM, 2006). A canola difere da colza por apresentar uma porcentagem inferior a 2% em ácido erúxico, do total de ácidos graxos, e menos que 3 mg/g de matéria seca em glicosinolatos (BETT et al., 1999).

A partir da canola, é produzido um óleo vegetal utilizado principalmente na alimentação humana, cuja constituição está apresentada na tabela 1. A suplementação da dieta de vacas com grãos de canola não afetou a resposta superovulatória, a produção e a qualidade dos embriões (ALBUQUERQUE, 2007). No entanto, são escassas as pesquisas que avaliam o efeito da suplementação da dieta de bovinos com óleo de canola sobre a reprodução.

Outra fonte de suplementação nutricional muito utilizada em bovinos é a soja, que possui 40% de proteínas, 20% de lipídios (óleo), 5% de minerais e 34% de carboidratos (açúcares como glicose, frutose e sacarose, fibras e os oligossacarídeos como rafinose e estaquiose). O óleo de soja comercial tem uma composição média centrada em cinco ácidos graxos principais: palmítico (15:0), esteárico (18:0), oleico (18:1), linoleico (18:2) e linolênico (18:3) (tabela 1). Estes ácidos graxos, cuja proporção relativa é mantida constante, após a reação de transesterificação, compõem mais de 95% do teor de ácidos graxos do óleo, sendo tal característica relativamente constante para a grande maioria dos óleos comerciais disponíveis no mercado (LOPES et al., 2004).

Assim como os óleos vegetais citados anteriormente, o de girassol é essencialmente constituído por triacilgliceróis (98 a 99%). Tem um elevado teor em ácidos insaturados (cerca de 80%), mas um reduzido teor em ácido linolênico ($\leq 0,2\%$) (Quadro 1). O óleo de girassol é essencialmente rico no ácido linoleico, porém apresenta muita variação no teor desse ácido graxo devido à variedade utilizada e às diferenças climáticas durante o seu cultivo (LOPES et al., 2004).

Quadro 1: Composição e estrutura de ácidos graxos presentes nos óleos vegetais

ÁCIDOS GRAXOS	ESTRUTURA	Valores de referencia (%)		
		Canola	Soja	Girassol
Ácido Mirístico	C14:0	< 0,2	< 0,5	< 0,5
Ácido Palmítico	C16:0	2,5 - 6,5	7,0 - 14,0	3,0 - 10,0
Ácido Palmitoleico	C16:1	< 0,6	< 0,5	< 1,0
Ácido Esteárico	C18:0	0,8 - 3,0	1,4 - 5,5	1,0 - 10,0
Ácido Oleico (Ômega 9)	C18:1	53,0 - 70,0	19,0 - 30,0	14,0 - 35,0
Ácido Linoleico (Ômega 6)	C18:2	15,0 - 30,0	44,0 - 62,0	55,0 - 75,0
Ácido Linolênico (Ômega 3)	C18:3	5,0 - 13,0	4,0 - 11,0	< 0,3
Ácido Araquídico	C20:0	0,1 - 1,2	< 1,0	< 1,5
Ácido Eicosenoico	C20:1	0,1 - 4,3	< 1,0	< 0,5
Ácido Behênico	C22:0	< 0,6	< 0,5	< 1,0

(Adaptado de Campestre, 2011)

3.4.1. Efeito nutricional sobre a dinâmica folicular

O desenvolvimento folicular durante o ciclo estral ocorre com uma sequência dinâmica de eventos fisiológicos que envolvem o desenvolvimento e a atresia de folículos antrais que se assemelham a ondas (PIERSON & GINTHER, 1984).

Os folículos primordiais podem desenvolver-se ao ponto de atingir a ovulação ou se tornarem atrésicos, não vindo a ovular por diversos motivos. Porém, não são totalmente conhecidos os mecanismos que controlam o início e o número de folículos primordiais que começam a crescer (WEBB et al., 2004). Alguns pesquisadores confirmaram que são necessários alguns meses para um folículo primordial alcançar o estágio pré-ovulatório. Apesar de o crescimento folicular ser controlado principalmente por fatores de crescimento produzidos localmente, e por gonadotrofinas, vários fatores ambientais e nutricionais podem influenciar o desenvolvimento folicular, a qualidade do ovócito e, conseqüentemente, a fertilidade (GARNSWORTHY & WEBB, 1999; WEBB et al., 2003).

Com o objetivo de melhorar o aporte energético aos animais, tem sido proposta a utilização de gorduras, tais como, sebo animal, sais de cálcio de ácidos graxos saturados e óleo de peixe (WILLIAMS, 2001). Segundo Lucy et al. (1991), um

aumento do consumo de gordura na dieta pelos bovinos causa alteração na dinâmica do crescimento folicular por meio do aumento no número de folículos pequenos (menor que 5 mm) e grandes (maior que 10 mm). Entretanto, a adição de gorduras saturadas, tais como, sebo animal, sais de cálcio de ácidos graxos saturados ou óleo de peixe (gorduras saturadas), na dieta dos bovinos, apresenta efeito de menor intensidade no desenvolvimento folicular do que a adição de óleos vegetais (gorduras poli-insaturadas) (WILLIAMS, 2001).

De acordo com Santos (1998), uma maior quantidade de folículos menores pode gerar um maior número de estruturas disponíveis para desenvolvimento posterior; e um aumento no número de folículos grandes sugere uma alteração na seleção folicular e maior disponibilidade de estruturas capazes de chegar à ovulação. Em ovelhas suplementadas com sabões cálcicos de ácidos graxos poli-insaturados, houve um aumento no número e na qualidade dos ovócitos, fato relacionado com o aumento no número e tamanho dos folículos (ZERON et al., 2002). As respostas máximas do crescimento folicular à suplementação de óleo vegetal foram observadas com administração equivalente de 4 a 6% da matéria seca na dieta, tendo sido registrados aumentos menores, no caso da adição de níveis mais baixos de gordura (WILLIAMS, 2001).

Alguns autores testaram dietas suplementadas com gordura saturada animal, ácidos graxos poli-insaturados e ácidos graxos altamente poli-insaturados, e demonstraram que o grupo que recebeu ácidos graxos poli-insaturados apresentou quatro vezes mais folículos médios do que os do grupo controle, enquanto os demais grupos não apresentaram diferença significativa (THOMAS et al., 1997).

Ryan et al. (1992) avaliaram o número de folículos responsivos ao tratamento superovulatório, o número e a qualidade de embriões produzidos, fornecendo dietas com e sem suplementação de óleo de soja. Os autores observaram que as novilhas que receberam a suplementação apresentaram maior número de folículos médios, maiores concentrações de colesterol total e de progesterona do líquido folicular.

A suplementação de ruminantes com gordura poli-insaturada altera a população de microrganismos ruminais, afetando a produção e a proporção dos ácidos graxos voláteis produzidos no rúmen, o que favorece uma maior produção de ácido propiônico (NUSSIO et al., 2006). Após a absorção pela parede ruminal, o ácido propiônico é conduzido ao fígado e metabolizado até se transformar em glicose por meio da gliconeogênese, que gera um aumento no nível de glicose

circulante (LEURY et al., 1990) e, por consequência, no nível de insulina sanguínea (GUTIÉRREZ et al., 1997).

Os ganhos no recrutamento folicular podem ser mediados por alterações nas concentrações sanguíneas de insulina, glicose, GH (hormônio do crescimento) e IGF-I (fator de crescimento semelhante à insulina), os quais são importantes mediadores entre a nutrição e a reprodução animal (GUTIÉRREZ et al., 1997).

De acordo com Spicer & Echterkamp (1995), existe uma correlação direta entre a ação da insulina e do IGF-I com relação aos efeitos mitogênico e esteroidogênico das células da granulosa. Segundo Weeb & Armstrong (1998), o GH, IGF-I e insulina podem regular a foliculogênese, aumentando o *pool* de folículos responsivos ou dependentes de gonadotropinas hipofisárias ou, de alguma forma, diminuir o mecanismo de atresia folicular (DOWING et al., 1991). Moniaux et al. (1997) também afirmaram que o IGF-I atua como um amplificador dos receptores de FSH nas células da granulosa, potencializando a ação desse hormônio.

3.4.2. Efeito nutricional sobre o ovócito

Vacas leiteiras de alta produção em início de lactação apresentam um déficit energético, fato este que pode comprometer o desenvolvimento do ovócito que iria estabelecer a próxima gestação. No interior folicular, o ovócito se desenvolve em um ambiente bioquímico variável, que reflete as mudanças causadas pela nutrição, nas concentrações séricas de metabólitos que indicam o status energético, proteico e mineral (LEROY et al., 2004). Vacas que perdem a condição corporal no início da lactação e aquelas com altas concentrações hepáticas de triglicerol, que são indicativos de mobilização excessiva de gordura, produzem ovócitos de pior qualidade, sendo este fato observado pela redução no número de blastocisto produzido *in vitro* (ALMEIDA et al., 2011).

Segundo Jorritsma et al. (2004), animais com subnutrição apresentam altas concentrações de ácidos graxos não-esterificados (AGNEs), demonstrando *in vitro* baixa proliferação de células da granulosa, o que retarda a maturação do ovócito e prejudica a produção de blastocistos. Dessa forma, a qualidade ovocitária está

diretamente ligada aos fatores nutricionais, o que pode contribuir para a o baixo rendimento reprodutivo de vacas leiteiras de alta produção (ALMEIDA et al., 2011).

O aumento da concentração sanguínea de progesterona, hormônio fundamental na manutenção da gestação, é um dos principais mecanismos, pelos quais a inclusão de gordura na dieta influencia as variáveis reprodutivas. Aswhort (1995) relataram que a concentração circulante de progesterona modifica a quantidade e a composição dos polipeptídeos secretados pelo endométrio, muitos dos quais são responsáveis pelo desenvolvimento do embrião, e também se relaciona diretamente com a qualidade do ovócito. Dietas hiperlipidêmicas alterariam o nível do principal substrato da esteroidogênese ovariana, o colesterol. O aumento do nível de colesterol no plasma e sua liberação para o tecido ovariano elevam a concentração de colesterol no fluido folicular e no corpo lúteo (STAPLES et al., 1998).

3.4.3. Efeito nutricional sobre a atividade luteal

Segundo Armstrong et al. (2002), o colesterol é um precursor da síntese luteínica de progesterona em muitas espécies, e dietas lipídicas poderiam alterar a esteroidogênese ovariana. Essas dietas afetariam o nível do principal substrato, aumentando o nível de colesterol no plasma e a liberação para o tecido ovariano, fato que aumenta a concentração de colesterol no fluido folicular e no corpo lúteo (CL) (STAPLES et al., 1998).

Diversos trabalhos reportam que a suplementação com lipídeos aumenta o tamanho do folículo pré-ovulatório e, conseqüentemente, promovem um aumento no volume do corpo lúteo. Trabalho realizado com 54 vacas lactantes comparou quatro diferentes fontes de ácidos graxos. As vacas suplementadas com fontes de ácidos graxos Ômega-3 e Ômega-6 apresentaram diâmetro folicular pré-ovulatório maior, e maior volume luteal, comparado ao encontrado em vacas suplementadas com fontes de ácidos graxos monoinsaturados (16.8, 16.2 vs. 15.0, 14.9 ± 0.7 mm; 7,323, 8,208 vs. 6,033, 5,495 ± 644 mm³, respectivamente (BILBY et al., 2006).

Alguns trabalhos reportam que a gordura na dieta pode melhorar a taxa de gestação por reduzir o número de corpos lúteos subfuncionais, aumentando, assim,

o período de vida dos CL funcionais nas fêmeas bovinas. Esse fato pode estar relacionado ao aumento numérico das células da teca e da granulosa ocorrido antes da ovulação, o que levaria ao aumento da capacidade esteroidogênica (EZZO & HEGAZY, 1999).

Em novilhas que receberam suplementação lipídica, foram encontrados maiores níveis de progesterona no soro em relação ao grupo-controle (MANCIO et al., 1999). Outros autores relatam que aumentos nas concentrações plasmáticas de progesterona em vacas alimentadas com gordura não são devido ao aumento da sua síntese, mas sim a uma menor taxa de metabolização. Esta explicação poderia ser aplicada pelos resultados encontrados por Lammoglia et al. (1997), que, trabalhando com vacas Brahman, encontraram maiores níveis de progesterona no plasma, sem efeitos sobre o número ou o tamanho dos corpos lúteos (HAWKINS et al., 1995).

Hightshoe et al. (1991) encontraram resultados semelhantes, e pode-se observar que a suplementação de gordura para vacas durante o pós-parto aumentou a concentração sérica de progesterona após a primeira ovulação. Os autores observaram ainda que 67% das fêmeas suplementadas apresentaram, após a primeira ovulação pós-parto, uma fase luteínica normal (aproximadamente 17,8 dias), comparada aos 33% de fase luteínica normal encontrada no grupo-controle (fase luteínica mais curta - aproximadamente 10,5 dias). Achado similar foi reportado por Williams (1989). Também nesta mesma linha, Wehrman et al. (1991) reportaram um aumento de 18% na taxa de vacas com atividade luteínica no pós-parto, quando suplementadas com gorduras por 30 dias.

Além do fenômeno citado anteriormente, a diminuição na concentração de estradiol circulante nas fêmeas suplementadas poderia explicar a habilidade do corpo lúteo formado em resistir à regressão prematura (HIGHTSHOE et al., 1991).

Sklan et al. (1991) não encontraram efeito da suplementação com ácidos graxos sobre a recuperação da atividade ovariana pós-parto, no entanto, puderam observar melhorias na taxa de concepção no segundo serviço e uma redução no intervalo parto-prenhez. Ezzo & Hegazy (1999) também constataram aumento na taxa de gestação em novilhas suplementadas com gordura, atribuindo tal fato ao aumento da esteroidogênese luteal; o que também foi registrado por Grummer & Carroll (1991) em vacas de leite suplementadas.

3.5. METABOLISMO DAS PROSTAGLANDINAS

Os ácidos graxos também podem afetar os índices reprodutivos por mecanismos relacionados com a síntese e metabolismo de prostaglandina (WILLIANS & STANKO, 2000). As prostaglandinas são compostos bioativos derivados de ácidos graxos de 20 carbonos. Os ácidos graxos de cadeia longa eicosapentaenoico, docohexaenoico e seu precursor, o ácido linolênico, presentes na canola e na linhaça, são precursores de prostaglandina da série 3. Entretanto, podem inibir a síntese de prostaglandinas da série 2, que são luteolíticas. As prostaglandinas da série 2 são importantes reguladores do parto e, em algumas espécies, apresentam efeitos luteolíticos, dando início a um novo ciclo estral. Para que o estabelecimento da prenhez aconteça, são requeridos sinais enviados pelo embrião à vaca, sinais que impedem a produção de prostaglandina no endométrio e que evitam a lise do corpo lúteo, mantendo níveis de progesterona adequados para o estabelecimento da prenhez e correto desenvolvimento do embrião (MATTOS et al., 2000).

O aumento na taxa de prenhez em vacas suplementadas com fontes de ácidos graxos parece estar relacionado com a inibição na produção de prostaglandina $F_{2\alpha}$ e a consequente permanência do corpo lúteo (MATTOS et al., 2000; CHENG, 2003; TATCHER et al., 2006). Dessa maneira, a inibição da síntese de prostaglandina, pela adição de ácidos graxos poli-insaturados, com altas quantidades de ômega-3, pode auxiliar a sobrevivência embrionária e diminuir a mortalidade embrionária precoce (MATTOS et al., 2000).

A diminuição da prostaglandina $F_{2\alpha}$, quando os ácidos graxos são suplementados na dieta de vacas de cria, ocorre devido à diminuição da circulação de precursores do ácido araquidônico, ao aumento na quantidade de ácidos graxos que competem com ácido araquidônico pelo processamento via prostaglandina H sintetase e, finalmente, à ação inibidora dos ácidos graxos sobre a ação da prostaglandina H (MATTOS et al., 2000). O ácido linoleico, geralmente, compete com o ácido araquidônico e com a ciclooxigenase, cujos efeitos inibitórios têm sido demonstrados *in vivo* e *in vitro*. Assim, tem sido indagado acerca das mudanças na síntese de prostaglandina que poderiam explicar como a suplementação com gordura aumenta a função luteal e as taxas de gestação (STAPLES et al., 1998).

Os ácidos graxos também são inibidores da cicloxigenase, suprimindo a secreção de prostaglandina $F_{2\alpha}$ pelo tecido endometrial, prevenindo potencialmente a morte embrionária precoce (LOPEZ, 2002).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. LOCAL E DURAÇÃO DO EXPERIMENTO

O experimento foi realizado na Fazenda Passarinho no distrito de Carvão, do Município de Campos dos Goytacazes, na região Norte Fluminense do Estado do Rio de Janeiro. O período experimental iniciou-se no dia 03/12/2010, data em que foi iniciada a suplementação, e terminou no dia 23/02/2011, com a realização da última aspiração folicular e produção *in vitro*. As médias das temperaturas máxima e mínima foram de 31,8°C e 23,3°C, respectivamente e o índice pluviométrico foi de 86,8 mm no período.

As atividades laboratoriais foram realizadas no Setor de Tecnologia de Embriões, do Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal (LRMGA), da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF).

4.2. ÁREA EXPERIMENTAL

Os animais foram mantidos em pastagens de braquiário (*Brachiaria Brizantha*) com água e sal mineral à vontade. O curral de manejo foi dividido em quatro partes. Cada divisão tinha cochos onde foi fornecido o concentrado.

4.3. TRATAMENTOS

Os tratamentos avaliados consistiram no fornecimento de suplementos isoproteicos e isoenergéticos, de acordo com a recomendação do NRC (1996), formulados com a inclusão de uma fonte de ácidos graxos poli-insaturados (óleo de canola – Tcan; óleo de soja – Tsoj; e óleo de girassol – Tgir). Animais do grupo-

controle (Tcon) receberam dieta isoproteica e isoenergética em relação às demais dietas experimentais, porém sem adição de óleos vegetais.

4.4. ANIMAIS

Foram utilizadas 20 novilhas (F1) *Bos indicus* x *Bos taurus*, de 24 meses de idade, peso médio de 330 Kg e condição corporal superior a 3 (escala de 1 a 5). Todas as novilhas foram previamente avaliadas quanto a sua ciclicidade, normalidade do aparelho reprodutivo e ausência de patologias, mediante avaliação ultrassonográfica transretal (DPS 2200 Mindray).

As novilhas foram distribuídas aleatoriamente entre os quatro tratamentos, de forma a alocar cinco animais por grupo.

Todos os animais permaneceram juntos no mesmo pasto e, diariamente, às 7 h da manhã, eram conduzidos ao curral de manejo. No centro do curral, os animais eram separados, de acordo com o grupo, e então era fornecido o concentrado experimental.

4.5. PERÍODO DE SUPLEMENTAÇÃO

O período de suplementação com o concentrado experimental foi de 70 dias, que correspondeu a 40 dias de alimentação inicial (período de adaptação) e 30 dias de aspirações foliculares semanais (período experimental). Para a preparação dos concentrados, foram utilizados fubá de milho, farelo de soja e farelo de trigo, acrescidos de diferentes fontes de ácidos graxos poli-insaturados, dependendo do tratamento proposto. O grupo-controle recebeu apenas o concentrado sem adição de óleos vegetais (Tabela 1). A cada animal, foram fornecidos 4,5 Kg de concentrado diariamente no período da manhã.

Tabela 1. Composição percentual dos ingredientes dos concentrados experimentais (% / base matéria seca) (TR = tratamento)

Alimentos (%)	Tr.Controle	Tr. Canola	Tr. soja	Tr. girassol
Fubá de milho	0,698	0,155	0,155	0,155
Farelo de soja	0,302	0,230	0,230	0,230
Farelo de trigo	-	0,540	0,540	0,540
Óleo vegetal	-	0,075	0,075	0,075
Total	1,000	1,000	1,000	1,000

4.6. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com o número de tratamentos conforme a repetição (quatro sessões de aspiração folicular) com intervalo de 7 dias. As características estudadas foram: taxa de recuperação ovocitária, número de ovócitos viáveis (NOV), taxa de clivagem (TCL) e taxa de blastocisto (TBL).

4.7. ASPIRAÇÃO FOLICULAR *IN VIVO* (OVUM PICK UP - OPU)

O procedimento de aspiração folicular foi realizado utilizando-se um equipamento de ultrassom (DPS 2200, Mindray®) com transdutor microconvexo de 7,5 MHz, acoplado à guia de biópsia, a qual estava acoplada a uma agulha 20 G (WTA®), na sua extremidade anterior, e à linha de aspiração (WTA®) na sua extremidade posterior. A linha de aspiração estava ligada a um tubo cônico de centrífuga de 50 mL, no qual era mantida uma pressão de vácuo entre 50 e 70 mmHg, por uma bomba de vácuo (BV-003, WTA®).

Para evitar movimentos peristálticos e desconforto ao animal, foi feita anestesia epidural com 3,0 mL de lidocaína a 2% (Pearson®). Em seguida, o transdutor era inserido até o fundo vaginal e, com o auxílio da manipulação transretal, os ovários eram posicionados para obtenção de uma boa visualização na

tela do ultrassom. Os folículos a serem aspirados foram posicionados no percurso da linha de punção indicada na tela do ultrassom e, quando a agulha se aproximava do folículo a ser aspirado, este era perfurado para que o ovócito pudesse ser aspirado junto ao fluido folicular. O mesmo procedimento foi repetido em todos os folículos visíveis de cada ovário. A lavagem da agulha e o meio de recebimento dos ovócitos foi composto de solução salina (NaCl 0,9%, Fresenius[®]) acrescida de 10,0 UI/mL de heparina sódica (Liquemine[®]) e 10% de soro fetal bovino (Nutricell[®]).

Os ovócitos recuperados de cada animal foram quantificados e classificados como viáveis ou inviáveis, sendo os viáveis aqueles com presença de mais de três camadas de células do *cumulus* e ooplasma homogêneo (VIANA et al., 2004). Em seguida, os ovócitos das cinco novilhas de cada grupo foram agrupados e transportados em criotubos contendo meio MIV-T (Nutricell[®]), recoberto com óleo mineral, até o laboratório do Setor de Tecnologia de Embriões da UENF.

4.8. PRODUÇÃO DE EMBRIÕES *IN VITRO* (PIV)

No laboratório, os complexos *cumulus oophorus* (COCs) selecionados foram lavados em meio de manipulação e, em seguida, transferidos para o meio de maturação comercial (Nutricell[®]), em gotas de 100 µL, sob óleo mineral em placa estéril, e colocados na incubadora a 38,5°C, com 5% de CO₂, em ar atmosférico e 95% de umidade, por 22 horas.

A fecundação *in vitro* (FIV) foi realizada com sêmen congelado de touro da raça nelore. Para a seleção dos espermatozoides viáveis, utilizou-se a técnica do Percoll. Em um tubo tipo Falcon[®], foram colocados 1000 µL de Percoll 90% e, acima desse, formando outra camada, 1000 µL de Percoll 45%. Após acrescentar o sêmen, o tubo foi centrifugado a 600 x g, por 9 minutos. O sobrenadante foi retirado e o precipitado ressuspenso em 4,0 mL de meio de capacitação comercial (Nutricell[®]). Foi realizada uma segunda centrifugação com 200 x g, por 3 minutos, sendo o sobrenadante novamente descartado.

Os COCs maturados foram lavados em meio de fecundação comercial (Nutricell[®]) e transferidos para gotas de fecundação de 100 µL com o sêmen diluído, com concentração ajustada de forma a se obter dose fecundante de 2×10^6

espermatozoides/mL. A FIV foi então realizada por 18 horas em incubadora de CO₂, nas mesmas condições de maturação.

Após a incubação com os espermatozoides, os ovócitos foram desnudados parcialmente, lavados em meio SOF comercial, (Nutricell[®]), e então cultivados por 8 dias em gotas de 100 µL desse meio, em incubadora de CO₂ a 38,5°C, com 5% de CO₂, em ar atmosférico e 95% de umidade. Decorridas 72 horas, foi avaliada a taxa de clivagem e renovado 50% do meio de cultivo em cada gota. Duas outras avaliações, nos dias 7 e 8 de cultivo, foram feitas para determinar o número total de blastocistos produzido.

4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados utilizando-se o programa estatístico SAEG (UFV, 2007). Para testar a normalidade das amostras, foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk. Os dados apresentaram distribuição normal e foi feita análise de variância, e as médias que diferiram foram comparadas, utilizando-se o teste de Tukey. Em todas as análises, foi utilizado um nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS

Os tratamentos não diferiram do controle em relação ao número de folículos, número de ovócitos obtidos nas sessões de OPU e na taxa de recuperação ovocitária. No entanto, foi observada uma diferença significativa ($P < 0,05$) entre os animais suplementados com canola e girassol em relação ao número de folículos ovarianos e ao número de ovócitos (Tabela 2).

Tabela 2: Médias \pm desvio-padrão do número de folículos, de ovócitos recuperados, e a taxa de recuperação dos ovócitos obtidos de novilhas suplementadas com diferentes fontes de ácidos graxos.

TRATAMENTO	Número de folículos	Número de ovócitos	Taxa de recuperação
	Média \pm DP	Média \pm DP	% \pm DP
Controle	14,76 ^{ab} \pm 7,50	11,24 ^{ab} \pm 8,74	69,65 ^a \pm 27,75
Canola	10,32 ^b \pm 4,75	8,08 ^b \pm 4,65	74,96 ^a \pm 29,43
Soja	14,44 ^{ab} \pm 5,43	12,60 ^{ab} \pm 6,37	86,43 ^a \pm 24,27
Girassol	17,12 ^a \pm 7,55	15,44 ^a \pm 9,81	84,65 ^a \pm 28,43

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ao nível de 5%, pelo teste de Tukey.

Também não foram detectadas diferenças estatísticas entre os tratamentos ($P > 0,05$) quanto ao diâmetro do folículo dominante no dia da aspiração (Tabela 3).

TABELA 3: Valores médios \pm desvio-padrão do diâmetro de folículos dominantes de novilhas suplementadas com óleos vegetais.

TRATAMENTO	Diâmetro folicular (mm)
Controle	12,13 ^a \pm 1,92
Canola	13,66 ^a \pm 1,16
Soja	10,95 ^a \pm 1,25
Girassol	12,19 ^a \pm 0,78

Os resultados referentes à taxa de clivagem e de blastocistos D7 estão apresentados na tabela 4. Não foi observada diferença significativa entre os tratamentos quanto à clivagem ($P > 0,05$). No entanto, a taxa de blastocistos dos animais suplementados com óleo de soja foi significativamente menor ($P < 0,05$) em relação ao grupo-controle.

TABELA 4: Taxa de clivagem e produção de embriões em D7 \pm desvio-padrão para cada tratamento.

TRATAMENTO	Clivagem (72h)%	Blastocistos D7 (196h) %
Controle	69 ^a \pm 19,2	38 ^a \pm 1,1
Canola	76 ^a \pm 11,6	28 ^{ab} \pm 1,2
Soja	77 ^a \pm 12,5	14 ^b \pm 0,3
Girassol	73 ^a \pm 7,8	22 ^{ab} \pm 0,9

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ao nível de 5%, pelo teste de Tukey.

As taxas de recuperação ovocitária com relação ao tempo do período experimental (semanas S1, S2, S3, S4 e S5) foram 80, 86, 88, 64 e 82%, respectivamente. A taxa de recuperação de S4 foi semelhante à de S1 ($p > 0,05$) e diferente das demais ($P < 0,05$). A média \pm desvio-padrão do número de ovócitos obtidos por animal em S1, S2, S3, S4 e S5 foi 12,9 \pm 8,7; 13,2 \pm 9,0; 13,4 \pm 7,9; 9,6 \pm 6,4; 10,7 \pm 7,5, respectivamente, não havendo diferença significativa entre as 5 semanas ($P > 0,05$) (Figura 2).

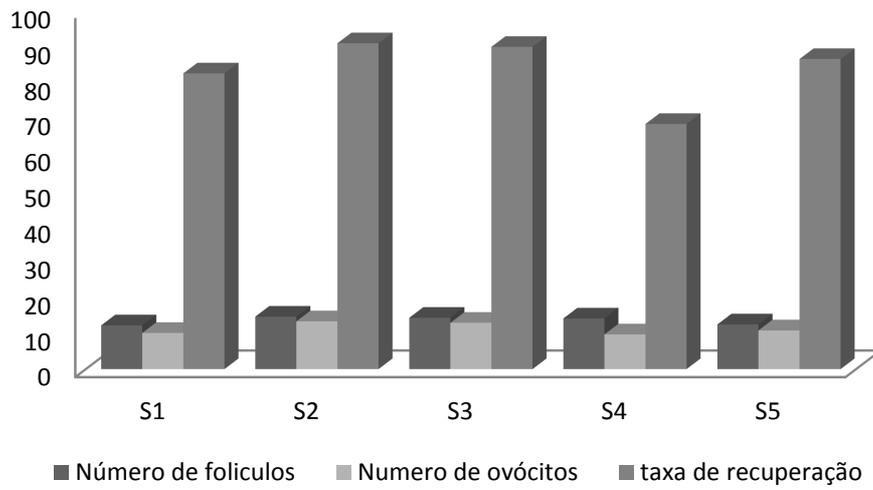


Figura 2: Valores médios do número total de folículos, de ovócitos e taxa de recuperação obtida nas sucessivas sessões semanais de OPU de novilhas mestiças zebuínas.

6. DISCUSSÃO

A produção de ovócitos tem grande variação individual, sendo que, mesmo dentro de uma mesma raça existem animais que produzem maior e menor quantidade. No entanto, notadamente existem raças que apresentam uma maior produção de ovócitos, como por exemplo, a raça Nelore (PONTES et al., 2011). No presente estudo, foram utilizadas novilhas *Bos taurus* x *Bos indicus* que apresentaram, no grupo-controle, número de folículos e número de ovócitos recuperados, bem como a taxa de recuperação compatíveis com o descrito na literatura atual na raça Gir (VIANA et al., 2010) e a quantidade superior à raça Holandesa (PONTER et al., 2012).

Nas últimas décadas tem se estudado a influência de dietas com alta e baixa energia na reprodução da fêmea bovina. Cavalieri et al. (2005) relataram que o aumento de gordura na dieta de vacas aumentou o número de folículos, todavia este aumento pareceu ser independente do perfil dos ácidos graxos da dieta.

Entretanto nossos resultados demonstraram um efeito direto da fonte de ácidos graxos sobre o número de folículos e de ovócitos aspirados nos animais suplementados com canola, em relação àqueles suplementados com girassol (Tabela 2). O óleo de girassol possui em sua composição uma pequena quantidade do ácido linolênico (18:3) em relação ao óleo de canola e soja, no entanto o óleo de canola apresenta uma menor quantidade de ácido linoleico (18:2) e uma grande quantidade do ácido oleico (18:1) quando comparado aos demais óleos. Este fato sugere que o fornecimento de ácido linolênico e ácido oleico em maior quantidade na dieta de novilhas pode levar a uma redução na população folicular.

Bilby et al. (2006), suplementando vacas leiteiras com ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados, não observaram diferença no número de folículos presentes nos ovários, diferentemente do encontrado no presente trabalho, onde se observou um efeito do tratamento na população folicular dos animais. Por outro lado, o mesmo grupo de pesquisa observou um efeito no número de ovócitos obtido após aspiração folicular nestes animais, fato também observado no presente estudo, que demonstrou uma variação no número de ovócitos obtidos por sessão de aspiração de acordo com o tratamento.

As diferentes fontes de ácido graxo não influenciaram a taxa de recuperação ovocitária, apresentando uma taxa semelhante a outros estudos utilizando aspiração folicular (VIANA et al., 2010; PONTES et al., 2011).

Alguns autores mencionam que o aumento de energia na dieta estimula o crescimento folicular (GUTIÉRREZ et al., 1997). Segundo Funston (2004), a ovulação de maiores folículos pode resultar na formação de grandes corpos lúteos com maiores capacidades esteroidogênicas, resultando em maior produção de progesterona, o que tem sido associado com maiores taxas de concepção. No presente estudo não foi observada diferença ($P > 0,05$) no tamanho do folículo dominante nos diferentes tratamentos, este fato ocorreu possivelmente pelo fato de que as dietas fornecidas eram isoenergéticas e não houve um grupo sem suplementação, assim, não foi observado efeito da fonte de ácido graxo no diâmetro do folículo dominante.

Sartori et al. (2010), trabalhando com novilhas zebuínas a pasto suplementadas com Megalac-E[®], não observaram diferença no diâmetro do folículo dominante em relação ao grupo-controle (animais que não receberam suplementação com ácidos graxos). Bilby et al. (2006), trabalhando com vacas leiteiras, demonstraram a ocorrência de diferença significativa no diâmetro folicular, comparando ácidos graxos monoinsaturados com ácidos graxos poli-insaturados (14.9mm vs 16.8mm) respectivamente.

Os tratamentos não causaram nenhuma alteração significativa na taxa de clivagem ($P > 0,05$). Por outro lado, o mesmo resultado não foi encontrado quando comparamos produção de blastocistos *in vitro*. O grupo-controle não diferiu dos grupos canola e girassol na produção embrionária, mas o grupo soja apresentou uma menor produção de embrião ($P < 0,05$) quando comparado à do controle. Tal efeito não pode ser explicado pela composição dos principais ácidos graxos presentes nesse óleo, já que estes apresentam concentrações de ácido oleico (18:1), linoleico (18:2) e linolênico (18:3) similares às encontradas nos óleos de canola e girassol (Tabela 1), sugerindo que pode haver algum componente específico do óleo de soja que tenha um efeito deletério sobre o desenvolvimento dos blastocistos bovinos. Este resultado é de suma importância considerando que o farelo de soja é um importante componente das rações para animais. No gado leiteiro de alta produção, para que os animais consigam produzir grandes quantidades de leite é necessária uma alta ingestão de nutrientes, levando, portanto,

a um grande consumo de farelo de soja, fato que poderia estar relacionado à baixa fertilidade dos animais de alta produção leiteira.

No presente experimento, as aspirações foliculares foram realizadas com intervalo fixo de 7 dias, para que, em todas as aspirações, os animais estivessem no mesmo estágio do ciclo estral. Os dados referentes ao número de folículos, número de ovócito, taxa de recuperação ao longo da semana de aspiração estão representados na figura 2. Os dados demonstram que, apesar de em S4 ter havido uma queda na taxa de recuperação, o número de ovócitos recuperados se manteve durante todo o período, corroborando Viana et al. (2010) que não observaram redução na recuperação de ovócitos por vaca no decorrer do seu período experimental. Tal resultado demonstra ser possível a realização de sessões de OPU em novilhas mestiças zebuínas a cada 7 dias, durante cinco semanas consecutivas, sem afetar o número de ovócitos obtidos por sessão.

7. CONCLUSÃO

A suplementação com os óleos testados não melhorou o rendimento da PIV.

Animais tratados com óleo de soja apresentaram o menor desempenho na produção *in vitro* de embriões.

Sendo a soja um importante componente das rações para bovinos, torna-se importante avaliar mais detalhadamente seus efeitos sobre a reprodução bovina.

8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ADONA, P. R. **Efeito de diferentes inibidores específicos do fator promotor da maturação (MPF) na retenção da meiose em ovócitos bovinos *in vitro***. 2002. 40 p. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes – RJ, 2002.

ALBUQUERQUE, K. P. **Resposta superovulatória, produção e qualidade de embriões e concentração de ácidos graxos de vacas suplementadas com grãos de linhaça ou canola**. 2007. 84p tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá – SP, 2007.

ALMEIDA, A. P.; SOUZA, A. L.; MENEZES E. S. B.; ARRUDA I. J.; RONDINA D. **Recentes avanços na relação entre nutrição e reprodução em ruminantes**. http://www.nutricaoanimal.ufc.br/1snaa/images/Palestra_8h.pdf acessado em 03 de março de 2011.

ARMSTRONG D, G.; GONG J. G.; GARDNER J. O.; BAXTER G.; HOGG C.O.; WEBB R. Steroidogenesis in bovine granulosa cells: the effect of short-term changes in dietary intake. **Reproduction**, v. 123, p. 371-378, 2002.

ASWORTH, C. J. Maternal and conceptus factors affecting histotrophic nutrition and survival of embryos. **Livestock Production Science**, v. 44, p. 99-105, 1995.

BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G.; Nutrição de Ruminantes. Cap. 17, p. 513-536, Funep, 2006.

BETT, V.; SANTOS, G. T.; AROEIRA, L. J. M. Digestibilidade *in vitro* dos cordeiros alimentados com canola em grão integral em diferentes formas. In: **Reunião anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 36, 1999. Porto Alegre. *Anais...* Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Zootecnia, [1999] CD-ROM. Nutrição de Ruminantes.

BILBY, T. R.; BLOCK, J.; DO AMARAL, B. C.; SA FILHO, O.; SILVESTRE, F. T.; HANSEN, P. J.; STAPLES, C. R.; THATCHER, W. W. Effects of dietary unsaturated fatty acids on oocyte quality and follicular development in lactating dairy cows in summer **Journal of Dairy Science** 89, 3891–3903, 2006.

BONDI, A. A. *Nutricion Animal*. Zaragoza: Acribia, 1988. 546 p.

BURR, G. O.; BURR, M. M. The nature and role of the fatty acids essential in nutrition. 86, 587–621, 1930.

CAVALIERI, F. L. B.; SANTOS, G. T.; PETIT, H. Taxa de gestação de novilhas alimentadas com duas fontes de gordura (Megalac® ou linhaça em grão) na dieta recebendo embriões congelados de vacas leiteiras alimentadas com LAC-100 ou linhaça em grão. **Acta Scientiae Veterinariae** (Suplemento 1) n. 33, p. 216, 2005.

CHENG, Z. Effects of conjugated linoleic acid prostaglandins produced by cells isolated from maternal intercotyledonary endometrium, fetal allantochorion and amnion in late pregnant ewes. **Biochimica et Biophysica acta**, v. 1633, p. 170-178, 2003.

COPPOCK, C. E.; WILKS, D. L. Supplemental Fat in High-Energy Rations for Lactating Cows: Effects on Intake, Digestion, Milk Yield, and Composition. **Journal of Animal Science**, v. 69, p. 3826-3837, 1991.

DOWING, J. A.; SCARAMUZI, R. J.; LAMMING, G. E. Nutrient effect on ovulation rate, ovarian function and secretion of gonadotrophic and metabolic 16 hormones in sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 43, n. 1, p. 209-227, 1991.

Especificação técnica de óleos vegetais <http://www.campestre.com.br/especificaçãosojashtml> acessado em 10/04/2011.

EZZO, O. H.; HEGAZY, M. A. Effect of dietary fat on ovarian and metabolic response of heifers suffering from ovarian inactivity. **Journal of Veterinary Medical**, v. 47, p. 45-57, 1999.

FRANCO, G. L.; DAVY, F. C. A. Interação entre nutrição e reprodução em vacas de corte. In: OLIVEIRA, R. L.; BARBOSA, M. A. A. Bovinocultura de corte: desafios e tecnologias. Salvador: EDUFBA, 2007. Cap. 2, p. 82-112.

FUNSTON, R. N. Fat supplementation and reproduction in beef females. **Journal of Animal Science** v. 82, suppl., p. 154-161, 2004.

GARCIA, J. M.; AVELINO, K. B.; VANTINI, R. Estado da arte da fertilização *in vitro* em bovinos. 1º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, p. 223-230, 2004.

GARNSWORTHY, P. C.; WEBB, R. The influence of nutrition on fertility in dairy cows. Pages 39–58 in *Recent Advances in Animal Nutrition*. P. C. Garnsworthy and J. Wiseman, ed. Nottingham University Press, Nottingham, U.K, 1999.

GUTIÉRREZ, C. G.; OLDHAM, J.; BRAMLEY, T. A. et al. The recruitment of ovarian follicles is enhanced by increased dietary intake in heifers. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 1876-1884, 1997.

GRUMMER R. R.; CARROLL D. J. Effects of dietary fat on metabolic disorders and reproductive of dairy cattle. **Journal of Animal Science**, v. 69, p. 3838-3852, 1991

HAWKINS, D. E.; NISWENDER, K. D.; OSS, G. M.; MOELLER, C. L.; ODDE, K. G.; SAWYER, H. R.; NISWENDER, G. D. An increase in serum lipids increases luteal lipid content and alters the disappearance rate of progesterone in cows. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 541-545, 1995.

HIGHTSHOE, R. B.; COCHRAN, R. C.; CORAH, L. R.; KIRACOFÉ, G. H.; HARMON, D. L.; PERRY, R. C. Effects of calcium soaps of fatty acids on postpartum reproductive function in beef cows. **Journal of Animal Science**, v. 69, p. 4097-4103, 1991.

JORRITSMA, R.; C'ESAR, M. L.; HERMANS, J. T.; KRINTWAGEN, C. L. J. J.; VOS, P. L. A. M.; KRUIP, T. A. M. Effects of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cells and developmental potential of oocytes in vitro. **Animal Reproduction Science**, v. 81, p. 225–235, 2004.

LAMB, C. Entendendo os efeitos da nutrição na reprodução de vacas de corte. **Curso Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos**, 7, 2003, Uberlândia. *Anais...* Uberlândia: UNESP, p. 139-151, 2003.

LAMMOGLIA, M. A.; WILLARD, S. T.; HALLFORD, D. M.; RANDEL, R. D. Effects of dietary fat on follicular development and circulating concentrations of lipids, insulin, progesterone, estradiol-17 β , 13, 14-dihydro-15-keto-prostaglandin F_{2 α} and growth hormone in estrous cyclic Brahman cows. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 1591-1600, 1997

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica*. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 1995, 839 p.

LEROY, J. L. M. R.; VANHOLDER, T.; DELANGHE, J. R.; OPSOMER, G.; VAN SOOM, A.; BOLS, P. E. J.; DE KRUIF, A. Metabolite and ionic composition of follicular fluid from different-sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. **Animal Reproduction Science** v. 80, p. 201–211, 2004.

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. **Australian Journal Agriculture Research**, v. 4, p. 751-759, 1990.

LOPEZ, R. Crescimento y características de la canal de bovinos charolais y beefmaster alimentados com doss fuentes de proteína y dos niveles de grasa sobrepasante. **Técnica Pecuária Mexicana**, v. 40, p. 291-298, 2002.

LOPES, M. R. V.; PIMENTEL, S. A.; CARUSO, M. S. F.; JORGE, N.; RUVIERI, V. Composição de ácidos graxos em óleos e gorduras de fritura. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, N. 63 (2), p. 168 -176, jul – dez. 2004.

LUCY, M. C.; KITCHELL, R. J.; DIBNER, J. J.; HAUSER, S. D.; KRIVI, G. G. Immunohistochemical and nucleic acid analysis of somatotropin receptor populations in the bovine ovary. v. 48, p. 1219-1227, 1993.

LUCY, M. C.; STAPLES, C. R.; MICHEL, F. M.; THATCHER, W. W. Effect of feeding calcium soaps to early postpartum dairy cows on plasma prostaglandin $F_{2\alpha}$, luteinizing hormone, and follicular growth. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 483-489, 1991.

MANCIO, A. B.; LONDOÑO-HERNÁNDEZ, F. I.; FONSECA, F. A.; ANGULO, L. M. Fontes lipídicas dietéticas associadas ou não à gonadotrofina coriônica humana (hCG) na função reprodutiva e no metabolismo de lípidos de novilhas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, p. 163-170, 1999.

MATTOS, R.; STAPLES, C.; THATCHER, W. Effects of dietary fatty acids on reproduction in ruminants. **Reviews of reproduction**, v. 5, p. 38-45, 2000.

MONNIAUX, D.; MONGET, P.; BESNARD, N. Growth factors and antral follicular development in domestic ruminants. **Theriogenology**, v. 47, p. 3-12, 1997.

NUSSIO, L. G.; CAMPOS, F. P.; LIMA, M. L. M. Metabolismo de carboidratos estruturais. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V. V.; OLIVEIRA, S. G. (Ed.) Nutrição de ruminantes. 1. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2006. p. 183-223.

OLIVEIRA, S. G.; SIMAS, J. M. C.; SANTOS, F. A. P. Main aspects related to changes in the profile of fatty acids in ruminant milk fat. **Archives of Veterinary Science**, .9, n. 1, p. 73-80, 2004.

PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Ultrasonograph of the bovine ovary. **Theriogenology**, v. 21, n. 3, p. 495-504, 1984.

PONTER, A. A.; GUYADER-JOLYC, C.; NUTTINCK, F.; GRIMARD, B.; BHUMBLLOT, P. Oocyte and embryo production and quality after OPU-IVF in dairy heifers given diets varying in their n-6/n-3 fatty acid ratio. **Theriogenology**, v. 78, p. 632-645, 2012.

PONTES, J. H. F.; MELO, F. A.; BASSO, A. C.; FERREIRA, C. R.; SANCHES, B. V.; RUBIN, K. C. P.; SENEDA, M. M. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, v. 75, p. 1640-1646, 2011.

RYAN, D. P.; SPOON, R. R.; WILLIAMS, G. L. Ovarian follicular characteristics, embryo recovery, and embryo viability in heifers fed high-fat diets and treated with follicle-stimulating hormone. **Journal of Dairy Science**, v. 70, p. 3505-3513, 1992.

SÁ, W. F.; VIZCARRA, V. E. L.; FERREIRA, A. M.; CAMARGO, L. S. A.; ARAÚJO, M. C. C. Desenvolvimento pós-fecundação de oócitos bovinos pré-maturados em fluido folicular. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 3, 2003.

SKLAN, D.; MOALLEN, U.; FOLMAN, Y. Effect of dietary calcium soaps of fatty on production, and reproductive responses in high producing lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 510-517, 1991.

SANTOS J. E. P.; GRECO L. F. Recentes avanços em suplementação de ácidos graxos de cadeia longa para vacas leiteiras. **IV Congresso Latino Americano de Nutrição Animal**, 26 de novembro de 2010 – São Pedro, Brasil, p. 375-386.

SANTOS, J. E. P.; BILBY, T. R.; THATCHER, W. W.; STAPLES, C. R.; SILVESTRE, F. T. Long chain fatty acids of diet as factors influencing reproduction in cattle.43 (Supp. 2): 23-30, 2008.

SANTOS, J. E. P. Interação nutrição e reprodução da fêmea bovina. **Grupo de Estudos de Nutrição de Ruminantes**, 2005. Botucatu, SP: UNESP, 2005. Disponível em <http://www.fca.unesp.br/nutrir/artigos/Interacaonutricao.pdf>. Acessado em: 12 nov. 2005.

SANTOS, J. E. P. Efeitos da nutrição na reprodução bovina. In: Congresso Brasileiro de Raças Zebuínas, 3, 1998, Uberaba, MG. *Anais...* Uberaba: ABCZ, 1998. p. 24-75.

SPICER, L. J.; ECHTERNKAMP, S. E. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. **Dom. Anim. Endocr.**, n. 12, p. 223-245, 1995.

STAPLES, C. R.; BURKE, J. M.; THATCHER, W. W. Influence of supplemental fats on reproductive tissues and performance of lactating cows. Symposium: optimizing energy nutrition for reproducing dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 3, p. 856-871, 1998.

STAPLES, C. R.; WILTBANK, M. C.; GRUMMER, R. R.; GUENTHER, J.; SARTORI, R.; DIAZ, F. J.; BERTICS, S.; MATTOS, R.; THATCHER, W. W.: Effect of long chain fatty acids on lactation performance and reproductive tissues of Holstein cows. **Journal of Dairy Science** 83(Suppl. 1), 278 (Abstr.) 2000.

THACHER, W.; BLIBY, T. R.; BARTOLOME, J. A.; SILVESTRE, F.; STAPLES, C. R.; SANTOS, J. E. P.; Strategies for improving fertility in the modern dairy cow. **Theriogenology**, v. 65, p. 30-44, 2006.

THOMAS, M. G.; WILLIAMS, G. L. Metabolic hormone secretion and FSH-induced superovulatory responses of beef heifers fed dietary fat supplements containing predominantly saturated or polyunsaturated fatty acids. **Theriogenology**. v. 45, p. 451-458, 1996.

THOMAS, M. G.; BAO, B.; WILLIAMS, G. L. Dietary fats varying in their fatty acid composition differentially influence growth in cows fed isoenergetic diets. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 2512-2519, 1997.

TOMM, G. O. Canola: alternativa de renda e benefícios para os cultivos seguintes. **Revista Plantio Direto**, v. 15, n. 94, p. 4-8, jul/ago. 2006.

VIANA, J. H. M.; CAMARGO, L. S. A.; FERREIRA, A. M.; SÁ, W. F.; FERNANDES, C. A. C.; MARQUES JUNIOR, A. P. Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of

dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 84, p. 1-12, 2004.

VIANA, J. H. M.; SIQUEIRA, L. G. B.; PALHÃO, M. P.; CAMARGO, L. S. A. Evolução no uso das técnicas de fertilização *in vitro* na última década e impacto na indústria de embriões bovinos e produção animal no Brasil: XXIV reunião anual da sociedade brasileira de tecnologia de embriões, 2010, Porto de Galinhas - PE. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, p. 325–334, 2010.

VIANA, J. H. M.; PALHÃO, M. P.; SIQUEIRA, L. G. B.; FONSECA, J. F.; CAMARGO, L. S. A.; Ovarian follicular dynamics, follicle deviation, and oocyte yield in Gyr breed (*Bos indicus*) cows undergoing repeated ovum pick-up **Theriogenology**. v. 73, p. 966-972, 2010.

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.

WEBB, R.; NICHOLAS, B.; GONG, J. G.; CAMPBELL, B. K.; GUTIERREZ, C. G.; GARVERICK, H. A.; ARMSTRONG, D. G. Mechanism regulating follicular development and selection of the dominant follicle. **Reproduction in Domestic Ruminants V. Reproduction. Supplement**, v. 61, p. 71–90, 2003.

WEBB, R.; GARNSWORTHY, P. C.; GONG, J. G.; ARMSTRONG, D. G. Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 63–74, 2004.

WEHRMAN, M. E.; WELSH, J. R.; WILLIAMS, G. L. Diet-induced hyperlipidemia in cattle modifies the intrafollicular cholesterol environment, modulates ovarian follicular dynamics, and hastens the onset of postpartum luteal activity. **Biology of Reproduction**, v. 45, p. 514-522, 1991.

WILLIAMS, G. L. Suplementação de gordura na dieta como estratégia para aumento da eficiência reprodutiva em bovinos. In: **Curso Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos**, 5, 2001, Uberlândia, MG. Anais. Uberlândia: Conapec Jr; Botucatu: UNESP, 2001. p. 95-101.

WILLIAMS, G. L. Modulation of luteal activity in postpartum beef cows through changes in dietary lipid. **Journal of Animal Science**, v. 67, p. 785-793, 1989.

WILLIAMS, G.; STANKO, R. Dietary fats as reproductive nutraceuticals in beef cattle. **Proceedings of the American Society of Animal Science**, v. 77, p. 1-12, 2000.

ZERON, Y. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. **Reproduction**, v. 121, p. 447-454, 2002.