

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

FERNANDA DE QUEIRÓS COSTA

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM DIFERENTES ÓLEOS VEGETAIS NA DIETA
DE DOADORAS DE OÓCITOS SOBRE A PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES
BOVINOS**

CAMPOS DOS GOYTACAZES/RJ

DEZEMBRO/2013

FERNANDA DE QUEIRÓS COSTA

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM DIFERENTES ÓLEOS VEGETAIS NA DIETA
DE DOADORAS DE OÓCITOS SOBRE A PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES
BOVINOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal na área de concentração de Reprodução animal.

ORIENTADOR – Angelo José Burla Dias

CO-ORIENTADOR – Alberto Magno Fernandes

CAMPOS DOS GOYTACAZES

DEZEMBRO/2013

FERNANDA DE QUEIRÓS COSTA

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM DIFERENTES ÓLEOS VEGETAIS NA DIETA DE DOADORAS DE OÓCITOS SOBRE A PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

Tese de Doutorado apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal na área de concentração de Reprodução animal.

Aprovada em 17 de dezembro de 2013

BANCA EXAMINADORA

Prof. Felipe Zandonadi Brandão (Doutor) - UFF

Prof. Alvaro Fabrício Lopes Rios (Doutor, Ciências biológicas) - UENF

Prof. Alberto Magno Fernandes (Doutor) - UENF

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

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual do Norte Fluminense – Darcy Ribeiro (UENF), ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA), ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, pelo oferecimento deste curso e a FAPERJ pelo fornecimento da Bolsa;

Aos professores, funcionários e Alunos de pós graduação dos Laboratórios de Reprodução e Melhoramento Genético Animal (LRMGA) e Sanidade Animal (LSA) que contribuíram para realização das análises de Quimioluminescência e Espectofotometria.

Ao Professor Edson Lo Turco (Universidade de São Paulo) e sua equipe pela colaboração nas análises e interpretação dos dados fornecidos pelo MALDI-TOF-MS. E em especial a Daniela Montani pela prestatividade e paciência em me explicar as análises realizadas e os resultados obtidos.

As técnicas do setor de tecnologia de embriões do LRMGA, Carla Paes e Bruna Dias pelas preciosas orientações e longas tarefas de diluição e testes de meio de cultivo.

A grande equipe de alunos de pós graduação e graduação que me ajudaram nesse trabalho e que hoje chamo de “irmãos” Bruno Pena, Felipe Borges Rosa, Aline Mattos Arrais, Danielly Detoni e Roger Cardoso Maia.

A minha família e amigos por sempre estarem ao meu lado

E, em especial, ao meu orientador, Angelo Jose Burla Dias pela confiança na realização desse trabalho, apoio e total disponibilidade e paciência sem a qual seria impossível a conclusão desta Tese

Obrigado a todos!

RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da suplementação de novilhas com óleo de canola, soja e girassol, sobre a taxa de produção *in vitro* de embriões, assim como as alterações nos níveis de triglicerídeos, colesterol total, HDL, progesterona e estradiol séricos e no fluido folicular. Também foi avaliada a identificação de diferentes classes lipídicas de cada grupo experimental em relação ao controle através da técnica de análise direta por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI – MS). Os animais foram alimentados com as respectivas dietas por 70 dias. Semanalmente foram colhidas as amostras de líquido folicular, sangue e realizadas a OPU e PIV. Dosagens de triglicerídeos, colesterol total e HDL foram realizados por ensaio enzimático colorimétrico. Os níveis de progesterona e estradiol foram determinados por quimioluminescência. As subclasses lipídicas foram identificadas por MALDI – MS. Os resultados referentes a produção de embriões e variação hormonal e de metabólitos sanguíneos foram analisados por regressão linear robusta. Na análise do perfil lipídico os espectros de cada amostra foram acumulados usando o software MarkerLynx 4.1 (Waters, Manchester, UK) e exportados para análise de componentes principais (ACP) e análise ortogonal discriminante pelos quadrados mínimos (OPLS-DA) no software MarkerLynx™ XS (Waters, Manchester, UK). O gráfico VIP (variable importance in the projection) da análise de OPLS-DA forneceu uma lista de íons responsáveis pelas diferenças entre os grupos, e as subclasses lipídicas foram procuradas no banco de dados LipidMaps. O grupo girassol foi o que apresentou uma tendência de elevação da taxa de blastocistos ao longo do tempo. Houve tendência de elevação dos níveis séricos de triglicerídeos, colesterol e HDL, exceto no grupo canola. O nível de P4 no fluido folicular foi aumentado no grupo girassol, e o nível sérico desse hormônio no grupo soja. A separação dos grupos pela OPLS - DA entre o grupo controle e os tratamentos utilizados foi evidenciada e as substâncias identificadas, em sua maioria, corresponderam a lipídios constituintes de membranas, segundos mensageiros intracelulares ou aqueles que podem prevenir processos apoptóticos e o estresse oxidativo comum nos ambientes de cultivo embrionário *in vitro*. Conclui-se que os óleos de girassol e de soja se mostraram mais adequados para a suplementação alimentar de

doadoras de oócitos e de receptoras de embriões, respectivamente. O óleo de canola não promoveu benefícios que indiquem seu uso nem para doadoras de oócitos, nem para receptoras de embriões.

Palavras chave: Óleos vegetais, embriões in vitro, perfil lipídico e hormonal

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of supplementation of heifers with canola, soybean and sunflower oil, the rate of *in vitro* production of embryos, as well as changes in the levels of triglycerides, total cholesterol, HDL, follicular fluid and serum estradiol and progesterone. The identification of different lipid classes from each experimental group compared to the control using the technique of direct analysis by desorption matrix-assisted laser (MALDI-MS) was also evaluated. The animals were fed their respective diets for 70 days. Weekly samples of follicular blood and carried OPU and IVP fluid were collected. Measurements of triglycerides, total cholesterol and HDL were performed by enzymatic colorimetric assay. The levels of progesterone and estradiol were determined by chemiluminescence. Lipid subclasses were identified by MALDI-MS. The results for embryo production and hormonal changes and blood metabolites were analyzed by robust linear regression. The lipid profile spectra of each sample were accumulated using MarkerLynx 4.1 software (Waters, Manchester, UK) and exported to principal component analysis (PCA) and discriminant analysis by orthogonal least squares (OPLS-DA) in MarkerLynx™ XS Software (Waters, Manchester, UK). The VIP plot (variable Importance in the projection) of OPLS-DA analysis provided a list of ions responsible for differences between groups, and lipid subclasses were sought in bank LipidMaps data. Sunflower was the group that showed a tendency to increase in blastocyst rate over time. There was a trend of increased serum levels of triglycerides, cholesterol and HDL, except in the canola group. The level of P4 in follicular fluid was increased in the sunflower group, and the serum levels of this hormone in the soy group. The separation of the groups by OPLS-DA between control and treatments was evidenced and substances identified, mostly refer to constituents of lipid membranes, intracellular second messengers or those that can prevent apoptotic processes and stress oxidative common in embryo development *in vitro* environments. It is concluded that the oils of sunflower and soybean were more suitable for dietary supplementation of oocyte donors and embryo recipients,

respectively. Canola oil did not provide benefits not suggest its use for oocyte donor or recipient for embryos.

Keywords : vegetable oils, embryos in vitro . lipid and hormonal profile

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Via de biohidrogenação dos ácidos linoléico e linolênico, para ácido steárico pelo rúmen. Destaque para os dois grupos de bactérias ruminais, grupo A e grupo B. daptado de Modesto et al.(2002)..... 19
- Figura 2** – Representação da biohidrogenação ruminal do ácido linoléico e formação do CLA trans-10 cis-12 no rúmen.....20
- Figura 3** - Representação gráfica das taxas de clivagem inicial dos embriões produzidos *in vitro* a partir de oócitos de novilhas suplementadas com diferentes fontes de ácidos graxos, durante as diferentes semanas do experimento.....45
- Figura 4** - Representação gráfica das taxas de blastocistos no D8 a partir de ovócitos de novilhas suplementadas com diferentes fontes de ácidos graxos, durante as diferentes semanas do experimento.....46
- Figura 5** - Separação dos grupos pela OPLSA-DA entre o grupo controle e os tratamentos em amostras de soro sanguíneo, líquido folicular, oócitos e embriões.....48
- Figura 6** - Níveis de triglicerídeos no soro sanguíneo e no fluido folicular de novilhas suplementadas com óleo de canola, de soja e de girassol, ao longo tempo (semanas).....49
- Figura 7** - Concentração de colesterol total no soro sanguíneo e no fluido folicular de novilhas suplementadas com óleo de canola, de soja e girassol, ao longo tempo (semanas).....50

Figura 8 - Concentração de HDL no soro sanguíneo e no fluido folicular de novilhas suplementadas com óleo de canola, de soja e girassol, ao longo tempo (semanas).....	51
Figura 9 - Níveis de progesterona no soro sanguíneo e no fluido folicular de novilhas suplementadas com óleo de canola, de soja e girassol, ao longo do tempo (semanas).....	53
Figura 10 - Níveis de estradiol no soro sanguíneo e no fluido folicular de novilhas suplementadas com óleo de canola, de soja e girassol, ao longo tempo (semanas).....	55
Figura 11 - Separação dos grupos pela OPLSA - DA entre o grupo controle e os tratamentos nos oócitos.....	49
Figura 12 - Separação dos grupos pela OPLSA - DA entre o grupo controle e os tratamentos nos embriões.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição percentual dos ingredientes das dietas experimentais (% / base matéria seca) (Tratamento TR).....	37
Tabela 2 – Composição centesimal dos óleos utilizados nas dietas.....	38
Tabela 3 - Íons de lipídeos do soro sanguíneo que diferiram entre os grupos controle e canola.....	52
Tabela 4 - Classe de lipídeos sanguíneos que diferiram entre os grupos controle e Girassol.....	53
Tabela 5 - Íons de lipídeos de soro sanguíneo que diferiram entre os grupos controle e soja.....	54
Tabela 6 - Íons de lipídeos de líquido folicular que diferiram entre os grupos controle e girassol.....	56
Tabela 7 - Íons de lipídeos de líquido folicular que diferiram entre os grupos controle e canola.....	57
Tabela 8 - Íons de lipídeos de embriões que diferiram entre os grupos controle e soja.....	58
Tabela 9 - Íons de lipídeos de embriões que diferiram entre os grupos controle e canola.....	59
Tabela 10 - Íons de lipídeos de embriões que diferiram entre os grupos controle e girassol.....	60

ABREVIATURAS E SIGLAS

Acetil coenzima-A carboxilase	ACC
Ácido docosahexaenóico	DHA
Ácido eicosapentaenóico	EPA
Ácido esteárico	C18:0
Ácido graxo sintase	FAS
Ácido linoléico	18:2 n-6
Ácido linoléico conjugado	CLA
Ácido linolênico	18:3 n-6
Ácido oléico	C18:1
Ácido palmítico	C16:0
Ácidos graxos polinsaturados	PUFAs
Ácidos palmitoleico	C16:1
Análise de componentes principais	ACP
Análise ortogonal discriminante pelos quadrados mínimos	OPLS-DA
Balanço energético negativo	BEN
Complexos <i>cumulus oophorus</i>	COCs
Corpo lúteo	CL
Electrospray Ionization	ESI
Espectrometria de massas	MS
Estrógeno	E2
Fator de crescimento semelhante a insulina	IGF-I
Fertilização <i>in vitro</i>	FIV
Fourier-transform ion cyclotron resonance	FT-ICR
Gonadotrofina coriônica humana	hCG
Inseminação artificial	IA
Lipase lipoproteica	LPL
Lipoproteínas de alta densidade	HDL
Lipoproteínas de baixa densidade	LDL
Lipoproteínas de densidade muito baixa	VLDL
<i>Mass to charge ratio</i>	<i>m/z</i>

Matrix Assisted Lazer Desorption Ionization	MALDI
Ovum pick-up	OPU
Produção de embriões <i>in vitro</i>	PIV
Progesterona	P4
Proteínas ligadoras de ácidos graxos	FABP
Sais de cálcio de ácidos graxos	CaLCFA
Soro fetal bovino	SFB
Superovulação	SOV
Time of flight	TOF
Transferência de embriões	TE
Variable importance in the projection	VIP

SUMÁRIO

RESUMO	V
ABSTRACT	VII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	XI
ABREVIATURAS E SIGLAS	XII
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1. LIPÍDIOS NA ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES	16
2.1.1. Metabolismo de lipídios no rúmen e absorção de triglicerídeos alimentares	17
2.2. SUPLEMENTAÇÃO LIPÍDICA ALIMENTAR E SEUS EFEITOS SOBRE A REPRODUÇÃO	22
2.2.1. Efeitos calóricos da utilização de lipídios na dieta	22
2.2.2. Efeitos não calóricos da utilização de lipídios na dieta	23
2.2.2.1. Efeitos sobre metabólitos sanguíneos	24
2.2.2.1.1. <i>Triglicerídeos, colesterol total e lipoproteínas</i>	24
2.2.2.1.2. <i>Progesterona e Estradiol</i>	26
2.2.2.2. Efeitos sobre a composição de ácidos graxos plasmáticos, no fluido folicular, nos oócitos e nos embriões	28
2.2.2.3. Efeito sobre a produção de embriões <i>in vitro</i>	30
2.3. A ESPECTROMETRIA DE MASSAS	31
2.3.1. Matrix-assisted laser desorption/ionization - MALDI	32
3. MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1. Local e duração do experimento	35
3.2. Animais e Área experimental	35
3.3. Dieta experimental e Tratamentos	36
3.4. Coleta de soro sanguíneo e líquido folicular	37
3.5. Aspiração folicular <i>in vivo ovum pick up</i> (OPU)	38
3.6. Produção de embriões <i>in vitro</i> (PIV)	38
3.7. MALDI-TOF MS	39
3.7.1. Extração de lipídeos	39

3.7.2. MALDI-TOF MS	40
3.8. Quimioluminescência	40
3.9. Espectofotometria	40
3.10. Análise estatística	41
3.10.1. Taxa de clivagem, taxa de blastocisto e perfis metabólicos no soro sanguíneo e líquido folicular	41
3.10.2. Análise de perfil lipídico	42
4. RESULTADOS	43
4.1. Produção <i>in vitro</i> de embriões	43
4.2. Triglicerídeos, colesterol total e HDL no soro sanguíneo e líquido folicular	44
4.3. Progesterona e Estradiol no soro sanguíneo e líquido folicular	46
4.4. Perfil lipídico no soro sanguíneo, líquido folicular, oócitos e embriões	48
5. DISCUSSÃO	58
6. CONCLUSÃO	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

1. INTRODUÇÃO

A pecuária brasileira possui uma demanda crescente de animais de elevado mérito genético, o que tem impulsionado o uso de técnicas avançadas de biotecnologia, notadamente aquelas associadas à reprodução animal, tais como a superovulação (SOV), transferência de embriões (TE) e mais recentemente a fertilização *in vitro* (FIV) associada à punção folicular *in vivo* (ovum pick-up - OPU). Atualmente, o Brasil é um dos países que mais gera produtos utilizando esta biotecnologia, porém com resultados muito variáveis e aquém do ideal (Guardieiro, 2009).

A nutrição, bem como suas inter-relações quanto ao tipo e quantidade de suplemento fornecido apresentam grandes efeitos nos processos reprodutivos dos bovinos, porém estes não estão bem elucidados. De acordo com o tipo de ácido graxo suplementado, as gorduras na dieta podem influenciar positivamente a reprodução das fêmeas pela alteração do ambiente folicular ovariano e função do corpo lúteo (CL), por melhorar o *status* energético e pelo aumento dos precursores das sínteses dos hormônios reprodutivos como os esteróides e as prostaglandinas (Saples et al., 1998; Mattos et al., 2000)

Além das alterações no processo esteroidogênico, a homeostase metabólica de lipídeos é vital para a manutenção das atividades celulares básicas (Kopelman, 2000). Os lipídeos desempenham múltiplos papéis nas diversas funções celulares (Van Meer, 2005). Fundamentalmente, são os principais constituintes de membranas biológicas, onde contribuem para captura, organização e distribuição de compostos moleculares necessários para sobrevivência celular. Funcionam também como fonte energética para o correto funcionamento celular (Michalik, et al., 2006) e ainda promovem a interação entre porções de membrana, que regulam a sinalização celular e facilitam a transmissão de informação entre compartimentos intracelulares ou para outras células.

Um dos problemas relacionados à produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos é justamente o excesso de lipídios acumulados nos blastômeros. O uso do soro fetal bovino (SFB) nos meios de cultivo de embriões pode

promover a incorporação de ácidos graxos saturados e colesterol nas membranas das células embrionárias, fazendo com que elas fiquem menos permeáveis e mais rígidas, explicando a grande susceptibilidade dos embriões PIV à criopreservação (Barceló-Fimbres e Seidel JR, 2007). Por outro lado, o aumento do percentual de ácidos graxos poli-insaturados nas membranas biológicas faz com que elas se tornem mais fluidas e os embriões apresentem melhor qualidade e maior resistência à criopreservação (Haggarty et al., 2006).

O aumento no percentual de ácidos graxos poli-insaturados nas membranas biológicas pode ser conseguido pela modificação da alimentação dos animais (Juchem et al., 2004). O aumento do consumo do ácido linoleico, por exemplo, um ácido graxo poli-insaturado, constituinte do grupo dos ácidos graxos essenciais, tem sido relacionado à redução das concentrações de triglicerídeos, assim como de ácidos graxos saturados em bovinos e em humanos, possivelmente pela inibição da expressão de genes que codificam a síntese de enzimas lipogênicas, assim como inibem a atividade da lipoproteína lipase.

Os ácidos graxos essenciais são aqueles que não podem ser sintetizados pelo organismo animal, mas são necessários para certas funções biológicas essenciais. Para bovinos os ácidos graxos ômega 3 e ômega 6 são os mais importantes, tanto na quantidade total destes ácidos graxos como na proporção em que ocorrem. Possuem funções na reprodução animal, estando associados à produção de progesterona, ovulação, capacitação dos espermatozoides, contratilidade do oviduto, imunidade e produção de interferon (ARM e HAMMER, 2006).

Os óleos vegetais como o de girassol, de soja e de canola são fontes de ácidos graxos, facilmente encontrados no mercado e que podem ser incorporadas a alimentação animal desde que, cuidadosamente balanceadas. Tais suplementos fornecem diferentes proporções de PUFAS sendo os dois primeiros ricos em ácido linoleico e o último importante fonte de ácido oleico.

Dessa forma, este estudo buscou avaliar possíveis alterações na produção hormonal e no percentual lipídico do sangue, líquido folicular e oócitos, assim como nos próprios embriões PIV, pela suplementação da dieta das doadoras de oócitos com diferentes óleos vegetais, utilizados como fonte de ácidos graxos poli-insaturados.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da suplementação da dieta de vacas doadoras de oócitos com diferentes óleos vegetais, sobre a produção de hormônios esteroides, percentual lipídico no sangue, líquido folicular, oócitos e embriões.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparar as diferenças entre os grupos em relação a:

- concentração de triglicérides, colesterol total, HDL, progesterona e estradiol séricos e no fluido folicular.
- perfil lipídico do soro sanguíneo, do fluido folicular, dos oócitos e dos embriões produzidos *in vitro*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. LIPÍDIOS NA ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES

Os ácidos graxos presentes nos animais vertebrados são obtidos a partir da síntese *de novo* do acetato ou absorvidos via intestinal a partir dos nutrientes fornecidos pela dieta. Um dos produtos finais da síntese dos ácidos graxos é o ácido palmítico (C16:0) o qual pode ser alongado para ácido esteárico (C18:0). Todavia, as membranas das células animais necessitam de ácidos graxos insaturados para manter sua estrutura, fluidez e função (Miles e Calder, 1998). O organismo de animais e plantas tem plenas condições de

adicionar uma dupla ligação até o carbono 9, pela enzima $\Delta 9$ dessaturase, transformando o ácido esteárico (C18:0) em ácido oléico (C18:1) (Lehninger, 1995). Dessa forma, os demais ácidos graxos poli-insaturados são ditos essenciais, ou seja, têm de ser obtidos por meio da alimentação.

O consumo de lipídios pelos ruminantes é limitado na natureza (Williams, 2001), com as dietas contendo aproximadamente 2 a 3% de ácidos graxos de cadeia longa de origem vegetal, sendo estes predominantemente poli-insaturados (Santos, 1998). Nas forragens, as gorduras estão presentes, principalmente, na forma de fosfolipídios e glicolipídios, enquanto nos grãos encontram-se na maior parte como triglicerídeos (Van Soest, 1994). O tipo de ácido graxo nos alimentos também varia; grande parte dos lipídeos dos vegetais são altamente insaturados, sendo que em cereais e na maioria das sementes oleaginosas há predominância de ácido linoleico (18:2 n-6), enquanto que nas folhas o ácido graxo mais comum é o linolênico (18:3 n-3). Algumas exceções importantes incluem o óleo de palma (alto teor de ácido palmídico - 16:0), óleo de canola (alto teor de ácido oleico - 18:1 n-9) e o óleo de linhaça (alto teor de ácido linolênico - 18:3 n-3).

3.1.1. Metabolismo de lipídios no rúmen e absorção de triglicerídeos alimentares

O metabolismo de lipídios no rúmen é limitado pela taxa de liberação da matriz do alimento. Em grãos de cereais, a maioria dos lipídios encontra-se no germe e, portanto, há necessidade de degradação da parede celular para que a hidrólise se inicie. Processo semelhante ocorre com os glicerídeos das sementes oleaginosas. Após sua liberação na matriz, os triacilgliceróis são hidrolizados (lipólise) a ácidos graxos e glicerol. Os lipídios de forragens ocorrem, principalmente, como diacil-mono- e digalactosilglicerídeos chamados genericamente de galactolipídios. Após a liberação da matriz esses compostos são também rapidamente hidrolizados a ácidos graxos, galactose e glicerol (Palmquist e Mattos, 2011).

As suspensões microbianas no rúmen são capazes de hidrolisar triglicerídeos e fosfolipídios os quais contêm ácidos graxos poli-insaturados.

Gorduras animal e vegetal que contêm ácidos palmitoleico (C16:1), oleico (C18:1), linoleico (C18:2) e linolênico (C18:3) são amplamente metabolizadas pelos ruminantes, sendo o ácido linoleico o mais abundante em vegetais e derivados vegetais. Os microrganismos no rúmen metabolizam as gorduras hidrolisando-as em seus componentes de ácidos graxos poli-insaturados e glicerol (Williams, 2001).

O glicerol é rapidamente fermentado a ácidos graxos de cadeia curta e, por ação da glicerol quinase, é convertido a glicerol 3-fosfato e transformado em diidroxiacetona fosfato, um intermediário da glicólise ou da gliconeogênese, enquanto os ácidos graxos insaturados liberados têm algumas de suas ligações duplas reduzidas e seus isômeros modificados em um processo chamado biohidrogenação (Doreau e Chilliard, 1997; Mattos et al., 2000; Robinson et al., 2002; Sanchez, 2003). Esta transformação consiste em saturar os ácidos graxos com ligações duplas (insaturados) colocando hidrogênio na cadeia carbônica a qual fica apenas com ligações simples.

Certos ácidos graxos, especialmente os poli-insaturados, são tóxicos para os microrganismos ruminais. Os mais susceptíveis são as bactérias gram positivas, as metanogênicas e os protozoários. A toxicidade está relacionada à natureza anfipática dos ácidos graxos, ou seja, aqueles que são solúveis, tanto em solventes orgânicos como em água. Portanto, como um mecanismo de defesa, a biohidrogenação torna-se um evento muito importante no rúmen.

Bactérias fermentadoras participam desse processo no rúmen. Em 1984, Kemp e Lander as classificaram em dois grupos baseados nas reações e produtos finais da biohidrogenação. No grupo A foram incluídas as bactérias que primeiro isomerizam ácido linoleico (C18:2 cis 9 cis12) a C18:2 cis 9 trans12 (Ácido linoleico conjugado - CLA) e posteriormente biohidrogenizam o mesmo até o C18:1 trans 11, sendo este o produto final. No grupo B foram colocadas as bactérias que utilizam o C18:1 trans 11 como um dos principais substratos, sendo o ácido esteárico (C18:0) o produto final (Figura 1)

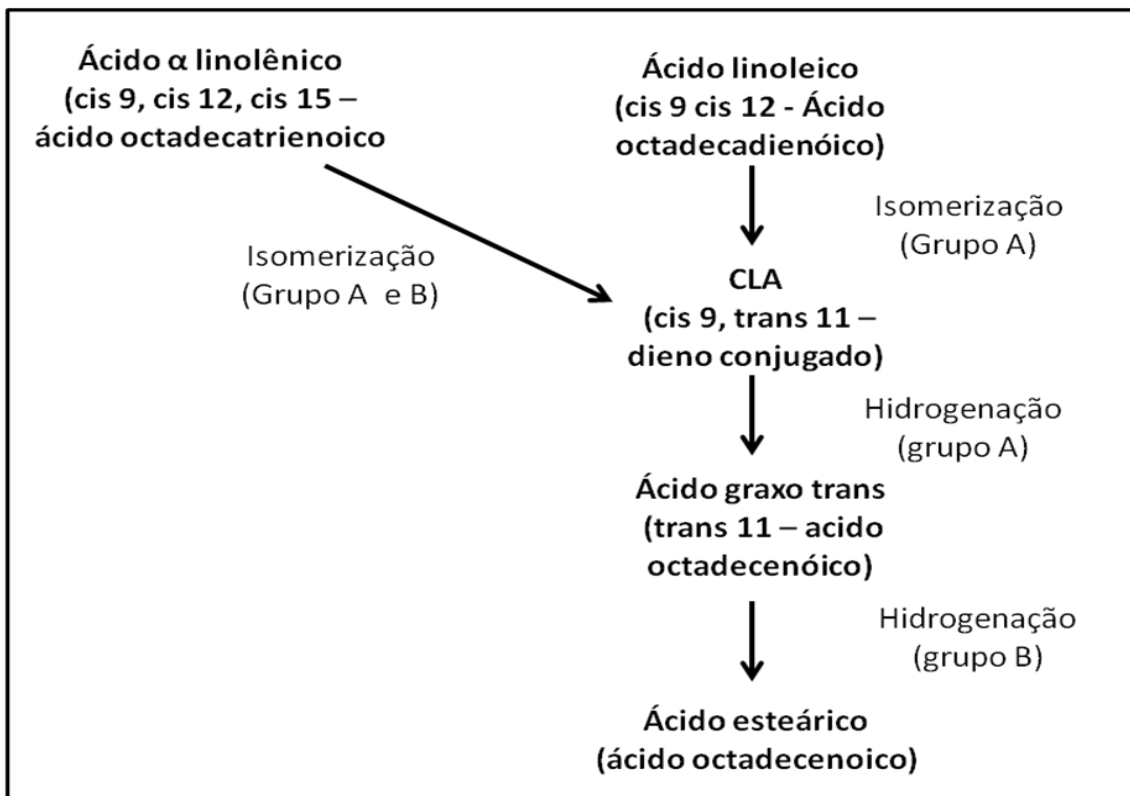


Figura 1: Via de biohidrogenação dos ácidos linoleico e linolênico, para ácido esteárico pelo rúmen. Destaque para os dois grupos de bactérias ruminais, grupo A e grupo B. Adaptado de Modesto et al.(2002).

Quando o uso de ácidos graxos, na dieta de ruminantes tem como objetivo a alteração na composição da gordura depositada na carcaça, ou na gordura secretada no leite e a melhoria na produção e qualidade de embriões, torna-se necessário o uso de técnicas que diminuam o processo de biohidrogenação de ácidos graxos no rúmen. Segundo Oliveira *et al.* (2004), para reduzir a biohidrogenação e assim, aumentar a quantidade de ácidos graxos poli-insaturados que chegam ao intestino delgado é necessário fornecer dietas ricas nestes ácidos, mas também, dietas que elevem o pH ruminal, alterando o ambiente e conseqüentemente a população bacteriana do rúmen (Figura 2).

Outra forma de promover essa alteração é o fornecimento de ácidos graxos poli-insaturados em forma de gordura protegida. Numerosas tentativas foram feitas para limitar os efeitos da hidrogenação de lipídios no rúmen e seus distúrbios na digestão dos carboidratos, através de diferentes técnicas de proteção, impedindo o ataque microbiano contra os lipídios e os microrganismos ruminais contra os efeitos negativos dos lipídios. A saponificação de ácidos graxos de óleos poli-insaturados é o método mais

utilizado na pecuária e possui como seu representante o Megalac[®] (DOREAU & CHILLIARD, 1997).

Este produto é uma gordura granular composta de sais de cálcio de óleo de palma e contém principalmente ácidos graxos saturados, tais como ácidos graxos palmítico, esteárico e poli-insaturados de cadeia longa, como o linoleico e linolênico (ARM e HAMMER, 2006.; FUNSTON, 2004). Este tipo de gordura, por ser um produto altamente estável em água e altas temperaturas, somente é digerido em meio ácido, no animal. No rúmen, o meio é ligeiramente ácido (pH = 6,2), o que faz com que ele permaneça inalterado. Ao chegar no abomaso, cujo meio é extremamente ácido (pH = 2-3), ocorre o desdobramento do Megalac[®] com a liberação dos ácidos graxos e íons de cálcio para o intestino, que serão absorvidos e levados pela corrente sanguínea (ARM e HAMMER, 2006).

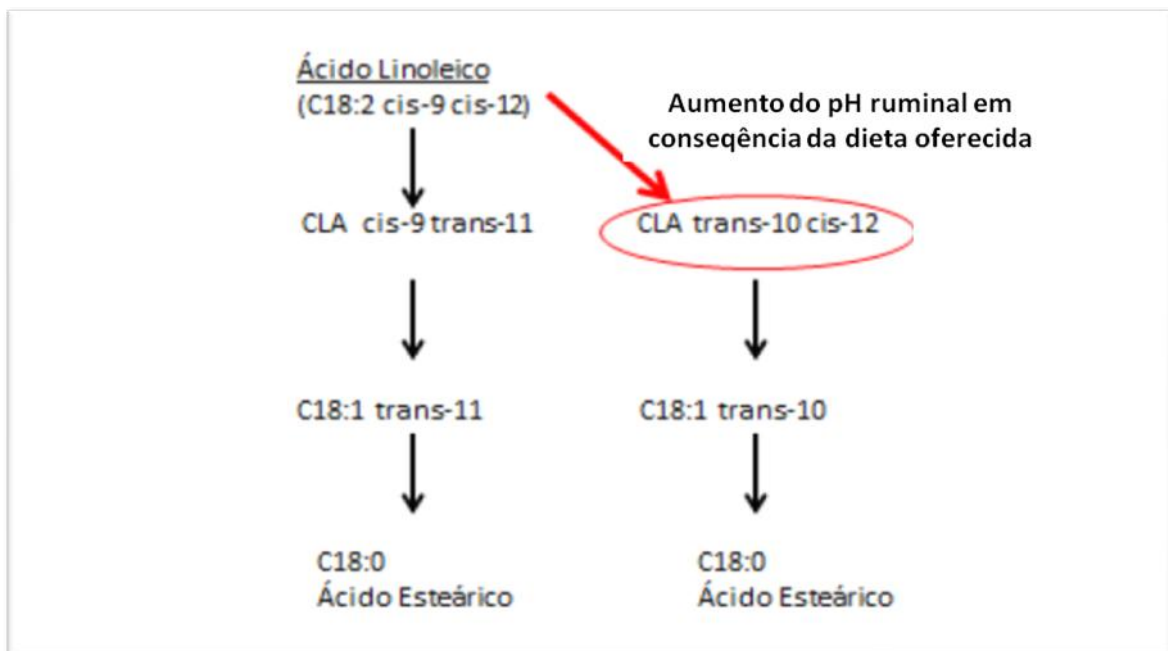


Figura 2: Representação da biohidrogenação ruminal do ácido linoleico e formação do CLA trans-10 cis-12 no rúmen.

Os lipídeos que deixam o rúmen são predominantemente ácidos graxos livres (80-90%) e fosfolipídios (10-15%) como parte das membranas celulares das bactérias e uma pequena parte de triglicerídeos e glicolipídios no resíduo dos alimentos não completamente fermentados. No rúmen, a maioria dos ácidos graxos livres utilizados na alimentação estarão na forma de sabões de

cálcio, sódio ou potássio devido ao pH ruminal que se encontra próximo da neutralidade (6,0–6,8). Após passar pelo abomaso onde a acidez local é alta (pH próximo de 2,0) ocorrerá a dissociação desses sabões e os ácidos graxos voltam a forma livre, agora aderidos às partículas dos alimentos. A porção livre encontra-se na forma saturada sendo que dois terços são formados por ácido esteárico e um terço de ácido palmítico. Antes que a absorção dos ácidos graxos ocorra é necessário que, mesmo estando aderidos às partículas das forragens, sejam solubilizados no meio aquoso do intestino (Palmquist e Mattos, 2011).

Animais monogástricos têm maiores dificuldades na digestão de gorduras com alto ponto de fusão, insolúveis, mas os ruminantes desenvolveram processos eficientes na digestão de ácidos graxos saturados tão bem quanto de insaturados e com muito maior eficiência que os monogástricos. A chave para a absorção dos lipídeos em ruminantes e não ruminantes é a formação de micelas no intestino, a partir da ação dos sais biliares sobre as gotículas de gordura. Em monogástricos, monoglicerídeos que resultam da digestão dos triglicerídeos já no intestino são necessários para a absorção das gorduras. Nesse caso, os sais biliares e os monoglicerídeos têm em sua estrutura molecular partes que podem interagir com os líquidos do meio e partes que interagem com os lipídeos fazendo assim uma interface entre gordura e água. Em monogástricos a ausência de monoglicerídeos torna difícil a absorção dos lipídeos (Palmquist e Mattos, 2011).

Em ruminantes, entretanto, um composto chamado liselecitina desempenhará o papel dos monoglicerídeos. Nesses animais a bile e secreções pancreáticas, são necessários para o processo de digestão de lipídeos e são liberados no duodeno. Juntos com os sais biliares, o fígado secreta um composto chamado de lecitina que em contato com as enzimas liberadas pelo pâncreas (fosfolipase A) ocorre a conversão para liselecitina, que é um potente emulsificador, particularmente de ácidos graxos saturados. Outro fator importante é a composição da bile dos ruminantes, sendo caracterizada por um excesso de ácido taurocólico. Na maioria dos herbívoros, o ácido glicocólico é predominante, mas em ruminantes adultos o ácido taurocólico excede o glicocólico numa proporção de 3:1. Isso se torna importante porque o pH no duodeno ainda é ácido (pH 3 a 5) devido a baixa

secreção de bicarbonato pelo pâncreas dos bovinos, bem diferente dos monogástricos que está mais neutro (pH 6 a 7).

Geralmente o coeficiente de absorção para ácidos graxos individuais varia entre 80% (para ácidos graxos saturados) e 92% (para ácidos graxos poli-insaturados) em dietas convencionais com baixo teor de gordura (2 a 3% na matéria seca). Os ácidos graxos atravessam, então, a mucosa intestinal por combinação de difusão simples e sistemas de transporte mediado por agentes carreadores, auxiliados por proteínas ligadoras de ácidos graxos (FABP).

Após os lipídeos serem absorvidos em sua forma livre, serão esterificados novamente para triglicerídeos e fosfolipídeos no interior dos enterócitos. Uma vez no citosol, os ácidos graxos são ativados pelo complexo acil – CoA sintetase. Os ácidos graxos ativados são então esterificados por vias alternativas. Em monogástricos, grande parte dos lipídios é absorvida como 2-monoacilglicerol, que é esterificado diretamente por dois acil-CoA para produzir triacilglicerol. Na falta de 2-monoacilglicerol, como no caso dos ruminantes, os ácidos graxos são esterificados pela via do α -glicerofosfato para formar triacilglicerol.

Os triacilgliceróis, fosfolipídios, colesterol e ésteres de colesterol são agrupados nas membranas citosólicas das células intestinais para formar pré-lipoproteínas. No complexo de Golgi, os lipídios são combinados com apoproteínas específicas para formar quilomícrons e lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL). Os quilomícrons e VLDL são transportadores de lipídios intestinais (oriundos dos alimentos) para os tecidos. As lipoproteínas entram nos vasos linfáticos e vão para o ducto torácico (junção do sistema linfático com o sistema circulatório), onde eles entram na corrente sanguínea. Diferentemente da maioria dos nutrientes que são absorvidos pelo trato gastro intestinal, os lipídeos que são absorvidos entram diretamente na circulação e são utilizados pelos tecidos corporais sem uma prévia metabolização hepática.

A absorção de quilomícrons e de VLDL é mediada pela lipase lipoproteica (LPL), enzima encontrada nas células epiteliais das paredes capilares em muitos tecidos. Essa enzima hidrolisa os triacilgliceróis das lipoproteínas liberando ácidos graxos e glicerol. O glicerol é transportado pela corrente sanguínea e captado principalmente pelo fígado, onde é usado para glicólise e gluconeogênese.

Os ácidos graxos livres são utilizados no tecido onde ocorre a hidrólise. O tipo predominante de lipoproteínas presente na circulação sanguínea de ruminantes são as lipoproteínas de alta densidade (HDL), que atuam retirando o colesterol da circulação e levando-o de volta ao fígado para serem metabolizados. Essas parecem ser as únicas lipoproteínas com acesso ao compartimento intrafolicular (HAWKINS et al., 1995; WILLIAMS, 2001) representando assim, um importante elo entre o metabolismo de lipídios alimentares e seus efeitos sobre o sistema reprodutivo.

Mattos *et al.* (2000) relataram que a fonte de gordura da dieta dos animais pode alterar o perfil de ácidos graxos das membranas plasmáticas de diversas células no organismo. O ácido linolênico (C18:3) normalmente, é hidrogenado até a formação de ácido esteárico (C18:0), enquanto a hidrogenação do ácido linoleico (C18:2) resulta na formação de ácido esteárico, e diferentes isômeros do C18:1 (Tamminga & Doreau, 1991), os quais serão precursores para a formação do CLA nos tecidos (Lawson et al., 2001).

3.2. SUPLEMENTAÇÃO LIPÍDICA ALIMENTAR E SEUS EFEITOS SOBRE A REPRODUÇÃO

3.2.1. Efeitos calóricos da utilização de lipídios na dieta

Fontes concentradas de energia como gorduras, sementes de oleaginosas ou óleos derivados destas, têm sido utilizadas com diferentes resultados, tanto na produção, quanto na reprodução de vacas de leite e de corte (SATURNINO e AMARAL, 2005). A adição de gordura a dietas de vacas no pré e pós-parto tem a função de aumentar o conteúdo energético destas, reduzindo assim o período de balanço energético negativo (BEN). As fontes de gordura, as que apresentam densidade energética mais elevada, estimulam o crescimento folicular quando fornecidas para aumentar o balanço energético.

Óleos de plantas ricos em ácidos oleico C18:1 e linoleico C18:2, aumentam a gliconeogênese pelo incremento na produção de propionato no rúmen (Chalupa *et al.*, 1986). Considerando que a glicose é a única fonte de energia utilizada pelo sistema neural, quando o animal encontra-se em balanço energético positivo há um incremento na produção e liberação dos hormônios.

O GNRH estimula a produção e liberação de LH e FSH aumentando o diâmetro do folículo pré-ovulatório e favorecendo a ovulação (Ferreira, 2010). A suplementação com sebo num nível equivalente a 3% do consumo de MS, diminuiu o desbalanço energético entre as semanas 2 e 12 pós-parto e melhorou a taxas de prenhez das vacas suplementadas (STAPLES et al., 1998).

Os ácidos graxos também podem atuar como repartidores de nutrientes redirecionando a energia metabolizável e incrementando a chance de atingir um escore de condição corporal ótimo ao início da temporada de monta. Bottger et al. (2002) demonstraram que animais suplementados com ácidos graxos tinham maior escore de condição corporal e conseqüentemente melhor desempenho reprodutivo. Trabalhos nos quais foram utilizados sabões cálcicos de ácidos graxos como suplemento para vacas de cria mostraram melhora no balanço energético e melhor desempenho reprodutivo (SKLAN et al., 1991; GARCIA-BOJALIL et al., 1998; CASTANEDA-GUTIERREZ, 2007), o que pode ser devido a efeitos não somente relacionados à melhora do status energético mas, a um somatório dos efeitos calóricos e não calóricos (STAPLES et al., 1998).

3.2.2. Efeitos não calóricos da utilização de lipídios na dieta

Os ácidos graxos também podem afetar os processos reprodutivos de maneira não relacionada à energia. Os efeitos não relacionados com o conteúdo calórico dos PUFA são denominados efeitos nutracêuticos (WILLIAMS E STANKO, 1999). Os efeitos positivos da suplementação com PUFA sobre a reprodução provavelmente não sejam devidos a alterações no status nutricional e sim ao efeito dos ácidos graxos sobre o eixo hipotálamo-hipófise-ovário-útero (MATTOS et al., 2000).

Os efeitos nutracêuticos dos PUFA estão relacionados com a capacidade de modular o metabolismo do ácido araquidônico e das prostaglandinas, aumentar os níveis circulantes do fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-I), e, promoverem o incremento de colesterol plasmático o qual será substrato para a síntese de hormônios esteróides como a progesterona (P4) e o estrógeno (E2) (WILLIAMS E STANKO, 1999). A

essencialidade dos PUFA tem sido proposta como um dos possíveis mecanismos pelos quais estes podem melhorar o desempenho reprodutivo (ZERON et al., 2001; AMBROSE et al., 2006;). A suplementação com PUFA incrementa a secreção de esteróides e eicosanoides modificando a função do ovário e útero e beneficiando a implantação embrionária (CARDONA, 2009). Os PUFA também podem estar diretamente envolvidos na transcrição de genes que codificam a síntese de proteínas específicas (fosfolipase A2, Prostaglandina H desidrogenase) relacionadas com a fisiologia reprodutiva (MATTOS et al., 2000).

A suplementação com fontes de PUFA podem alterar o número e tamanho de folículos, a taxa de ovulação, o tamanho do corpo lúteo, a produção de progesterona e o tempo de luteólise (BILBY et al., 2006; WATHES et al., 2007), podendo potencialmente melhorar o desempenho reprodutivo da vaca de cria (STAPLES et al., 2007; CARDOSO DE OLIVEIRA et al., 2007). Basicamente tais alterações se seguem a uma alteração inicial no perfil de ácidos graxos plasmáticos que vai servir de ponto de partida para os demais efeitos sistêmicos advindos da suplementação.

Os lipídios constituem uma grande proporção da composição das células, fazendo parte das membranas celulares. A quantidade e tipo de PUFA nas membranas modificam as propriedades das mesmas. O conteúdo de PUFA nas células embrionárias está relacionado com melhor desenvolvimento embrionário, maior qualidade dos embriões e, conseqüentemente maior taxa de prenhez (ZERON et al., 2001; BILBY et al., 2006; TANGHAVELU et al., 2007).

Desde 1979, Kane et al. relataram que os ácidos graxos de cadeia longa são necessários para suportar o crescimento de um zigoto ao estágio de mórula em cultivo *in vitro*, fornecendo energia para o seu crescimento. Mais tarde, KUBOW & KOSKI (1995) descrevem que a deficiência de ácidos graxos n-6 em embriões estaria associada ao retardo no crescimento embrionário.

3.2.2.1. Efeitos sobre os metabólitos sanguíneos

2.2.2.1.1 Triglicerídeos, Colesterol e lipoproteínas

O “status” lipídico metabólico modifica o potencial reprodutivo da vaca independentemente do consumo de energia na dieta (WEHRMAN et al., 1991). Williams (1989) verificou incremento de 1,4 vezes nas concentrações de triglicerídeos e colesterol total de vacas Brahman com cria ao pé na quarta semana pós-parto alimentadas com dietas de alto percentual lipídico comparada ao controle. Segundo este autor, estes metabolitos atingiram sua concentração máxima em 7 a 9 semanas pós-parto, sendo que a concentração de triglicerídeos começou a declinar em seguida. Embora os níveis de triglicérides não pareçam desempenhar um papel direto na regulação da esteroidogênese ovariana, estes servem, juntamente com o colesterol, como indicadores úteis do “status” metabólico lipídico geral.

O colesterol é um componente das membranas celulares e é o precursor para a síntese de hormônios esteróides, entre eles, a progesterona e os estrógenos (Grummer e Carrol, 1988). Grande parte do colesterol sanguíneo é transportado por lipoproteínas de alta (HDL) e baixa (LDL) densidade. Cerca de 90 a 95 % do colesterol encontra-se ligado às HDL sendo estas as encarregadas por transportar o colesterol até o fluido folicular e às células lúteas, onde o colesterol é utilizado pelo tecido ovariano na esteroidogênese (GRUMMER e CARROLL, 1988; WEHRMAN et al., 1991) como já foi descrito anteriormente.

Os níveis do colesterol plasmático são indicadores adequados do total de lipídios no soro sanguíneo, pois correspondem a cerca de 30% do total (GONZÁLEZ & SILVA, 2006). O colesterol circulante é o principal substrato para a síntese luteal de progesterona nos mamíferos. Uma vez que, a síntese “de novo”, a partir do acetato no interior do tecido luteal é insuficiente para manter sua função normal, acredita-se que o aumento da concentração de colesterol, por meio da alimentação, possa interferir na função luteal (Williams e Stanko, 1999).

O aumento da ingestão de matéria seca pode, também, elevar a produção de ácidos graxos voláteis produzidos pelo rúmen e, conseqüentemente, aumentar a concentração de acetato disponível para a síntese de colesterol e posteriormente de progesterona (SCHRICK et al., 1992).

Dessa forma, as concentrações plasmáticas de colesterol e as lipoproteínas de alto e baixo peso molecular encontram-se aumentados em dietas onde são incorporadas fontes lipídicas (GRUMMER e CARROLL, 1988; STAPLES et al., 1998). A suplementação com fontes lipídicas também aumenta a quantidade de gordura nas células luteais, influenciando positivamente a produção de progesterona, diminuindo a mortalidade embrionária precoce (STAPLES et al., 1998), e a duração do período anovulatório em animais com maiores concentrações de colesterol (BEAM E BUTTLER, 1997).

2.2.2.1.2. Progesterona e Estradiol

A progesterona é um hormônio esteróide produzido pelo corpo lúteo no ovário, responsável por preparar o útero para receber o embrião e por manter a gestação até o parto nos bovinos. Maiores concentrações de progesterona têm sido relacionadas com maiores índices de fertilidade (BACH, 2003) e maiores taxas de prenhez (BURKE et al., 1997; CHAGAS E SILVA et al., 2002; STAPLES et al., 2007; BECH-SÀBAT et al., 2008; RODRIGUES JUNIOR, 2009).

A suplementação com PUFA aumenta as concentrações de progesterona circulantes (LUCY et al. 1991; HAWKINS et al.1995; BILBY et al. 2006; THANGAVELU et al. 2007),o que pode ser atribuído ao aumento do tamanho/volume corpo lúteo, aumento na concentração de colesterol sérica no fluido folicular e no corpo lúteo e diminuição do metabolismo da progesterona pelo fígado (RYAN et al., 1992).

Mancio et al. (1999) observaram, que novilhas suplementadas com lipídios tiveram, maiores níveis de progesterona no soro quando comparados aos do grupo-controle. Além disso, novilhas suplementadas com lipídios e que receberam tratamento com gonadotrofina coriônica humana (hCG) apresentaram maior concentração de progesterona do que as que não receberam, indicando que a ação luteotrófica do hormônio possivelmente aumentou a absorção de lipoproteínas e a esteroidogênese pelo tecido luteínico.

Suplementação de gordura na dieta também estimula a síntese e acúmulo de lipoproteínas e ésteres de colesterol nos tecidos e fluidos corporais (Williams, 1989). O aumento da concentração de colesterol no líquido folicular pode estar relacionado com o fato de que, células da granulosa colhidas dos folículos de vacas suplementadas com lipídios, mostraram um aumento na secreção de progesterona e androstenediona *in vitro* (WEHRMAN et al., 1991) e de estradiol, androstenediona e da taxa estradiol:progesterona em vacas 50-70 dias pós-parto (ZACHUT et al., 2008). O aumento da relação E2:P4 é um indicador seguro da saúde do folículo (McNatty et al. 1979; Ireland e Roche, 1982).

Beam e Butler (1997) trabalhando com vacas Holandesas suplementadas com três diferentes níveis de PUFA na dieta, observaram que animais consumindo dietas com altos teores de gordura aumentaram o número e tamanho dos folículos, e que, níveis moderados de suplementação conduziram a um maior pico de estrogênios na primeira onda folicular pós-parto, o que diminuiu o período anovulatório. Maiores diâmetros foliculares estão associados a maiores níveis circulantes de estradiol (Wiltbank et al. 2006). Da mesma forma, Robinson et al. (2002) quando adicionaram ácido linolênico (C18:3) a dieta de bovinos obtiveram folículos dominantes maiores e maiores níveis de estradiol plasmáticos.

Em contrapartida, Zachut et al (2008) não obtiveram correlação significativa entre o tamanho do folículo pré-ovulatório e as concentrações de estradiol. No entanto, nesse mesmo estudo, a concentração de estrógeno sérico foi correlacionada com a concentração do mesmo no líquido folicular quando dietas com ácidos graxos poli-insaturados foram administrados. Tesarik e Mendoza (1995) demonstraram um efeito direto do E2 na fertilização e taxa de clivagem e, sugeriram um modelo em que o E2 influencia a superfície celular pelo aumento de cálcio livre intracelular que serve como um segundo mensageiro e contribui para a capacitação e desenvolvimento pós-fecundação.

Hawkins *et al.* (1995) observaram um maior tempo para a queda nos níveis sanguíneos de P4 após ovariectomia nas vacas suplementadas com gordura. Este resultado sugere que a alimentação com gordura tenha retardado a metabolização da P4 pelo fígado. Um experimento *in vitro* (Sangsritavong et al., 2002) reforçou essa hipótese demonstrando que ácidos graxos livres

(especialmente o ácido linolênico C18:3) retardaram o metabolismo de esteróides P4 e E2 em hepatócitos cultivados *in vitro*. Esse estudo, entretanto, utilizou quantidades de ácidos graxos que seriam impossíveis de serem fornecidas através da dieta em vacas. Em um trabalho *in vivo* (Sartori *et al.*, 2004) foi avaliado se a adição de óleo de linhaça, rico em C18:3, diretamente no abomaso e em quantidades possíveis de serem ingeridas diariamente, iria retardar o metabolismo de esteróides. Apesar de ter-se alterado o perfil plasmático de ácidos graxos, com um aumento de 46% de C18:3 (de 4,8 para 7,0% do total de ácidos graxos plasmáticos), não houve uma inibição aparente no metabolismo de P4 e E2.

2.2.2.2. Efeitos sobre a composição de ácidos graxos plasmáticos, no fluido folicular, nos oócitos e nos embriões.

Dietas suplementadas com fontes de ácidos graxos aumentam o percentual desses no soro sanguíneo e tal aumento depende da composição do suplemento ofertado (Filley *et al.*, 2000;). No trabalho de Childs *et al.* (2008) foram comparadas as variações de ácidos graxos plasmáticos decorrentes da suplementação dietética com sementes de soja ou óleo de peixe. A concentração plasmática de ácido linoleico foi maior no grupo que consumiu a semente de soja enquanto que as concentrações de eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) foram maiores nos animais que consumiram óleo de peixe.

O teor de ácido linoleico no fluido folicular e nos oócitos é aparentemente importante para o desenvolvimento da competência do oócito (Homa e Brown, 1992) e tem sido demonstrado ser importante para blastulação em estudos de fertilização *in vitro* (Zeron *et al.*, 2001). Já o EPA e o DHA derivados do ácido linolênico possuem efeito negativo na síntese de PGF_{2α} pelo endométrio (RAES *et al.*, 2004), o que é importante para a manutenção da gestação em animais recém-inseminados. Dessa forma não é suficiente mensurar a alteração do percentual plasmático desses ácidos graxos e sim quanto destes chegam até o ambiente intra-folicular.

Albuquerque (2007) realizou esta mensuração diferencial entre soro sanguíneo e fluido folicular em animais previamente alimentados com grãos de

canola (n – 6 e n – 9) ou de linhaça (n – 3) observando que, independente dos tratamentos o soro sanguíneo e o líquido folicular não possuem concentrações correlatas para alguns AG. Foi também relatado por esse autor que a linhaça em grãos, fonte rica em ácidos graxos da série n-3, não alterou as concentrações dos mesmos no líquido folicular. No entanto, a canola em grãos, adicionada a ração de vacas nelore, resultou em aumento nas concentrações de ácidos graxos da série n-6 e n-3 no líquido folicular. Tal variação pode ser explicada pelo tamanho diminuto da semente de linhaça, o que dificultaria a quebra da mesma no processo de mastigação e ruminação dos animais.

Petit (2002), ao adicionar linhaça ou semente de girassol em grãos e linhaça ou semente de girassol tratada com formaldeído em vacas holandesas, observaram que as concentrações plasmáticas de AG foram afetadas pela inclusão das sementes. As concentrações no soro sanguíneo aumentaram para os AG C14:0, C16:0, C18:1 c9, C18:3 n-3 e C20:5 n-3 devido a adição de linhaça em grãos em relação a semente de girassol e os AG C18:1 t9, C18:2 n-6 e o C18:3 n-6 diminuíram. Quanto ao tratamento com formaldeído, os autores observaram maiores concentrações para os AGs C18:1 c9 e C18:2 c6. Quanto à razão dos AGs da série n-6 e n-3, esta foi menor para o soro sanguíneo das vacas que consumiram linhaça.

Resultados conflitantes ainda são observados em pesquisas que objetivam melhora na qualidade de oócitos e embriões através do consumo alimentar de fontes de ácidos graxos. FOULADI-NASHTA et al., (2007) e SANTOS et al., (2008) defendem essa hipótese supondo que o desenvolvimento e a qualidade embrionária estariam relacionados a quantidade de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) na membrana celular, modificando as características referentes a fluidez e proteção a processos de estresse. Tanghavelu et al. (2007) também obtiveram resultados positivos suplementando vacas com fontes de PUFAs, onde foram produzidos embriões de melhor qualidade em relação ao grupo controle. Em contraste, diversos trabalhos não têm encontrado diferenças na qualidade e desenvolvimento de embriões produzidos *in vitro* oriundos de oócitos de doadoras suplementadas com lipídios (ADAMIAK et al., 2006; BILBY et al., 2006)

Oócitos de ruminantes contêm considerável quantidade de ácidos graxos (estimado em 63 µg/oócito) (McEVOY et al., 2000), sendo importantes

para utilização como fonte de energia durante a maturação oocitária. A concentração e o perfil de ácidos graxos poderiam então afetar a maturação do oócito diretamente, através da alteração da composição de ácidos graxos nos oócitos (BENDER et al., 2010), ou indiretamente, influenciando as concentrações de prostaglandina e de outros metabólitos no fluido folicular ao redor do oócito (FOULADI-NASHTA et al., 2009).

Os blastocistos obtidos a partir de ovócitos coletados de vacas alimentadas com dietas de alta concentração de gordura apresentaram maior número total de células, maior número de células do embrioblasto e trofoectoderma do que os obtidos do grupo baixa gordura, sugerindo melhor qualidade dos blastocistos, o que pode resultar em melhor desenvolvimento subsequente e maiores chances de sobrevivência (FOULADI-NASHTA et al., 2007). Os ácidos graxos poli-insaturados são componentes da membrana lipídica de todas as células inclusive das células embrionárias e, aumentam rapidamente conforme progride a divisão celular do embrião em desenvolvimento. Adicionalmente, embriões de melhor qualidade e de desenvolvimento avançado também possuem maiores concentrações de ácido graxo linoleico e menores de ácidos graxos saturados (HAGGARTY et al., 2006).

2.2.2.3. Efeito sobre a produção de embriões *in vitro*

Os ácidos graxos são componentes vitais das membranas biológicas e influenciam fortemente sua fluidez. Com o aumento dos ácidos graxos poli-insaturados a fluidez da membrana aumenta. Isso porque nos PUFAs as cadeias acil são extremamente flexíveis e podem mudar rapidamente seu estado conformacional. Assim, o número de duplas ligações influencia de forma significativa a fluidez da membrana.

Eles servem também como um importante mediador dos eventos nucleares regulando a expressão de genes específicos envolvidos no metabolismo lipídico e da glicose (Lombardo e Chicco, 2006). Ácidos graxos de cadeia longa inibem a síntese de gordura a partir de mecanismos de curto e longo prazo. Tais ácidos graxos são conhecidos inibidores alostéricos da atividade da acetil coenzima-A carboxilase (ACC) (curto prazo) e, dietas ricas

em ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) reduzem também a expressão do complexo ácido graxo sintase (FAS). Dessa forma minimiza-se a formação dos estoques de triacilgliceróis intracelulares.

Esse mecanismo pode amenizar um dos grandes problemas da produção de embriões *in vitro* (PIV), onde a presença de soro fetal bovino (SFB) nos meios de cultivo contribui significadamente para o acúmulo de lipídios intracelulares prejudiciais ao desenvolvimento embrionário (ABE et al., 1999; RIZOS et al., 2003). O aparente efeito negativo do soro pode ser atribuído à acelerada evolução embrionária que não permite tempo suficiente para ocorrência da cariocinese fisiológica. Assim, sistemas de produção de embriões PIV provocariam danos na integridade dos cromossomos, resultando em menor taxa de prenhez e alterações somáticas do embrião e do produto nascido (HENDRIKSEN *et al.* 2001; FARIN *et al.*, 2001). A adição de ácido linoleico conjugado trans-10 cis-12 ao meio de cultivo de embriões bovinos suplementado com soro fetal resultou em redução da síntese lipídica e em uma melhoria na congelabilidade dos embriões (Hochi et al.,1999; Pereira et al., 2006).

Outras funções do desenvolvimento embrionário podem ser atribuídas à utilização dos ácidos graxos como, por exemplo, a geração de água para o fluido da blastocela pela oxidação mitocondrial e, a compactação entre os blastômeros que precede a blastulação (McEVOY et al., 2000). Em vista disso o conhecimento dos grupamentos lipídicos presentes nos oócitos e consequentemente nos embriões, assim como a busca de formas de promover alterações desses grupamentos pode ser um caminho para incrementar a produção *in vitro* de embriões bovinos.

2.3. A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A espectrometria de massas pode ser entendida como uma técnica analítica que permite a identificação da composição química de um determinado composto isolado, ou de diferentes compostos em misturas complexas, através da determinação de suas massas moleculares na forma iônica, ou seja, com carga elétrica líquida, positiva ou negativa, baseada na sua

movimentação através de um campo elétrico ou magnético. Esta movimentação é determinada pela razão entre a massa de um determinado composto (analito) e sua carga líquida, designada por m/z (*mass to charge ratio*). Assim, conhecendo o valor de m/z de uma molécula é possível inferir sua composição química elementar, e com isso determinar sua estrutura (Van BRAMER, 1998; AEBERSOLD et al., 2003).

Uma vez que a espectrometria de massas mede a relação entre massa e carga, um espectrômetro de massas engloba uma *fonte de ionização* para a obtenção de íons, um *analisador de massas*, o qual separa os íons formados, um *detector* desses íons e um *sistema de aquisição dos dados*. Em geral, as fontes de ionização mais comumente empregadas são ESI (*Electrospray Ionization*) e MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) e os analisadores são os quadropolos, *íon-traps*, *time of flight (TOF)*, *Fourier-transform ion cyclotron resonance (FT-ICR)*, *orbitrap*, entre outros (GLISH et al., 2003).

Como técnica analítica das mais versáteis e das mais sensíveis, a espectrometria de massas (MS) é atualmente uma das ferramentas analíticas valiosas em diversos estudos nas áreas de Biologia, de Ciências Médicas e de Ciências Tecnológicas. Por MS é possível determinar a massa molecular e quantificar biomoléculas tais como proteínas, carboidratos, lipídeos e oligonucleotídeos, e também fragmentá-las de forma a elucidar sua estrutura e confirmar sua identificação (FERREIRA et al., 2009)

Na espectrometria de massa alguma forma de energia é transferida à amostra para causar a sua ionização. O requisito básico para uma análise por espectrometria de massa é a formação de íons livres em fase gasosa. O alcance e a utilidade do método de espectrometria de massa é ditado pelo processo de ionização. A aparência do espectro de massa de uma espécie molecular é altamente dependente do método de ionização usado. Os agentes ionizantes empregados em espectrometria de massa podem ser distribuídos em duas categorias: as que requerem a amostra em fase gasosa e os agentes que provocam dessorção em amostras sólidas ou líquidas. A vantagem dos últimos é que são aplicáveis a amostras não voláteis e termicamente instáveis. Este é o caso da técnica de espectrometria de massa com Ionização/dessorção por laser, assistido por uma matriz (MALDI).

2.3.1. Matrix-assisted laser desorption/ionization - MALDI

Métodos utilizados para a análise do perfil lipídico em embriões e ovócitos geralmente envolvem a extração seletiva a partir de um pool de muitas amostras seguido de manipulação química, separação e caracterização dos componentes individuais através de técnicas cromatográficas. Com a técnica de análise direta por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-MS) amostras individuais de oócitos e embriões podem ser analisadas quanto a sua composição lipídica (FERREIRA et al., 2010).

Na ionização por MALDI a amostra deve ser misturada a uma matriz específica que auxiliará na sua ionização, esta matriz quando seca cristaliza-se juntamente com a analito. Assim, a transferência de energia por MALDI ocorre através da irradiação pulsada de laser, a matriz energizada converte a energia do laser em energia para a excitação do analito, promovendo sua ionização. Esta forma de transferência de energia é eficiente na obtenção de moléculas intactas, já que elas não sofrem incidência direta da excessiva energia do laser, o que poderia causar sua decomposição. Este processo ocorre em uma câmara sob vácuo e os íons então formados na fase gasosa são acelerados por campos eletrostáticos em direção ao analisador (HOFFMANN e STROOBANT, 2007; DASS, 2007).

Existe uma grande variedade de matrizes que podem ser utilizadas em MALDI, constituídas principalmente de compostos aromáticos. As fontes de laser também podem variar, no entanto a mais comum é a de N₂, com comprimento de onda de 337 nm. Os íons formados apresentam-se de modo geral protonados monocarregados em modo positivo, desprotonados em modo negativo. Contudo, não é incomum de serem formados íons com duas ou mais cargas, ou com adutores como Na⁺ ou K⁺ (HOFFMANN e STROOBANT, 2007; DASS, 2007).

O potencial de aplicação da MS em estudos biológicos tem sido bastante estendido, em razão dos impressionantes avanços observados nos últimos anos nas áreas de genômica, de transcriptômica, de metabolômica, de proteômica, de lipidômica e de outras plataformas “*omics*”, e do desenvolvimento extraordinário dos equipamentos (FERREIRA et al., 2009).

Nesse sentido, técnicas como as de ionização por *electrospray* – ESI (FENN et al., 1989, 1990) e de ionização e dessorção a laser assistida por matriz – MALDI (KARAS e HILLENKAMP, 1988), consideradas técnicas de ionização branda, permitiram a produção de íons com base em compostos de alta massa molecular e não-voláteis, estendendo a aplicação da MS a todos os tipos de moléculas.

De particular importância na produção animal, são analisados por MALDI produtos lácteos (COZZOLINO et al., 2001), contaminantes de substâncias de uso veterinário e alterações dos meios de cultivo embrionário (FERREIRA et al., 2009b), alterações epigenéticas em animais clonados (SONG et al., 2009), componentes do fluido folicular ligados a fertilidade e/ou a patologias reprodutivas (FUCHS e SCHILLER, 2008; MONTANI et al., 2012), o mesmo relacionado ao soro sanguíneo seminal (FUCHS et al., 2008), além de composições descritivas de gametas e embriões permitindo a análise da qualidade e do potencial de desenvolvimento dos mesmos (SCHILLER et al., 2004, 2007; FERREIRA et al., 2008)

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. 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 no dia 23/02/2011 foi realizada a última aspiração folicular e última sessão de produção de embriões *in vitro*. As temperaturas média máximas e mínimas foram de 31,8°C e 23,3°C com média pluviométrica de 2,76mm no período.

A produção *in vitro* dos embriões foi realizada no setor de Tecnologia de Embriões do Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal (LRMGA) do departamento de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF).

As análises de concentração de progesterona e estrógeno foram realizadas também no Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal (LRMGA); e as concentrações de triglicerídeos, colesterol total e HDL foram realizadas no Laboratório de Sanidade Animal (LSA), ambos do departamento de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF).

As análises do percentual de composição lipídica do soro sanguíneo, líquido folicular, oócitos e embriões foram realizados no laboratório Dalton de espectrometria de massas na Universidade de Campinas (UNICAMP).

3.2. Animais e Área experimental

Foram utilizadas 20 novilhas mestiças ($\frac{3}{4}$ nelore e $\frac{1}{4}$ limousin), com 24 meses de idade, peso médio de 330 Kg e escore de condição corporal média de $3 \pm 0,5$ (escala de 1 a 5). Todas as novilhas foram previamente avaliadas quanto sua ciclicidade, normalidade do aparelho reprodutivo e ausência de enfermidades.

As novilhas foram aleatoriamente distribuídas entre os quatro tratamentos ($n = 5$ animais/ tratamento). Os animais foram mantidos a pasto

(*Brachiaria brizantha*) com água e sal mineral à vontade. Para o fornecimento do concentrado (dieta experimental) o curral de manejo foi dividido em quatro partes cada parte com cocho individual para cada animal onde foi fornecida a suplementação.

Todos os animais permaneceram juntos no mesmo pasto e diariamente, às 7 horas da manhã foram conduzidos ao curral de manejo. No centro do curral os animais foram separados de acordo com cada grupo experimental para receberem a ração com o suplemento específico. O fornecimento individualizado do suplemento permitiu controlar a quantidade consumida por animal, permitindo dessa maneira que o animal fosse, inicialmente, à unidade experimental.

3.3. Dieta experimental e tratamentos

O período de alimentação total foi de 70 dias, que correspondem a 40 dias de alimentação inicial (período de adaptação) e 30 dias de período das aspirações foliculares semanais (período experimental). As rações foram isoenergéticas e isoproteicas, utilizando fubá de milho, farelo de soja e farelo de trigo, acrescidas de diferentes fontes de ácidos graxos poli-insaturados dependendo do tratamento proposto. O grupo controle recebeu apenas a ração base. A cada animal foram fornecidos 4,5 Kg de concentrado diariamente no período da manhã. Na tabela 1 pode-se observar a composição de cada grupo.

Tabela 1. Composição percentual dos ingredientes das dietas experimentais (% / base matéria seca) (Tratamento TR)

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

Tabela 2: Composição centesimal dos óleos utilizados nas dietas

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

Os tratamentos consistiram de diferentes fontes de óleos vegetais suplementados na ração farelada:

- Controle (Tcont): Animais em pastejo recebendo suplemento isoenergético e isoproteico sem inclusão de fonte extra de ácidos graxos poli-insaturados (controle).
- Suplemento óleo de canola (Tcan): Animais em pastejo recebendo suplementos formulado com inclusão de óleo de canola.
- Suplemento óleo de soja (Tsoj): Animais em pastejo recebendo suplementos formulado com inclusão de óleo de soja.

- Suplemento óleo de girassol (Tgir): Animais em pastejo recebendo suplementos formulado com inclusão de óleo de girassol.

3.4. Coleta de soro sanguíneo e líquido folicular

Amostras de soro sanguíneo foram coletadas semanalmente de todos os animais durante todo o período experimental (adaptação +aspirações) para posterior análise: dos perfis hormonais por quimioluminescência, da concentração de triglicerídeos, colesterol total e HDL por espectrofotometria, assim como do seu perfil lipídico por MALDI - MS.

O soro sanguíneo foi coletado na veia coccígea com agulha de 20G e tubos a vácuo. No laboratório o material foi centrifugado a 3000 x g por 10 minutos e o soro estocado a temperatura de -80°C até a realização das análises.

O fluido folicular foi coletado durante o mesmo período por *ovum pick up (OPU)*. Foi aspirado o fluido do maior folículo visualizado em cada animal e o conteúdo recuperado foi redistribuído de acordo com o grupo experimental caracterizando um pool de líquido folicular por cada tratamento. Esse material também foi estocado a -80°C para as mesmas análises mencionadas acima.

3.5. Aspiração folicular *in vivo ovum pick up (OPU)*

O procedimento de aspiração folicular foi realizado utilizando-se equipamento de ultrassom DPS 2200 (Mindray) com transdutor microconvexo de 7,5 MHz, conectado a guia de biópsia; com agulhas 20 G (WTA®) e linha de aspiração (WTA®) em tubos de centrífuga de 50 mL. A pressão de vácuo foi mantida entre 50 e 70 mmHg. com auxílio de uma bomba BV-003 (WTA®)

Para evitar movimentos peristálticos e desconforto ao animal foi feita anestesia epidural com 3,0 mL de Lidocaína a 2% (Pearson®) e em seguida o transdutor foi inserido até o fundo vaginal e, com o auxílio da manipulação transretal, os ovários foram 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 foi 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®) acrescido 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 foram agrupados e transportados em criotubos contendo meio MIV-T (Nutricell®) recoberto com óleo mineral, até o Setor de Tecnologia de Embriões, do Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal (LRMGA), da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF).

3.6. Produção *in vitro* de embriões (PIV)

No laboratório os complexos *cumulus oophorus* (CCOs) selecionados foram lavados em meio de manipulação e em seguida transferidos para o meio de maturação comercial (Nutricell®), em gotas de 100µL, 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 cônico 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 ressuspendido 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 CCOs maturados foram lavados em meio de fecundação comercial (Nutricell®) e transferidos para gotas de fecundação (100 µL) previamente preparadas as quais continham o sêmen selecionado pelo método de percoll

numa concentração de 2×10^6 espermatozoides/mL. A FIV foi realizada por 18 horas em incubadora, nas mesmas condições da 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 μ L desse meio em incubadora a 38,5°C, com 5% de CO₂, em ar atmosférico e 95% de umidade. Decorridas 72 horas do início do cultivo *in vitro*, foi avaliada a taxa de clivagem e renovado 50% do meio de cultivo em cada gota. Duas outras avaliações, nos dias sete e oito de cultivo foram feitas para determinar o número total de blastocistos produzido.

3.7. MALDI-TOF MS

3.7.1. Extração de lipídeos do soro sanguíneo e líquido folicular

A extração de lipídeos foi realizada utilizando-se o protocolo de Bligh e Dyer (1986) modificado. Inicialmente 50 μ L de água destilada foram adicionados aos tubos contendo cada amostra coletada. Foram adicionados 125 μ L de clorofórmio e 250 μ L de metanol. Após a homogeneização, foram adicionados mais 100 μ L de água destilada e 125 μ L de clorofórmio. As amostras foram então submetidas à centrifugação a 500 x g por 5 minutos e 200 μ L da fase orgânica contendo os lipídeos, foram transferidos para um novo tubo, que permaneceu aberto à temperatura ambiente para a evaporação do solvente.

3.7.2. Determinação das classes lipídicas

A identificação dos lipídios das amostras foi realizada utilizando-se o MALDI-TOF MS, em um MALDI SYNAPT Q-TOF (Waters, Manchester, UK). Para isso 10 μ L de clorofórmio foram adicionados aos lipídeos extraídos e 2 μ L dessa mistura foi aplicada a placa metálica específica do equipamento. Em seguida as amostras foram cobertas com 1 μ L de matriz ácida 2,5-dihidroxibenzóico, em modo positivo na faixa de 400 – 1000 *m/z*. Cada espectro foi adquirido por 45 segundos, com energia do laser de 250 a.u (unidade arbitrária).

No caso dos oócitos e embriões, estes não passaram pelo processo de extração de lipídios. As amostras foram pipetadas diretamente sob a placa de MALDI e cobertas com 1µL de matriz ácida 2,5-di-hidroxibenzóico, em modo positivo na faixa de 400 – 1000 *m/z*. Cada espectro foi adquirido por 45 segundos, com energia do laser de 250 a.u (unidade arbitrária).

3.8. Quimioluminescência

Para as análises de progesterona e estradiol no soro sanguíneo e líquido folicular coletados utilizou-se o método enzimático de imunoquimioluminescência automatizada, com processamento em um analisador Immulite 1000 (Diagnostic Products Corporation – DPC) e um mesmo *kit* empregado para as dosagens de cada hormônio específico (Immulite® estradiol, Immulite® progesterona). As dosagens hormonais foram realizadas no Laboratório de Melhoramento Genético e Reprodução Animal (LRMGA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF).

3.9. Espectrofotometria

Para as análises de triglicerídeos, colesterol total e HDL no soro sanguíneo e líquido folicular coletados utilizou-se o método enzimático realizado pelo espectrofotômetro que se baseia na análise da concentração de cor, sendo diretamente proporcional à quantidade em mg/dL dos metabólitos encontrada nas amostras. Tal análise foi realizada no Laboratório de Sanidade Animal (LSA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF) com o aparelho analisador Biosystems BTS – 310 e kits comerciais da marca Labtest.

3.10. Análise estatística

3.10.1. Taxa de clivagem, taxa de blastocisto e perfis metabólicos no soro sanguíneo e líquido folicular

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com o número de tratamentos variando conforme a repetições (quatro sessões de OPU), com um intervalo de 8 dias.

As características estudadas foram *a priori* transformadas pela equação $Y' = 2 \arcsin \sqrt{0.01p}$. Entretanto, para apresentação dos resultados, a variável foi reescalada em porcentagem por meio da expressão $\hat{p} = [\sin(\hat{Y}'/2)]^2$. Em seguida, as variáveis foram ajustadas ao seguinte modelo estatístico: $Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + v_{j(i)} + p_k + \alpha p_{ik} + e_{ijk}$ no qual Y_{ijk} corresponde ao valor observado das variáveis estudadas, medidas no animal “j”, que recebeu o tratamento “i”, por ocasião da aspiração “k”. A constante μ é inerente ao modelo, α_i representa o efeito do tratamento “i”, $v_{j(i)}$ corresponde à vaca “j”, p_k representa as “k” semanas de realização das aspirações, αp_{ik} representa o efeito da interação tratamento vs. semana, e e_{ijk} corresponde ao erro aleatório, suposto normal e independentemente distribuído, com média zero e variância σ^2 . Porém, como se tratou de medidas repetidas no tempo sobre as mesmas unidades experimentais, foram então estudadas diferentes opções de estruturas de variâncias e covariâncias (Σ), sendo elas: componentes de variância, simetria composta com correlação constante entre as medidas repetidas, estrutura autorregressiva para as correlações entre medidas repetidas, e a estrutura irrestrita de variâncias e covariâncias (Littell et al., 1998). O procedimento de escolha da melhor estrutura para Σ foi efetuado segundo o cômputo do critério de Akaike (Akaike, 1974) e com base na probabilidade de verossimilhança e na razão de evidência dele derivados (Burnham and Anderson, 2004). As comparações dos valores de verossimilhança foram efetuadas segundo os cálculos e critérios de escolha sugeridos por (Vieira et al., 2012).

As variáveis taxa de clivagem, taxa de blastocisto e perfis metabólicos no soro sanguíneo e líquido folicular, foram agrupados por semana. Desta forma, a estimativa variância residual foi obtida por meio da regressão dos valores medidos em função das semanas de ocorrência das punções. As variáveis listadas foram analisadas por regressão linear robusta por meio do procedimento ROBUSTREG do SAS (V.9, SAS system inc Cary, NC, USA).

3.10.2. Análise de perfil lipídico

Os espectros de cada amostra foram acumulados usando o software MarkerLynx 4.1 (Waters, Manchester, UK) e exportados para análise de componentes principais (ACP) e análise ortogonal discriminante pelos quadrados mínimos (OPLS-DA) no software MarkerLynx™ XS (Waters, Manchester, UK). Os parâmetros utilizados foram: tolerância de massa 0,5 Da, linha de base do ruído 0,50 e intensidade limiar (contagem) 1000 com dados deisotopizados.

O gráfico VIP (*variable importance in the projection*) da análise de OPLS-DA forneceu uma lista de íons responsáveis pelas diferenças entre os grupos, e as subclasses lipídicas foram procuradas no banco de dados LipidMaps (<http://www.lipidmaps.org>). Foi adotada tolerância de massa de 0,1 Da e somente hidrogênio (H⁺), sódio (Na⁺) e potássio (K⁺) como adutos. O erro de massa foi calculado em ppm (partes por milhão) para todos os íons encontrado e foi considerado o íons somente quando o erro de massa foi ≤ 50 ppm. Caso mais de uma classe lipídica fosse identificada com erro de massa ≤ 50 ppm, foi considerada aquela que apresentou o menor erro.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação morfológica tem sido rotineiramente utilizada como critério para selecionar complexos *cumulus oophorus* (CCOs) de melhor qualidade. Entretanto é conhecido que a avaliação morfológica por si só é insuficiente para distinguir CCOs mais competentes para serem fertilizados (Lonergan et al., 2003). Tal afirmativa está de acordo com as taxas de clivagem iniciais encontradas neste trabalho, as quais se mostraram crescentes durante o período experimental, tanto no grupo canola, onde os CCOs apresentaram boas características morfológicas, como no grupo soja, onde ao contrário, os CCOs eram de pior qualidade em comparação aos demais tratamentos (Figura 3). No entanto pode-se observar que no grupo canola o aumento na taxa de clivagem inicial foi mais rápido e mais intenso que no grupo soja, sugerindo que algum componente desse alimento poderia estar favorecendo o processo.

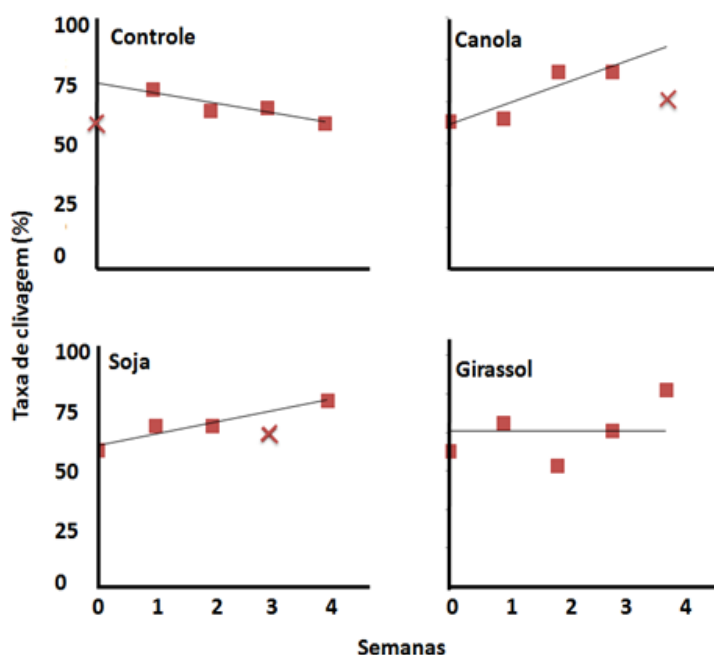


Figura 3: Representação gráfica das taxas de clivagem inicial dos embriões produzidos *in vitro* a partir de oócitos de novilhas suplementadas com diferentes fontes de ácidos graxos, durante as diferentes semanas do experimento.

Já no oitavo dia após a fertilização (D8), a taxa de produção de blastocistos nos tratamentos canola e soja se mantiveram constantes no tempo apesar dos valores encontrados no grupo canola apresentarem-se mais elevados (60 %) desde o início do período experimental, reforçando a ideia

anterior. Ao contrário os animais do grupo girassol taxas de blastocisto semelhantes ao encontrados no grupo suplementado com óleo de soja (35 e 40%, respectivamente). No entanto a taxa de blastocisto dos animais suplementados com girassol apresentou um aumento acentuado ao longo do tempo, ultrapassando os 70 % ao final do período experimental.

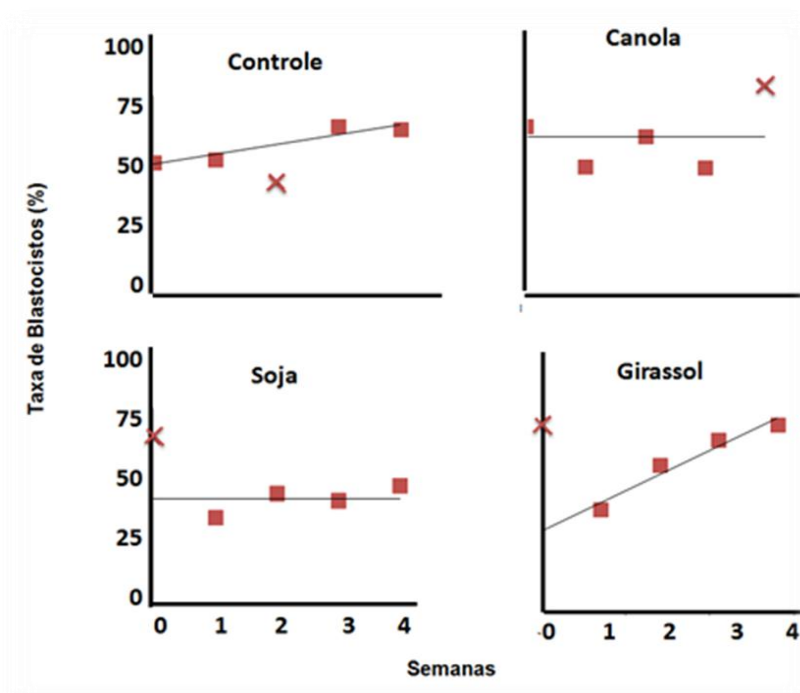


Figura 4: Representação gráfica das taxas de blastocistos no D8 a partir de ovócitos de novilhas suplementadas com diferentes fontes de ácidos graxos, durante as diferentes semanas do experimento.

Estudos em gametas e embriões de mamíferos indicaram que a composição de ácidos graxos afeta a maturação oocitária, a fertilidade e o desenvolvimento embrionário *in vitro* (KHANDOKER e TSUJII, 1999), uma vez que os lipídios possuem várias funções químicas, e de mensageiros intracelulares (Sanvido, 2012). O estudo da composição lipídica dos oócitos utilizados para de produção *in vitro* de embriões, assim como do líquido folicular responsável pelo seu desenvolvimento, do sangue que origina tal líquido e dos consequentes embriões formados pode ajudar a elucidar a composição de ácidos graxos que seria mais propícia a um eficiente desenvolvimento embrionário. Nesse intuito o MALDI-TOF/MS tem

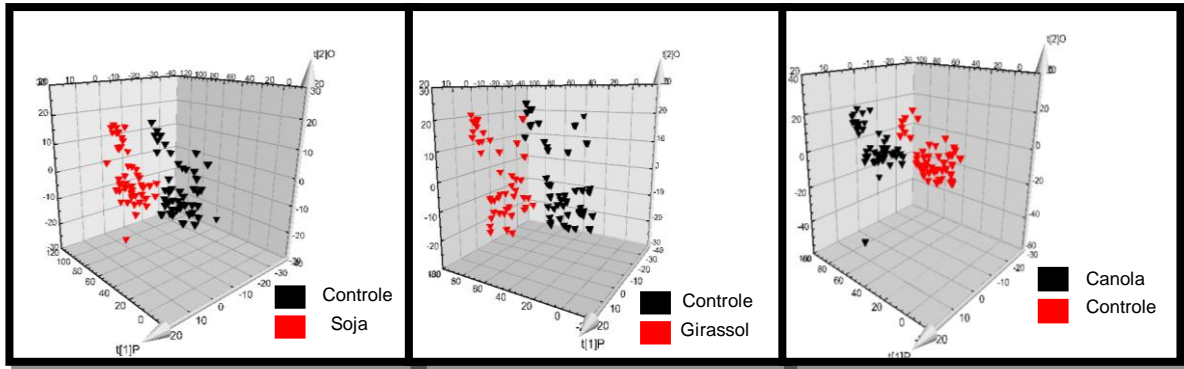
apresentado resultados eficientes na separação de compostos lipídicos em amostras biológicas (Ferreira et al.,2009).

Análises multivariadas tais como PCA e OPLS-DA foram realizados nos dados pré-processados do MALDI-TOF-MS incluindo a intensidade relativa de íons e os valores m/z , para entender a diferença nos perfis lipídicos. O gráfico VIP da análise de OPLS-DA foi utilizado para seleção dos íons responsáveis pela diferença entre o grupo controle e cada tratamento individual. O critério utilizado para seleção foi o primeiro ponto de inflexão da curva, por isso, considerou-se os íons com maior poder discriminante entre os grupos.

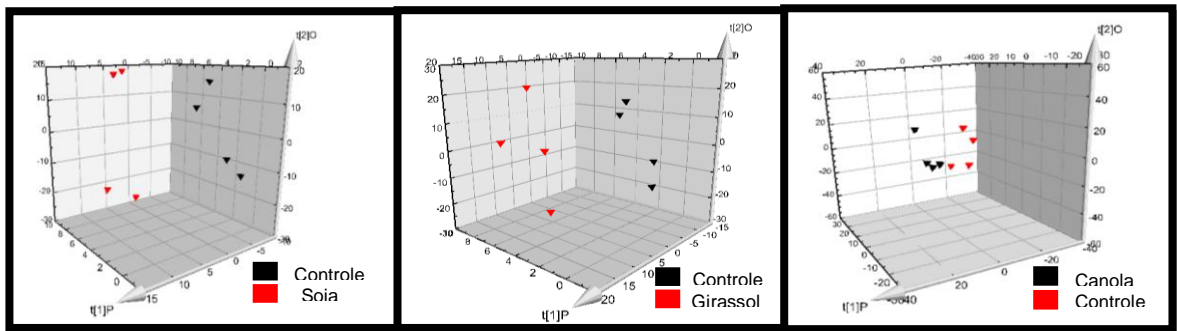
A separação dos grupos pela OPLSA-DA entre o grupo controle e os tratamentos utilizados estão ilustrados na Figura 5, que se refere às separações observadas nas amostras de soro sanguíneo; líquido folicular; oócitos e, embriões. Pode-se observar que a forma de análise foi eficiente em separar os compostos identificados no grupo controle e em cada tratamento individualmente corroborando os dados obtidos por Ferreira et al. (2010) que descreveram o perfil lipídico de oócitos e embriões de várias espécies utilizando a mesma metodologia.

Uma vez que o bom desenvolvimento embrionário depende da competência oocitária adquirida durante a foliculogênese (Sirard et al., 2003) e que a adequada maturação folicular produz oócitos capazes de resultar em bons embriões e conseqüentemente em prenhez (Eppig, 2001), a análise das concentrações hormonais, assim como do percentual lipídico do sangue e líquido folicular refletem o ambiente *in vivo* no qual os oócitos iniciaram seu desenvolvimento.

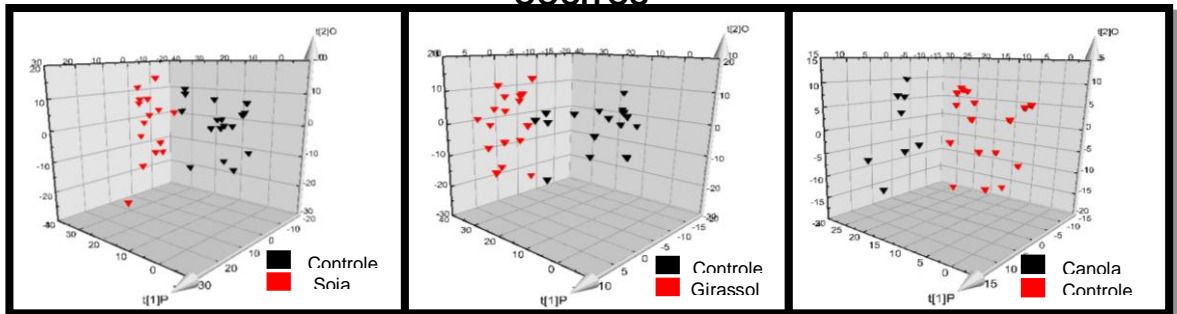
SORO SANGUÍNEO



LÍQUIDO FOLICULAR



OÓCITOS



EMBRIÕES

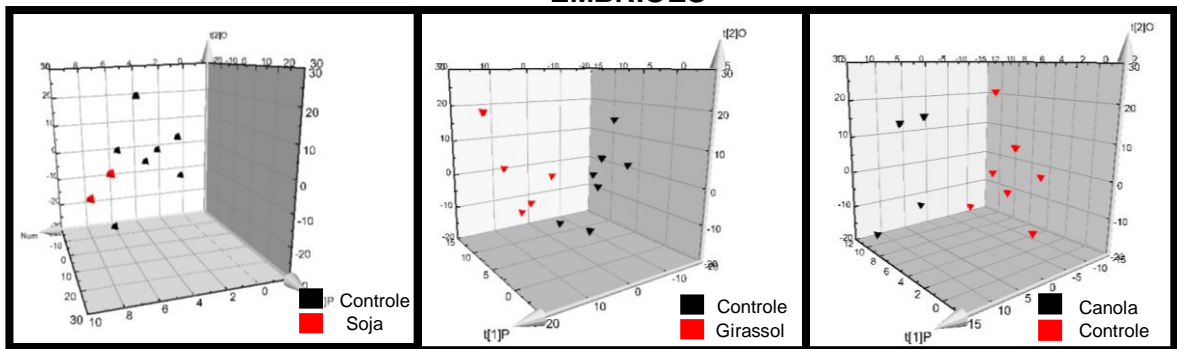


Figura 5: Separação dos grupos pela OPLSA-DA entre o grupo controle e os tratamentos em amostras de soro sanguíneo, líquido folicular, oócitos e embriões.

As concentrações séricas e intra-foliculares de triglicerídeos se mostraram estáveis ao longo do período experimental, sem diferenças

significativas entre os tratamentos (Figura 6). Dados semelhantes foram observados por Silveira et al. (2006) em bovinos de leite. Esses autores demonstraram uma redução da concentração de triglicerídeos séricos nas vacas em lactação, que não foram suplementadas com lipídios na dieta. Porém naquelas vacas que receberam dieta suplementada com lipídios a concentração de triglicerídeos séricos se manteve estável.

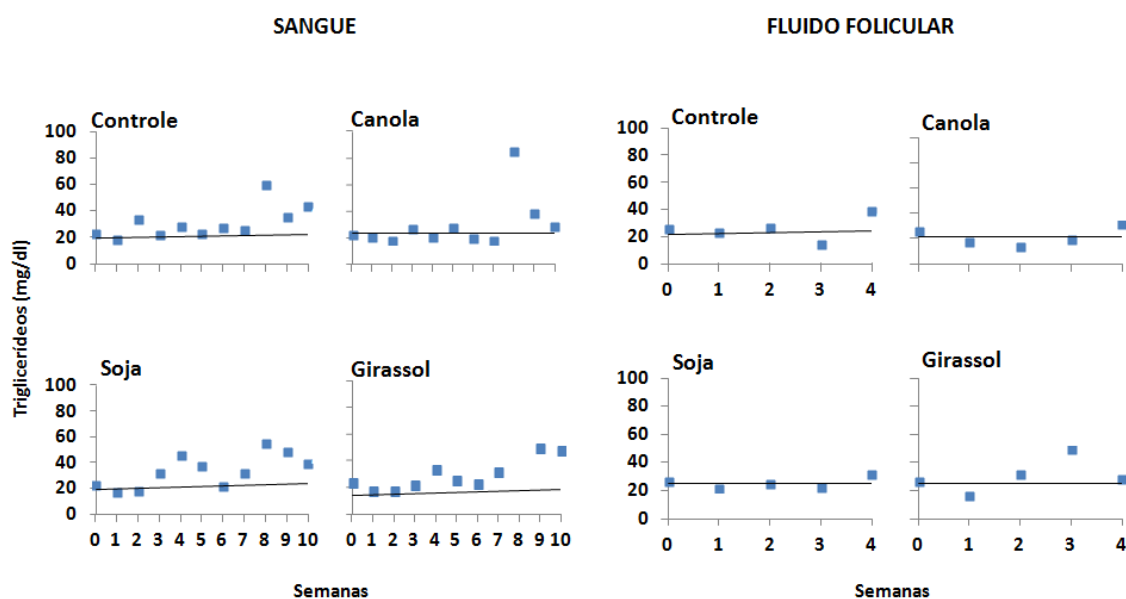


Figura 6: Níveis de triglicerídeos no soro sanguíneo e no fluido folicular de novilhas suplementadas com óleo de canola, de soja e de girassol, ao longo tempo (semanas).

Apesar das doadoras do grupo suplementado com óleo de canola terem apresentado uma concentração sérica de colesterol mais elevada que as do grupo controle durante todo o período experimental, essa concentração se manteve constante no tempo (Figura 7). Segundo Wanken (2001), o grande percentual de ácido oleico encontrado no óleo de canola seria o responsável por manter constantes os níveis séricos de colesterol.

As concentrações séricas de colesterol total aumentaram durante o período experimental nos animais suplementados com óleo de soja, e de maneira mais acentuada naqueles suplementados com óleo de girassol, porém esse aumento não foi observado no líquido folicular (Figura 7). Tal resultado pode ter ocorrido pelo fato de os depósitos lipídicos dos ruminantes serem poucos sujeitos a mudanças dietéticas, mesmo quando o animal recebe

quantidades substanciais de óleos ou gorduras insaturadas (PEIXOTO et al., 1995). Esses dados confrontam a afirmação de Nogueira (2008) de que a administração de gordura alimentar para fêmeas bovinas, estimularia a síntese e o acúmulo de colesterol e seus ésteres nos tecidos e fluidos corporais, inclusive nos ovários.

No nosso trabalho foi constatada um benefício da suplementação alimentar das doadoras com óleo de girassol em relação ao incremento na taxa de blastocistos ao longo do tratamento, o que pode estar relacionado ao aumento da concentração de colesterol total nas doadoras desse grupo, uma vez que o colesterol é precursor de hormônios esteroides envolvidos em vários eventos fisiológicos da reprodução.

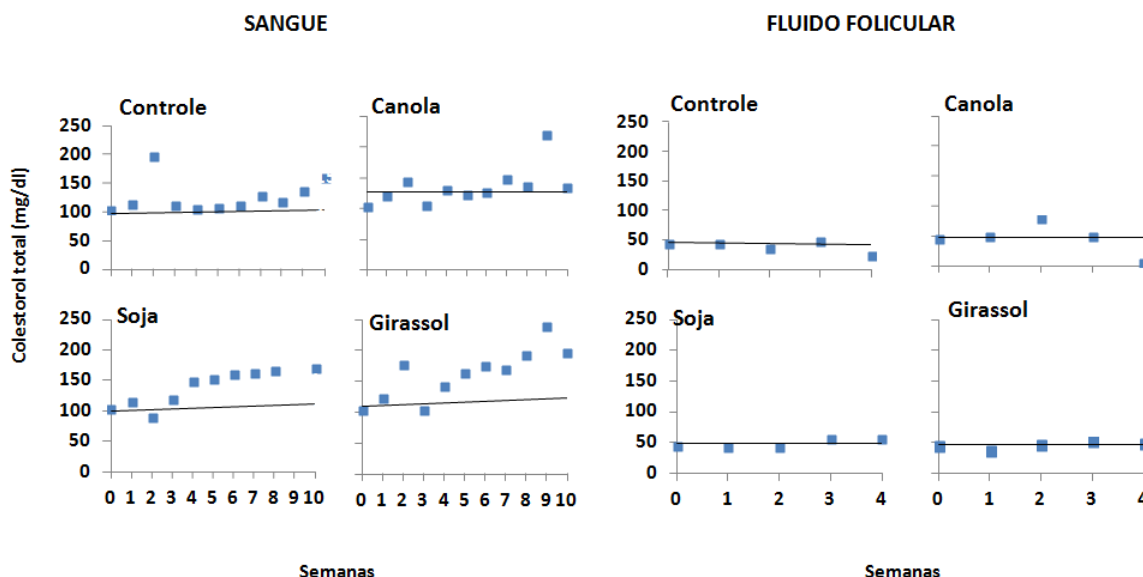


Figura 7: Concentração de colesterol total no soro sanguíneo e no fluido folicular de novilhas suplementadas com óleo de canola, de soja e girassol, ao longo tempo (semanas)

O transporte do colesterol plasmático para os tecidos é dependente da ação das lipoproteínas de alta densidade (HDL). Segundo Grummer e Carroll (1988) e Staples et al. (1998), as concentrações plasmáticas de colesterol e as lipoproteínas de alto e baixo peso molecular, encontram-se aumentadas em dietas onde são incorporadas fontes lipídicas. No nosso trabalho o aumento da concentração de lipoproteínas de alta densidade (HDL) no sangue foi

observado apenas no grupo girassol (Figura 8), seguindo um padrão semelhante ao do colesterol total desse grupo (Figura 7).

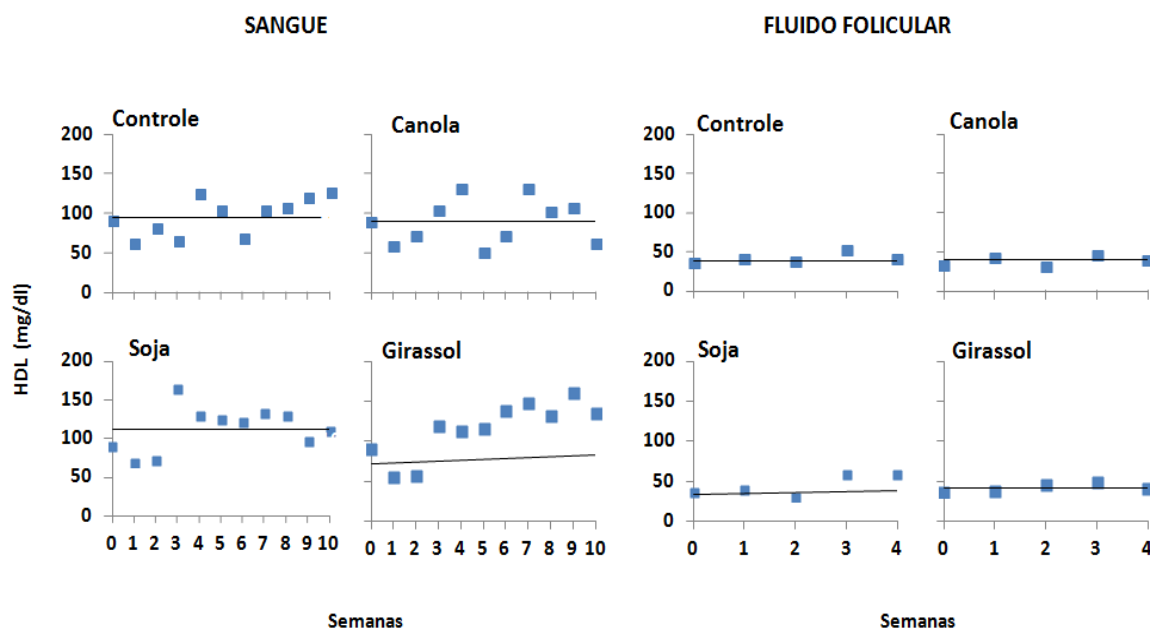


Figura 8: Concentração de HDL no soro sanguíneo e no fluido folicular de novilhas suplementadas com óleo de canola, de soja e girassol, ao longo tempo (semanas).

Na análise realizada pelo MALDI do soro sanguíneo dos animais tratados, quando comparados o grupo canola em relação ao grupo controle, todos os compostos identificados como lipídios encontraram-se no grupo controle o que sugere que a suplementação alimentar, nesse grupo, não promoveu mudanças em relação a composição centesimal de lipídios no soro.

Tabela 3: Íons de lipídeos do soro sanguíneo que diferiram entre os grupos controle e canola

AMOSTRA	m/z	TRATAMENTO	Aduto	Classe lipídica	Possíveis estruturas	Erro de massa (PPM)
PLASMA SANGUÍNEO	671,4774	CONTROLE	M+Na	PE	PE-Cer(d14:1(4E)/18:0(2OH))	5,81
	617,3293	CONTROLE	M+K	PR	Isoprenoids	15,87
	673,5870	CONTROLE	M+Na	CE	CE(18:1(9Z))	3,56
				ST	Sterols	
				ST	Sterols	
	604,4693	CONTROLE	M+K	CE	Cer(d15:2(4E,6E)/20:0(2OH))	1,49
	632,5570	CONTROLE	M+H	CE	Cer(d14:1(4E)/24:0(2OH))	2,85
					Cer(d16:1(4E)/22:0(2OH))	
	633,5112	CONTROLE	M+K	CE	CE(14:1(9Z))	16,57
	521,2875	CONTROLE	M+Na	ST	Cholesterol and derivatives	0,19
576,1928	CONTROLE			NÃO IDENTIFICADO		

Compostos lipídicos encontrados no grupo controle: PE – fosfatidiletalona; PR – Isoprenoides; CE – ceramidas; ST – esteróides conjugados

As vacas suplementadas com óleo de girassol apresentaram um composto identificado como um esteroide conjugado (ST) (Tabela 4) no soro sanguíneo. Esse achado pode estar relacionado com a maior concentração de colesterol plasmático e maior produção de hormônios esteróides como a progesterona e estrógeno uma vez que tais hormônios são produzidos a partir do colesterol. Considerando que, a síntese “*de novo*”, a partir do acetato no tecido luteal é insuficiente para manter sua função normal, acredita-se que o aumento da concentração de colesterol, por meio da alimentação, possa interferir na função do corpo lúteo (Williamsnola e Stanko, 1999). Tal situação foi evidenciada nos grupos que foram suplementados com óleo de canola e girassol, cujas fêmeas apresentaram concentrações de colesterol sérico maiores que as do grupo controle (Figura 7), o que possivelmente repercutiu no aumento das concentrações intra-foliculares de progesterona nos animais desses grupos (Figura 9).

Tabela 4: Classe de lipídeos sanguíneos que diferiram entre os grupos controle e Girassol

AMOSTRA	m/z	TRATAMENTO	Aduto	Classe lipídica	Possíveis estruturas	Erro de massa (PPM)
PLASMA SANGUÍNEO	653,3312	GIRASSOL	M+K	ST	Steroid conjugates	2,14

Compostos lipídicos encontrados no grupo girassol: ST – esteroides conjugados

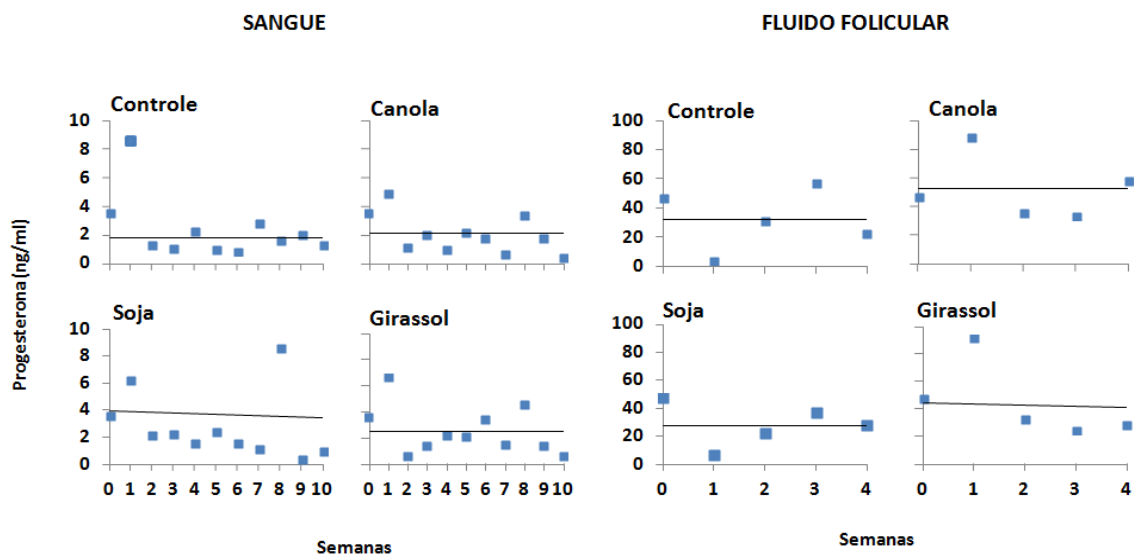


Figura 9: Níveis de progesterona no soro sanguíneo e no fluido folicular de novilhas suplementadas com óleo de canola, de soja e girassol, ao longo do tempo (semanas).

Os animais que receberam óleo de soja como suplemento alimentar também apresentaram um aumento da concentração de colesterol total no soro sanguíneo (Figura 7), porém não foi observado aumento na concentração de progesterona no fluido folicular dos animais desse grupo, em relação ao controle (Figura 9). Na análise do perfil lipídico sérico desses animais não foram detectados os esteroides totais, encontrados no soro sanguíneo dos animais suplementados com óleo de canola e girassol.

Ao contrário, nos animais do grupo soja foram identificados os compostos fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS) e fosfatidilinositol (PI), os quais não estavam presentes no grupo controle (Tabela 5). Por sua vez, nas amostras sanguíneas dos animais desse grupo foi detectado o composto diacilglicerol (DAG) (Tabela 5), o qual foi ausente no soro sanguíneo de animais que consumiram a soja. A fosfatidiletanolamina é um glicofosfolípido derivado do ácido fosfatídico, responsável pela sinalização

celular, constituinte de membranas biológicas e que participa na formação de triacilgliceróis (TG) (Nelson e Cox, 2004), o que pode ser relacionado ao aumento do colesterol sérico nesses animais. Os demais compostos são constituintes de membranas plasmáticas ou compostos responsáveis pela sinalização celular (Fadok et al., 1992; Caballero et al., 2010; Niebergall e Vance, 2012).

Tabela 5: Íons de lipídeos de soro sanguíneo que diferiram entre os grupos controle e soja

AMOSTRA	m/z	TRATAMENTO	Aduto	Classe lipídica	Possíveis estruturas	Erro de massa (PPM)
PLASMA SANGÜÍNEO	523,3706	CONTROLE	M+K	DAG	DG(13:0/13:0/0:0)	10,13
	926,6291	SOJA	M+K	PS	PS(21:0/22:1(11Z)) PS(22:1(11Z)/21:0)	4,75
	862,9164	SOJA	X	NÃO IDENTIFICADO	X	X
	597,2614	SOJA	M+K	PI	PI(15:0/0:0)	29,64
	852,9883	SOJA	X	NÃO IDENTIFICADO	X	X
	722,4119	SOJA	M+K	PE	PE(12:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)) PE(14:1(9Z)/18:3(6Z,9Z,12Z)) PE(14:1(9Z)/18:3(9Z,12Z,15Z)) PE(18:3(9Z,12Z,15Z)/14:1(9Z)) PE(18:3(9Z,12Z,15Z)/14:1(9Z)) PE(18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)/14:0) PE(20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)/12:0) PE(14:0/18:4(6Z,9Z,12Z,15Z))	5,40
	844,9659	SOJA	X	NÃO IDENTIFICADO	X	X

Compostos lipídicos encontrados no grupo soja: PS – fosfatidilserina; PE – fosfatidiletalona; PI - fosfatidilinositol

As concentrações séricas de estradiol reduziram em todos os tratamentos a partir da quarta semana do experimento, momento no qual se encerrou o período de adaptação (somente o folículo dominante era aspirado) e se iniciaram as aspirações de todos os folículos visualizados, para produção *in vitro* de (Figura 10).

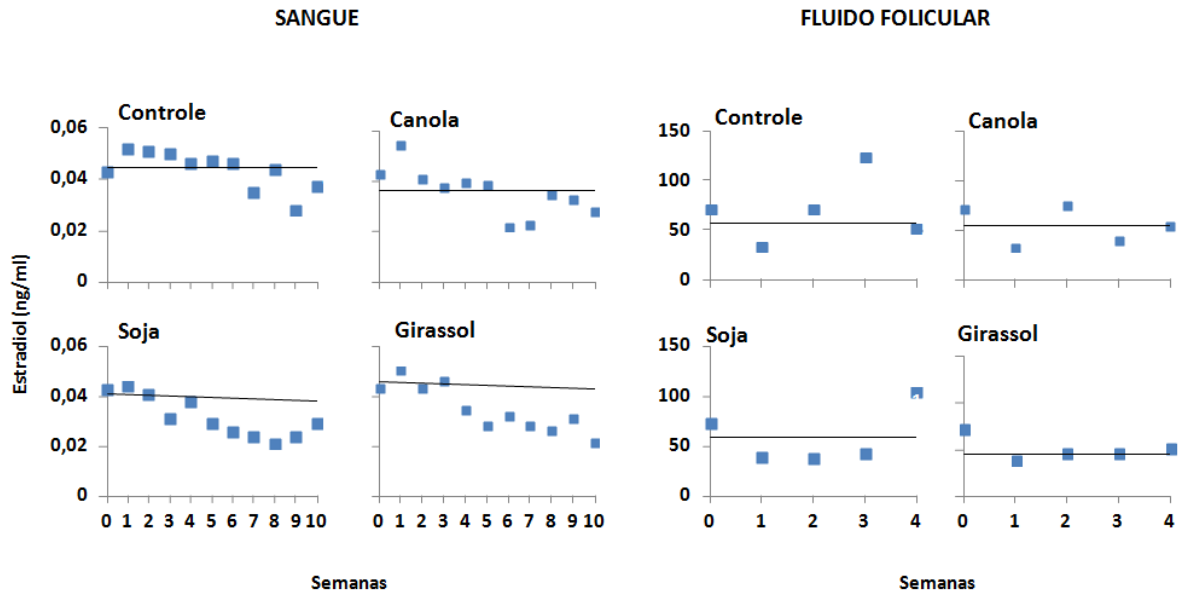


Figura 10: Níveis de estradiol no soro sanguíneo e no fluido folicular de novilhas suplementadas com óleo de canola, de soja e girassol, ao longo tempo (semanas).

No líquido folicular das doadoras que receberam óleo de girassol foram identificadas as seguintes subclasses lipídicas fosfatidilinositol conjugado a ceramidas (PI-Cer) e fosfatidil serinas (PS) (Tabela 6). Fosfatidilinositóis são substâncias que funcionam como segundos mensageiros intracelulares. Dentre outras funções, essas moléculas controlam a proliferação, diferenciação e sobrevivência celular por regularem a transcrição de genes específicos (Curi et al., 2001). Essa ação, aliada a maior concentração intrafolicular de progesterona nos indivíduos desse grupo, pode ter favorecido a qualidade de maturação dos CCOs aspirados dos mesmos.

Tabela 6: Íons de lipídeos de líquido folicular que diferiram entre os grupos controle e girassol

AMOSTRA	m/z	TRATAMENTO	Aduto	Classe lipídica	Possíveis estruturas	Erro de massa (PPM)
LÍQUIDO FOLICULAR	934,6197	GIRASSOL	M+K	PS	PS(22:0/22:4(7Z,10Z,13Z,16Z)) PS(22:2(13Z,16Z)/22:2(13Z,16Z)) PS(22:4(7Z,10Z,13Z,16Z)/22:0)	28,14
	936,6225	GIRASSOL	M+K	PS	PS(22:1(11Z)/22:2(13Z,16Z)) PS(22:2(13Z,16Z)/22:1(11Z))	14,41
	922,6224	GIRASSOL	M+Na	PS	PS(22:0/22:2(13Z,16Z)) PS(22:1(11Z)/22:1(11Z)) PS(22:2(13Z,16Z)/22:0)	30,78
	779,6608	GIRASSOL		NÃO IDENTIFICADO		
	943,0731	GIRASSOL		NÃO IDENTIFICADO		
	920,6105	GIRASSOL	M+Na	SP SP	PI-Cer(t18:0/22:0(2OH)) PI-Cer(t20:0/20:0(2OH))	10,10
	570,4424	GIRASSOL		NÃO IDENTIFICADO		

Compostos lipídicos encontrados no grupo girassol: PS – fosfatidilserina; SP – fosfoinositol conjugado a ceramidas

No líquido folicular dos animais do grupo que recebeu óleo de canola foram identificadas as subclasses lipídicas esteróides conjugados (ST) e fosfatidil serinas (PS) na comparação com o grupo controle (Tabela 7). Fosfatidil serinas também foram identificadas no líquido folicular das novilhas do grupo girassol em comparação com o grupo controle. A presença da PS no fluido folicular das novilhas suplementadas com óleo de girassol e sua ausência nas novilhas suplementadas com soja pode ser um indicativo de que essa classe lipídica participa de processos relacionados com a formação dos CCOs nos folículos antrais, visto que CCOs de melhor aspecto morfológico foram recuperados das fêmeas suplementadas com óleo de girassol e os de pior qualidade foram aspirados dos animais suplementados com óleo de soja.

Tabela 7: Íons de lipídeos de líquido folicular que diferiram entre os grupos controle e canola.

AMOSTRA	m/z	TRATAMENTO	Aduto	Classe lipídica	Possíveis estruturas	Erro de massa (PPM)
LÍQUIDO FOLICULAR	922,6224	CANOLA	M+Na	PS	PS(22:0/22:2(13Z,16Z)) PS(22:1(11Z)/22:1(11Z)) PS(22:2(13Z,16Z)/22:0)	30,78
	861,6014	CANOLA	M+K	ST	18:3-Glc-Campesterol	1,04

Compostos lipídicos encontrados no grupo canola: PS – fosfatidilserina; ST – esteróides conjugados

Os oócitos dos animais do grupo soja foram os únicos nos quais se detectaram fosfatilcolina (PC), que participa na diferenciação e proliferação celular, e fosfogliceróis (PG), que apresentam uma ação contra o estresse oxidativo. Tais substâncias podem ter colaborado para o aumento da porcentagem de clivagens iniciais observadas nos zigotos desse grupo.

As taxas de produção de blastocistos se mantiveram constantes durante o período experimental nos grupos canola e soja, sendo observada uma leve tendência de aumento no grupo controle e uma elevação significativa no grupo suplementado com óleo de girassol.

Um adequado desenvolvimento embrionário depende de um oócito de boa qualidade que teve, durante a sua foliculogênese, condições de se desenvolver adequadamente (Sirard et al., 2006). Da mesma forma, a compactação entre os blastômeros que precede a blastulação, depende da composição de lipídios da membrana plasmática do embrião (McEvoy et al., 2000).

O aumento de fosfatidiletanolamina (PE), na ausência de fosfatilcolina (PC) foi atribuído à perda da integridade de membrana em células ovarianas de hamster (Niebergal e Vance, 2012). Nos animais dos grupos canola e soja foi detectado PE e não houve detecção de PC nos embriões quando comparados ao grupo controle o que poderia justificar a constância na produção de blastocistos nesses grupos apesar de crescentes taxas de clivagem iniciais (Tabela 8 e 9). O grupo canola ainda apresentou traços de triglicerídeos (TG)

em seus embriões (Tabela 9), classe lipídica essa que se acumula nos embriões produzidos *in vitro* em decorrência do uso de soro fetal bovino (SFB) nos meios de cultivo (Abe et al., 2002; Mucci et al., 2006; Barceló-Fimbres e Sidel Jr, 2007). O grande acúmulo lipídico nos embriões PIV é associado à sua baixa resistência à criopreservação (Abe et al., 2002), resultando em taxas de concepção abaixo de 30% (Hasler, 2003).

Tabela 8: Íons de lipídeos de embriões que diferiram entre os grupos controle e soja

AMOSTRA	m/z	TRATAMENTO	Aduto	Classe lipídica	Possíveis estruturas	Erro de massa (PPM)
EMBRIÕES	780,5893	SOJA	M+H	PE	PE(O-20:0/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)) PE(P-18:0/22:4(7Z,10Z,13Z,16Z)) PE(P-20:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	1,15
	759,4245	CONTROLE	M+K	PA	PA(16:0/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)) PA(18:3(6Z,9Z,12Z)/20:3(8Z,11Z,14Z)) PA(18:3(9Z,12Z,15Z)/20:3(8Z,11Z,14Z)) PA(18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)/20:2(11Z,14Z)) PA(20:2(11Z,14Z)/18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)) PA(20:3(8Z,11Z,14Z)/18:3(6Z,9Z,12Z)) PA(20:3(8Z,11Z,14Z)/18:3(9Z,12Z,15Z)) PA(20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)/18:2(9Z,12Z)) PA(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/16:0) PA(20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)/18:1(9Z)) PA(18:2(9Z,12Z)/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)) PA(18:1(9Z)/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z))	15,41

Compostos lipídicos encontrados no grupo soja: PE – fosfatidiletalona; PA – ácido fosfatídico

Tabela 9: Íons de lipídeos de embriões que diferiram entre os grupos controle e canola.

AMOSTRA	m/z	TRATAMENTO	Aduto	Classe lipídica	Possíveis estruturas	Erro de massa (PPM)
EMBRIÕES	694,3832	CANOLA	M+K	PE	PE(12:0/18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)) PE(18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)/12:0)	1,87
	833,4396	CONTROLE	M+K	PI	PI(17:0/14:1(9Z)) PI(12:0/19:1(9Z)) PI(13:0/18:1(9Z)) PI(14:0/17:1(9Z)) PI(14:1(9Z)/17:0) PI(15:1(9Z)/16:0) PI(16:0/15:1(9Z)) PI(16:1(9Z)/15:0) PI(17:1(9Z)/14:0) PI(18:1(9Z)/13:0) PI(19:1(9Z)/12:0) PI(15:0/16:1(9Z))	21,72
	807,5965	CANOLA	M+K	TG	TG(12:0/12:0/22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))[iso3] TG(13:0/13:0/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z))[iso3] TG(14:1(9Z)/14:1(9Z)/18:3(6Z,9Z,12Z))[iso3] TG(14:1(9Z)/14:1(9Z)/18:3(9Z,12Z,15Z))[iso3] TG(12:0/14:0/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z))[iso6] TG(12:0/14:1(9Z)/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))[iso6] TG(12:0/16:1(9Z)/18:4(6Z,9Z,12Z,15Z))[iso6] TG(13:0/15:1(9Z)/18:4(6Z,9Z,12Z,15Z))[iso6] TG(14:0/14:1(9Z)/18:4(6Z,9Z,12Z,15Z))[iso6]	8,17

Compostos lipídicos encontrados no grupo canola: PE – fosfatidiletalonaamina; TG – triglicerídeos; Compostos lipídicos encontrados no grupo controle: PI - fosfatidilinositol

De forma análoga a detecção de PG nos embriões do grupo girassol, em comparação com os do grupo controle (Tabela 10) pode indicar algum efeito na membrana mitocondrial, já que este lipídeo garante maior estabilidade da citocromo c oxidase, o que diminui os efeitos das espécies reativas de oxigênio (ROS) nas mitocôndrias (Osman et al., 2011). Desta forma, maiores quantidades de PG podem gerar um mecanismo protetor da função mitocondrial garantindo a esses embriões melhores taxas de desenvolvimento e sobrevivência nos ambientes artificiais de cultivo *in vitro*. Esse fato pode justificar o aumento crescente ao longo do período experimental, da taxa de blastocisto observada nos animais suplementados com óleo de girassol.

Tabela 10: Íons de lipídeos de embriões que diferiram entre os grupos controle e girassol.

AMOSTRA	<i>m/z</i>	TRATAMENTO	Aduto	Classe lipídica	Possíveis estruturas	Erro de massa (PPM)
EMBRIÕES	763,4513	GIRASSOL	M+Na	PG	PG(14:1(9Z)/20:4(5Z, 8Z, 11Z, 14Z)) PG(18:4(6Z, 9Z, 12Z, 15Z)/16:1(9Z)) PG(20:4(5Z, 8Z, 11Z, 14Z)/14:1(9Z)) PG(20:5(5Z, 8Z, 11Z, 14Z, 17Z)/14:0) PG(16:1(9Z)/18:4(6Z, 9Z, 12Z, 15Z)) PG(14:0/20:5(5Z, 8Z, 11Z, 14Z, 17Z))	1,05

Compostos lipídicos encontrados no grupo girassol: PG – fosfatidilglicerol

5. CONCLUSÃO

De acordo com nossos resultados:

- A suplementação com óleos vegetais interfere na qualidade dos CCOs
- A identificação de fosfatidilglicerol (PG) em embriões foi relacionada com o aumento na produção *in vitro*; enquanto que a identificação de ácido fosfatídico (PA) foi relacionada a uma menor produção de embriões *in vitro*
- A suplementação alimentar com óleo de girassol é recomendada para vacas doadoras de oócitos bovinos para os processos de produção de embriões *in vitro*.
- A suplementação alimentar com óleo de soja não promoveu benefícios que indiquem seu uso para doadoras de oócitos.
- Apesar da suplementação com óleo de canola promover um aumento na produção *in vitro* de embriões, a identificação de triglicerídeos (TG) nesses embriões indica uma menor qualidade destes em relação os produzidos com a suplementação a base de girassol.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, H.; YAMASHITA, S.; ITOH, T.; SATOH, T.; HOSHI, H. Ultrastructure of bovine embryos developed from *in vitro*-matured and -fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free medium or in serum-supplemented medium. *Molecular Reproduction and Development*, v.53 p.325-335, 1999.

ABE, H.; YAMASHITA, S.; SATOH, T.; HOSHI, H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Mol. Reprod. Dev.*, v.61, p. 57–66, 2002.

ADAMIAK, S. J.; POWELL, K.; ROOKE, J. A.; WEBB, R.; SINCLAIR, K. D. Body composition, dietary carbohydrates and fatty acids determine post-fertilisation development of bovine oocytes in vitro. *Reproduction*, Cambridge, v. 131, p. 247-258, 2006.

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. v. 42., p. 198-207, 2003.

AKAIKE, H. A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control* v.19, p.716-723, 1974.

ALBUQUERQUE, K.P. Concentração de ácidos graxos no plasma sanguíneo e no líquido folicular de vacas suplementadas com linhaça ou canola em grãos. 2007. *Tese (Doutorado em Zootecnia)* – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2007.

AMBROSE, D.J., KASTELIC, J.P.; CORBETT, R.; PITNEY, P.A.; PETIT, H.V.; SMALL, J.A., ZALKOVIC, P. Lower pregnancy losses in lactating dairy cows fed a diet enriched in α -linolenic acid. *Journal of Dairy Science*, v.89, p.3066– 3074, 2006.

ARM & HAMMER. Megalac. E Gordura protegida Ruminant, CD Rom. 2006.

BACH A. LA reproducción del vacuno lechero: nutrición y fisiología. In: Curso de Especialización FEDNA. Purina, 7, España, 2003. Disponível em: <http://www.etsia.upm.es/fedna/capitulos/2001CAPV.pdf>

BARCELÓ-FIMBRES, M.; SEIDEL JUNIOR, J.E. Effects of fetal calf serum, phenazine ethosulfate an either glucose or fructose during in vitro culture of bovine embryos on embrionic development alter cryopreservation. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 74, p. 1395-1405, 2007.

BEAM SW, BUTLER WR. Energy balance and ovarian follicle development prior to the first ovulation postpartum in dairy cows receiving three levels of dietary fat. *Biol Reprod*, v.56, p.133-142, 1997.

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*, v.89, p.3891-3903, 2006

CABALLERO F, FERNANDEZ A, MATIAS N, et al. Specific contribution of methionine and choline in nutritional nonalcoholic steatohepatitis: impact on mitochondrial S-adenosyl-L-methionine and glutathione. *J Biol Chem*.v.285, p.18528–36. 2010

CARDONA, J.C.A. Suplementação de vacas receptoras de embriões com ácidos graxos poli-insaturados esterificados. *Dissertação de mestrado* em zootecnia. Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 101p, 2009.

CARDOSO DE OLIVEIRA, D. et al. Efeito da suplementação com ácidos graxos sobre a eficiência reprodutiva de vacas de corte. *In: reunião anual da*

sociedade brasileira de zootecnia, 44., Jaboticabal, SP, 2007. Anais... [Jaboticabal, 2007]

CHALUPA W, VECCHIARELLI B, ELSER A., KRONFELD DS, SKLAND D, PALMQUIST DL. Ruminant fermentation in vivo as influenced by long-chain fatty acids. *J Dairy Sci*, v.69, p.1293-1301, 1986.

CHILDS, S.; HENNESSY, A.A.; SREENAN, J.M.; WATHES, D.C.; CHENG, Z.; STANTON, C.; DISKIN, M.G.; KENNY, D.A. Effect of level of dietary n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on systemic and tissue fatty acid concentrations and on selected reproductive variables in cattle. *Theriogenology*, v.70, p.595-611, 2008

COZZOLINO, R.; PASSALACQUA, S.; SALEMI, S.; MALVAGNA, P.; SPINA, E.; GAROZZO, D. Identification of adulteration in milk by matrix-assisted laser-cumulus-free bovine oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.94, n.1, p.153-160, 1992.

CURI, R.; POMPEIA, C.; MYASAKA, S.K.; PROCOPIO, J. *Entendendo a Gordura - Os Ácidos Graxos*. Editora Manole Ltda, 2001 - 580 páginas

DASS, C., *Fundamentals of contemporary mass spectrometry*. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2007.

DOREAU M, CHILLIARD Y. Digestion and metabolism of dietary fat in farm animals. *Br J Nutr*, v.78, suppl. 1, p.15-35, 1997.

EPPIG, J.J., Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*. N.122(6): p. 829-838, 2001.

FADOK VA, VOELKER DR, CAMPBELL PA, COHEN JJ, BRATTON DL, HENSON PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol.*;v.148, p.2207-16. 1992

FARIN, P.W.; CROSIER, A.E.; FARIN, C.E. Influence of in vitro systems on embryo survival and fetal development in cattle. *Theriogenology*, Los Altos, v.55, p.151-170, 2001.

FERREIRA, C. R.; CATHARINO, R. R.; SARAIVA, A. S.; FONSECA, M. F. R.; BASSO, A. C.; PONTES, J. H. F.; ERENO JR., J. C.; EBERLIN, M. N. Perspectivas para aplicação da técnica de espectrometria de massas na caracterização do lipídoma de oócitos e embriões bovinos produzidos *in vitro*. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 36, (supl. 2), p. 549, 2008

FERREIRA, C.R.; SARAIVA, S.A.; GARCIA, J.S.; SANVIDO,G.B.; PERECIN,F.; CATHARINO, R.R.; SIMAS, R.C.; GOZZO, F.C. SANTOS, L.F.A.; MARTINS JUNIOR,H.; BASSO, A.C.; PONTES, J.H.F.; MEIRELLES, F.V.; COELHO, M.B.; D'ANGELO, M.; EBERLIN, M.N. PRINCÍPIOS E APLICAÇÕES DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM PRODUÇÃO ANIMAL. *Anais do II Simpósio de Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal* – 22 e 23 de junho de 2009 Embrapa Pecuária Sudeste – São Carlos – SP – Brasil

FERREIRA, C. R.; SOUZA, G. H.; RICCIO, M. F.; CATHARINO, R. R.; PONTES, J. H.; BASSO, A. C.; JÚNIOR, J. C.; PERECIN, F.; EBERLIN, M. N. Mass spectrometry fingerprinting of media used for *in vitro* production of bovine embryos. *Rapid Communications of Mass Spectrometry*, v. 23, n. 9, p. 1313-1320, 2009 b.

FERREIRA, C.R., SARAIVA, S.A., CATHARINO, R.R, GARCIA, J. S., GOZZO, F.C, SANVIDO, G.B., SANTOS, L.F.A., TURCO, E.G.L., PONTES, J.H.F., BASSO, A.C., BERTOLLA, R.P., SARTORI, R., GUARDIEIRO, M.M., PERECIN, F., MEIRELLES, F.V., SANGALLI, J.R., EBERLIN, M.N. Single embryo and oocyte lipid fingerprinting by mass spectrometry. *Journal of Lipid Research*, v.51, p. 1218, 2010.

FILLEY, S.J.; TURNER, H.A.; STORMSHAK, F. Plasma fatty acids, prostaglandin F₂α metabolite, and reproductive response in postpartum heifer fed rumen by-pass fat. *Journal of Animal Science*, v. 78, p. 139-144, 2000.
follicles. *Reproduction*, v.121, p.447-454, 2001.

FOULADI-NASHTA A. A.; GONG, J.G.; WEBB, R. GUTIERREZ, C.G.; GARNSWORTHY, P.C. Impact of Dietary Fatty Acids on Oocyte Quality and Development in Lactating Dairy Cows. *Biology of Reproduction*. v.77, p.9–17, 2007.

FOULADI-NASHTA, A. A.; WONNACOTT, K.E.; GUTIERREZ, C.G.; GONG, J.G.; SINCLAIR, K.D.; GARNSWORTHY, P.C.; WEBB, R. Oocyte quality in lactating dairy cows fed on high levels 1 of n-3 and n-6 fatty acids. *Reproduction Advance Publication* first posted on 24 July 2009 as Manuscript REP-08-0391

FUCHS, B.; JAKOP, U.; GÖRITZ, F.; HERMES, R.; HILDEBRANDT, T.; SCHILLER, J.; MÜLLER, K. MALDI-TOF "fingerprint" phospholipid mass spectra allow the differentiation between ruminantia and feloideae spermatozoa. *Theriogenology*, v. 71, n. 4, p. 568-575, 2008.

FUCHS, B.; SCHILLER, J. MALDI-TOF MS analysis of lipids from cells, tissues and body fluids. *Subcellular Biochemistry*, v. 49, p. 541-565, 2008.

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

GLISH, G. L.; VACHET, R. W. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nature Reviews Drug Discovery*., v. 2., p. 140-150, 2003.

GONZÁLEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. *Introdução à bioquímica clínica veterinária*. Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006, 357p.

GRUMMER, R. R.; CARROLL, D. J. A review of lipoprotein cholesterol metabolism: Importance to ovarian function. *J. Anim. Sci*, v. 66, p. 3160-, 1988.

GUARDIEIRO, M.M. Viabilidade pós criopreservação de embriões de novilhas nelore suplementadas com gordura protegida ruminal. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2009.

HAGGARTY, P.; WOOD, M.; FERGUSON, E.; HOAD, G.; SRIKANTHARAJAH, A.; MILNE, E.; HAMILTON, M.; BHATTACHARYA, S. Fatty acid metabolism in human preimplantation embryos. *Human Reproduction*, v.21, n.3, p.766–773,

HASLER, J.F. The current status and the future of the commercial embryo transfer in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 15, p. 245–264, 2003.

HAWKINS, D. E. et al. An increase in serum lipids increase luteal lipid content and alters the disappearance rate of progesterone in cows. *J anim Sci*. v. 73, p. 541-545. 1995.

HENDRIKSEN, P.J.M. et al. Effect of the origin of bovine oocytes on cell numbers and numerical chromosome aberrations in vitro embryos collected at day 3 post-insemination. *Theriogenology*, v.55, p.475, 2001.

HOFFMANN, E.; STROOBANT V., Mass Spectrometry: Principles and Applications. John Wiley & Sons, Chichester, UK. Third Edition 2007.

HOMA, S.T.; BROWN, C.A. Changes in linoleic acid during follicular development and inhibition of spontaneous breakdown of germinal vesicles in

IRELAND, J.J. Control of follicular growth and development. *J. Reprod. Fertil.*, Suppl., v.34, p.39-54, 1987. Supplement.

IRELAND, J.J.; ROCHE, F. Development of antral follicles in cattle after prostaglandin-induced luteolysis: changes in serum hormones, steroids in follicles fluids and gonadotropin receptors. *Endocrinology* v.111, p.2077–2086. 1982

JUCHEM, S. O.; CERRI, R. L. A; BRUNO, R.; GALVÃO, K. N.; CHEBEL, R. C.; THATCHER, W. W.; DEPETERS, E. J.; LUCHINI, D.; SANTOS, J. E. P. Effect of feeding Ca salts rich in ω -6 and *trans* fatty acids during transition on reproduction and health of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, Suppl. 1, 2004. (Abstract).

KANE, M.T. Fatty Acids as energy sources for culture of one-cell rabbit ova to viable morulae. *Biology of Reproduction*, v.20, p.323-332, 1979.

KHANDOKER, M.; TSUJII, H. Asian – Australian Journal of Animal Sciences, v. 12, p. 169 – 173, 1999.

KIM HY, AKBARM, LAU A, EDSALL L. Inhibition of neuronal apoptosis by docosahexaenoic acid (22:6n-3). Role of phosphatidylserine in antiapoptotic effect. *J Biol Chem*.v.275, p.35215–23. 2000

KOPELMAN, P. G. “Obesity as a medical problem,” *Nature*, v. 404, n. 6778, p. 635–643, 2000

KUBOW, S.; KOSKI, K.G. Maternal dietary glucose-lipid interactions modulate embryological development in vivo and in embryo culture. *Biology of*

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

LITTELL, R.C., HENRY, P.R., AMMERMAN, C.B. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *Journal of Animal Science* v.76, p.1216-1231, 1998.

LOMBARDO, Y.B.; CHICCO, A.G. Effects of dietary polyunsaturated n – 3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v.17, p. 1 – 13, 2006.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; FAIR, T.; BOLAND, M.P. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reprod Domest Anim.*; v.38: p.259-67. 2003

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_{2α}, 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 novilha. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.51, n.2, p. 163-170, 1999.

MATTOS R, STAPLES CR, THATCHER WW. Effects of dietary fatty acids on reproduction in ruminants. *Rev Reprod*, v.5, p.38-45, 2000.

McEVOY, T.G.; COULL, G.D.; BROADBENT, P.J.; HUTCHINSON, J.S.M.; SPEAKE, B.K. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.118, p.163-170, 2000.

MCNATTY KP, SMITH DM, MARKIS A, OSATHANONDH R & RYAN KJ
The production of progesterone, androgens, and estrogens by granulosa cells, thecal tissue, and stromal tissue from human ovaries in vitro. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* v.49, p.687–699. 1979

MICHALIK, L., AUWERX, J., BERGER, J.P., CHATTERJEE, V.K., GLASS, C.K., GONZALEZ, F.J., GRIMALDI, P.A., KADOWAKI, T., LAZAR, M.A., O'RAHILLY, S., PALMER, C.N., PLUTZKY, J., REDDY, J.K., SPIEGELMAN,

B.M., STAELS, B., AND WAHLI, W., International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol Rev*, v.58, n.4 p.726-41. Review, 2006.

MILES, E.A.; CALDER, P.C. Modulation of immune function by dietary fatty acids. Society. *Production and Nutrition*, v.57, p. 277-292. 1998.

MODESTO, E.C.M.; SANTOS, G.T.; VILELA, D. et al. Efeitos nutricionais e metabólicos de dietas ricas em ácidos graxos poli-insaturados para os ruminantes e os benefícios para o homem. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia*, v.5, n.1, p.119-134, 2002.

MONTANI, D.A.; CORDEIRO, F.B.; REGIANI, T.; VICTORINO, A.B.; PILAU, E.J.; GOZZO, F.C.; FERREIRA, C.R.; FRAIETTA, R.; LO TURCO, E.G. The follicular microenvironment as a predictor of pregnancy: MALDI-TOF MS lipid profile in cumulus cells. *J Assist Reprod Genet* 29:1289–1297, 2012.

MUCCI, N.; ALLER, J.; KAISER, G.G.; HOZBOR, F.; CABODEVILA, J.; ALBERIO, R.H. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology*, v. 65, p.1551–1562, 2006.

NELSON, D.L.; COX, M.M. Lehninger *Principles of Biochemistry*. 4th Edition, USA; W. H. Freeman, 1100p, 2004.

NIEBERGALL L, VANCE D. The ratio of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine does not predict integrity of growing MT58 Chinese hamster ovary cells. *Biochim Biophys Acta*.;v.1821, p.324–34. 2012

NOGUEIRA E. Efeitos da suplementação energética e lipídica no perfil metabólico, desenvolvimento folicular e produção in vitro de embriões em novilhas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). 2008. 87f. *Tese (Doutorado em Medicina Veterinária)* – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2008.

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*, v.9, n.1, p.73-80, 2004.

OSMAN, C., VOELKER, D.R., AND LANGER, T., Making heads or tails of phospholipids in mitochondria. *J Cell Biol.* v.192(1): p. 7-16. 2011

PALMQUIST, D.L.; MATTOS, W.R.S. *Metabolismo de lipídios, in Nutrição de ruminates*, 2º edição, Jaboticabal: Funep, 2011.

PEIXOTO, A. M.; MOURA, J. C.; FARIA, V. P. Nutrição de Bovinos – Conceitos Básicos e Aplicados. 5ª ed. Piracicaba: FEALQ, 563 p., 1995.

PETIT, H.V. Digestion, milk composition, and blood composition of dairy cows fed whole flaxseed. *Journal Dairy Science*, v.85, p.1482-1490, 2002.

RAES, K.; DE SMET, S.; DEMEYER, D. Effect of dietary fatty acids on incorporation of long chain polyunsaturated fatty acids and conjugated linoleic *Reproduction*, v.52, p.145-155, 1995.

RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; PEREZ-GARNELO, S. et al. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biology of reproduction*, v. 68, p. 236 – 243, 2003

RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; PEREZ-GARNELO, S.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implication for blastocysts development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol. Reprod.*, v. 68, p. 236–243, 2003.

ROBINSON RS, PUSHPAKUMARA PGA, CHENG Z, PETERS AR, ABAYASEKARA DRE, WATHES DC. Effects of dietary polyunsaturated fatty

acids on ovarian function in lactating dairy cows. *Reproduction*, v.124, p.119-131, 2002.

SANCHEZ, B. Ácidos graxos na nutrição e reprodução de vacas em lactação. *In: Curso Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos*, 7, Uberlândia, MG. *Anais...* Uberlândia: Conapec Jr; Jaboticabal: UNESP, p.103–115, 2003.

SANGSRITAVONG S, MASHEK DG, GUMEN A, HAUGHIAN JM, GRUMMER RR, WILTBANK MC. Metabolic clearance rate of progesterone and estradiol-17 β is decreased by fat. *J. Anim. Sci* v.80, suppl. 1, p.142, 2002

SANTOS, J.E.P.; AMSTALDEN, M. Effects of nutrition on bovine reproduction. *Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS*, v.26, p.1-51, 1998.

SANTOS, J.E.; BILBY, T.R., THATCHER, W.W.; STAPLES, C.R.; SILVESTRE, F.T. Long chain fatty acids of diet as factors influencing reproduction in cattle. *Reproduction in Domestic Animals*, v.43, p.23-30. 2008.

SANVIDO. G.B. Espectometria de massas aplicada a produção animal. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, 67p. 2012

SARTORI R, HAUGHIAN JM, SHAVER RD, ROSA GJ, WILTBANK MC. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. *J Dairy Sci*, v.87, p.905-920, 2004

SATURNINO HM, AMARAL TB. Perspectivas para uso eficiente da interação nutrição-reprodução em fêmeas bovinas de corte. *In: Grupo de Estudos de Nutrição de Ruminantes*, 2005. Botucatu, SP: UNESP, 2005. Disponível em: <http://www.fca.unesp.br/nutrir/artigos/Perspectivasfemeasbovinas.PDF>.

SCHILLER, J.; SÜSS, R.; ARNHOLD, J.; FUCHS, B.; LESSIG, J.; MÜLLER, M.; PETKOVIĆ, M.; SPALTEHOLZ, H.; ZSCHÖRNIG, O.; ARNOLD, K. Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in lipid and phospholipid research. *Progress in Lipid Research*, v. 43, n. 5, p. 449-488, 2004.

SCHILLER, J.; SUSS, R.; FUCHS, B.; MULLER, M.; ZSCHORNIG, O.; ARNOLD, K. MALDI-TOF MS in lipidomics. *Frontiers in Bioscience*, v. 12, p. 2568-2579, 2007.

SCHINONI, M.I. Fisiologia Hepática. *Gaz. méd. Bahia* 2006;76:Suplemento 1:S5-S9 Síntese de triacilgliceróis, fosfolípidos e glicolípidos; Rui Fontes. http://users.med.up.pt/ruifonte/PDFs/PDFs_arquivados_anos_anteriores/2008-2009/2G04_Triacilgliceróis_fosfolipídeos_glicolipídeos.pdf Acessado em 20/11/2013.

SILVEIRA, M.F.; RESTLE, J.; MENEZES, L.F.G.; BRONDANI, I.L.; NORBERG, J.L.; CALLEGARO, A.M. Blood metabolites from beef cows supplemented or not with calcium salts of fatty acids during pre and/or postpartum period. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* vol.64 no.6 Belo Horizonte Dec. 2012

SIRARD, MA.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* v.65, p.126–136, 2006.

SONG, F.; MAHMOOD, S.; GHOSH, S.; LIANG, P.; SMIRAGLIA, D. J.; NAGASE, H.; HELD, W. A. Tissue specific differentially methylated regions (TDMR): changes in DNA methylation during development. *Genomics*, v. 93, n. 2, p. 130-139, 2009.

STAPLES CR, BURKE JM, THATCHER WW. Influence of supplemental fats on reproductive tissues and performance of lactating cows. *J Dairy Sci*, v.81, p.856-871, 1998.

STAPLES, C.R.; WILTBANK, M.C.; GRUMMER, R.R. et al. Effect of long chain fatty acids on lactation performance and reproductive tissues of Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, v.83, p.278, 2000. (Abstract).

STAPLES, C.; DE VRIES, B.A.A.; THATCHER, W.W. Uso de grasa suplementaria para mejorar las posibilidades de preñez en vacas lecheras en lactación. Gainesville : *Department of Animal Sciences*. University of Florida, 2007.

STOCCO DM.; CLARK BJ. Role of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in steroidogenesis. *Biochemical Pharmacology*, v.51, p.197–205. 1996. *Technology*, v.113, p.199-221, 2004.

TESARIK, J.; MENDOZA, C. Nongenomic effects of 17 β -estradiol on maturing human oocytes: relationship to oocyte developmental potential. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* v.80, p.1438–1443. 1995

THANGAVELU, G.M.; COLAZO, G.; AMBROSE, D.J.; OBA, M.; OKINE, E.K.; DYCK, M.K. Diets enriched in unsaturated fatty acids enhance early embryonic development in lactating Holstein cows. *Theriogenology*, v.68, p.949-957,

VAN BRAMER, S. E. *An introduction to mass spectrometry*. Widener University, Chester PA, 1998.

VAN MEER, G., Cellular lipidomics. *EMBO J* v. 21; n. 24(18), p. 3159–3165, 2005.

VAN SOEST, P.J. *Nutritional ecology of the ruminant*. 2.ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476 p.

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.

VIEIRA, R.A.M., CAMPOS, P.R.D.S.S., SILVA, J.F.C.D., TEDESCHI, L.O., TAMY, W.P. Heterogeneity of the digestible insoluble fiber of selected forages in situ. *Animal Feed Science and Technology*, v. 171, p. 154-166, 2012.

WANG X, WALSH LP, REINHART AD & STOCCO DM. The role of arachidonic acid in steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory (StAR) gene and protein expression. *Journal of Biological Chemistry* v.275, p.20204–20209. 2000

WANKENNE, M. A. (Ed.). Canola: OGM or not! Aditivos & Ingredientes, São Paulo, n. 17, p. 28-36, nov./dez. 2001.

WATHES, D.C.; ABAYASEKARA, D.R.; AITKEN, R.J. Minireview: polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. *Biology of Reproduction*, v.77, p.190-201, 2007.

WEHRMAN, M.E.; WELSH, T.H.; WILLIAMS, G.L. Diet induced hyperlipidemia in cattle modifies the intrafollicular cholesterol environment, modulated ovarian follicular dynamics, and hasten the onset of postpartum luteal activity. *Biology of Reproduction*, v. 45, p. 504-514, 1991.

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

WILLIAMS GL. 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, Uberlândia, MG. *Anais...* Uberlândia: Conapec Jr; Botucatu: UNESP, p.95-101. 2001.

WILLIAMS, G.L.; STANKO, R.L. Dietary fats as reproductive nutraceuticals in beef cattle. *Proceedings of the American Society of Animal Science*. 1999. Acesso 19/05/2011 Internet: www.asas.org/jas/symposia/proceedings/0915.pdf

WRENZYCKI, C.; HERRMAN, D.; LUCAS-HAHN, A. et al. Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from *in vitro* procedures and their implications for development. *Reproduction Fertility and Development*, n.17, p. 23 – 35, 2005.

ZACHUT, M.; ARIELI, A.; LEHRER, H.; ARGOV, N.; MOALLEN, U. Dietary unsaturated fatty acids influence preovulatory follicle characteristics in dairy cows. *Reproduction*, v.135, p.683-692, 2008.

ZERON, Y.; OCHERETNY, A.; KEDAR, O.; BOROCHOV, A.; SKLAN, D.; ARAV, A. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental