

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

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*)

Ériklis Nogueira
Orientador: Prof^a Dr^a Gisele Zoccal Mingoti

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias
e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal,
como parte das exigências para a obtenção do título
de Doutor) em Medicina Veterinária (Reprodução
Animal).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Fevereiro de 2008

N778e Nogueira, Ériklis
**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*)/ Ériklis Nogueira. – – Jaboticabal,
2008
xiii, f. 87 ; 28 cm**

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008
Orientador: Gisele Zoccal Mingoti
Banca examinadora: César Roberto Éesper, Ciro Moraes Barros,
Paulo Henrique Franceschini, Roberto Sartori.
Bibliografia

1. Produção *in vitro*. 2. Bovino. 3. nutrição x reprodução. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:612.6:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.e-mail:
eriklis@yahoo.com

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO: EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO ENERGÉTICA E LIPÍDICA NO PERFIL METABÓLICO, DESENVOLVIMENTO FOLICULAR E PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES EM NOVILHAS DA RAÇA NÉLORE (*Bos taurus indicus*)

AUTOR: ÉRIKLIS NOGUEIRA

ORIENTADORA: Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR em MEDICINA VETERINÁRIA área de REPRODUÇÃO ANIMAL pela Comissão Examinadora:

Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI

Dr. ROBERTO SARTORI FILHO

Dr. CIRO MORAES BARROS

Dr. CESAR ROBERTO ESPER

Dr. PAULO HENRIQUE FRANCESCHINI

Data da realização: 08 de fevereiro de 2008.

Presidente da Comissão Examinadora

Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ÉRIKLIS NOGUEIRA- Nascido ao primeiro dia do mês de novembro de 1975, em Campo Grande- MS, concluiu o ensino médio no colégio DOM BOSCO, no ano de 1993, na mesma cidade. Ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, no ano de 1994, concluindo o referido curso em dezembro de 1998. Ingressou no curso de pós-graduação, nível de mestrado, sob orientação do prof Venício José de Andrade, no programa de Zootecnia, área de concentração de Produção Animal, na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, em Belo Horizonte, em abril de 1999, com bolsa de mestrado da CAPES, concluindo o curso em abril de 2001, com a defesa da dissertação “Efeitos do Creep-feeding sobre o desempenho de bezerros e a eficiência reprodutiva de primíparas Nelore, em pastagem de *Brachiaria brizantha*”. Retornando a Campo Grande, foi consultor em propriedades rurais de gado de corte, trabalhando principalmente com reprodução e manejo reprodutivo, e consultor técnico de empresa de Nutrição animal. Ingressou como docente na UNIDERP, no ano de 2001, permanecendo como professor das disciplinas de Clínica e Biotecnologia da Reprodução I e II, para o curso de Medicina Veterinária até o ano de 2004. Ingressou no curso de pós-graduação, ao nível de Doutorado, sob orientação da Profª Drª Gisele Zoccal Mingoti, no Programa de Medicina Veterinária, Área de Concentração em Reprodução Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Câmpus de Jaboticabal da Universidade Estadual Paulista – UNESP, em março de 2004. Atualmente é professor do curso de Medicina Veterinária na Universidade Católica Dom Bosco, em Campo Grande, ministrando as disciplinas de Biotécnicas da Reprodução e Reprodução Animal I e II, e sócio da Empresa Gênese Tecnologia e Reprodução Animal.

EPÍGRAFE

Existem de fato duas coisas: ciência e opinião, a primeira forma conhecimento, a segunda a ignorância.

Hippocrates (460 AC - 377 AC)

Uma coisa importante na ciência não é apenas obter novos fatos, mas descobrir novas formas de pensar sobre eles.

Sir William Bragg (1862 - 1942)

Para entender o coração e a mente de uma pessoa, não olhe apenas para o que ela já alcançou, mas o que ela aspira alcançar.

Kahlil Gibran

DEDICATÓRIA

À Deus, pelo dom da vida e a paciência para o aprendizado

À Renata, companheira de todas as horas (na alegria e na tristeza, na saúde e na doença, por todos os dias de nossas vidas). Só tenho a agradecer por ter você como minha companheira nesta longa jornada. Love You.

Às minhas Marias (Eduarda e Isabel), pelo ânimo renovado a cada bom dia.

Aos meus pais, José Carlos e Elizete, pelo amor incondicional e por nunca medirem esforços e carinho para o melhor dos filhos.

AGRADECIMENTOS

À Professora e orientadora Gisele Zoccal Mingoti, pela paciência, acolhimento das idéias, cooperação, e por não medir esforços para realizar o conteúdo do nosso trabalho.

Aos professores da FCAV-UNESP, em especial ao Prof Cesar R. Esper, Joaquim M Garcia, pelos ensinamentos e sugestões, e agradável convívio durante a estada em Jaboticabal.

Ao prof Guilherme de Paula Nogueira, e Devani pelo valioso auxílio nas dosagens hormonais.

À EMBRAPA-CNPGC, em especial a colega Thais Basso Amaral, e Luis Otávio Silva, pela cessão das instalações e empréstimo dos animais experimentais.

À UCDB, pela disponibilização das instalações e equipamentos para a realização dos experimentos.

Ao Sr. Helvécio Rodrigues Ferreira Filho e ao colega Guilherme da Fazenda Santo Antônio da Baeta, e ao Sr Djalma Rezende, da fazenda 3 W pelo empréstimo das novilhas.

Ao Prof. Jair Soares Madureira, diretor do HV-UCDB, pelo auxílio durante o experimento, e pelo exemplo profissional e pessoal a seguir.

Ao Prof. Alcimar de Souza Maciel (*in memorian*), que no decorrer de nossa formação profissional, nunca mediu esforços para transmitir todo conhecimento disponível ao seu alcance. Barba, você deixou saudades....

Ao colega Orlando Pimpim Lima, pelo auxílio valioso na condução dos experimentos, na cessão dos alimentos e “trocas de idéias”. Ao amigo Roberto (Betinho) pelo apoio logístico e mistura das rações na Serv-Sal. À Bellman, pelo fornecimento de parte das dietas experimentais.

Ao Prof José Eduardo Portela Santos, pelas sugestões do experimento, e pela acolhida em Tulare.

Aos amigos Márcio e Juliana, que sempre nos receberam de braços abertos e foram nosso “ponto de apoio” em Jaboticabal, e pelos tererés e churrascos no fim das disciplinas.

Aos alunos, que acompanharam todo os experimentos e que tomara tenham despertado o interesse pelo espírito científico, em especial ao Jaime e Guilherme.

Aos acadêmicos do Curso de Med Veterinária da UCDB, pelo auxílio nos longos períodos de trato dos animais experimentais e pelo excelente convívio: Ricardo, Rafael, Giulian, Dante, Jesus, Gabriel, Paulo Neto, Fabricio (Matão), Enielson, Hebert, Carlos, Celso, e todos os demais.

Às professoras Eliane Viana Costa e Silva e Maria da Graça Moraes, da UFMS, pelo incentivo e apoio durante todo esse tempo.

À empresa Biogênese, pela doação dos medicamentos utilizados nas novilhas.

Aos Sócios e colegas da Gênesis Tecnologia e Reprodução Animal, Ailson Sebastião da Silva, José Maurício Araújo, Wesley Ferrato e Roosevelt José Nogueira, pelo apoio, incentivo e auxílio nas horas mais inesperadas. Essa vitória é também de vocês.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
RESUMO.....	xvi
INTRODUÇÃO.....	01
OBJETIVOS.....	03
REVISÃO DA LITERATURA.....	04
3.1. Desenvolvimento folicular em <i>Bos taurus indicus</i>	04
3.2. Efeitos da nutrição sobre o desenvolvimento folicular e produção de embriões.....	06
3.3. Adição de gordura dietética.....	10
3.4. Metabólitos sanguíneos.....	15
3.5. Produção <i>in vitro</i> de embriões	16
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1. Animais e tratamentos.....	18
4.2. Sincronização de cio e avaliação do desenvolvimento folicular.....	20
4.3 Colheita de sangue e dosagens de metabólitos sanguíneos.....	22
4.4. Radioimunoensaio.....	22
4.5. Aspiração folicular.....	23
4.6. Produção <i>in vitro</i> de embriões.....	23
4.7. Análise estatística.....	25
5. RESULTADOS.....	26
5.1. Experimento 1 – Efeito da suplementação energética e com Megalac sobre o perfil metabólico, desenvolvimento folicular e produção de oócitos e embriões em novilhas Nelore.....	26

5.1.1. Consumo de alimentos e ganho de peso.....	26
5.1.2. Concentrações hormonais (P4), LH e FSH.....	27
5.1.3. Uréia, albumina, colesterol e glicose.....	29
5.1.4. Desenvolvimento folicular.....	31
5.1.5. Diâmetro folicular e do corpo lúteo.....	32
5.1.6. Aspiração folicular, recuperação oocitária e produção <i>in vitro</i> de embriões.....	34
5.2. Experimento 2: Efeito da suplementação energética e com diferentes fontes de gordura sobre a desenvolvimento folicular e produção de oócitos e embriões de novilhas Nelore.....	35
5.2.1. Consumo de alimentos e ganho de peso.....	35
5.2.2. Metabólitos sanguíneos, FSH e P4.....	36
5.2.3. Desenvolvimento folicular.....	40
5.2.4. Diâmetro folicular e do corpo lúteo.....	42
5.2.5. Aspiração folicular, recuperação oocitária e produção <i>in vitro</i> de embriões.....	43
6. DISCUSSÃO.....	45
7. CONCLUSÃO.....	51
8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
ANEXOS.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das dietas experimentais exp 1.....	19
Tabela 2. Composição das dietas experimentais exp 2.....	20
Tabela 3. Ganho de peso (Kg) e consumo de alimento (Kg/MS/dia) durante os períodos experimentais em função dos tratamentos- exp 1.....	27
Tabela 4 - Concentrações dos metabólitos sanguíneos totais (Albumina, Colesterol, Glicose e Uréia) e hormônios (FSH, LH, P4), em função dos tratamentos.....	29
Tabela 5- Folículos aspirados, oócitos recuperados e embriões produzidos <i>in vitro</i> por novilha, por sessão de aspiração - exp 1	34
Tabela 6. Peso inicial (Kg), ganho médio diário (Kg/animal/dia), ganho de peso no período (Kg) e consumo de alimento (Kg/MS/animal/dia) durante os períodos experimentais em função dos tratamentos- exp 2.....	35
Tabela 7 - Concentração plasmática dos metabólitos sanguíneos totais (albumina, colesterol, glicose e uréia), em mg/dL, e hormônios (FSH e P4) em ng/mL em função dos tratamentos.....	37
Tabela 8 - Quantidade média de folículos, e diâmetro (mm) dos folículos pré-ovulatório, dominante e do corpo lúteo de acordo com os tratamentos.....	40
Tabela 9. Folículos aspirados, oócitos recuperados e embriões por novilha e por sessão de aspiração (Média± DP)- exp 2.....	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Atividades durante o período experimental.....	21
Figura 2- Ganho de peso total (kg), de acordo com o tratamento- Exp 1.....	26
Figura 3 - Concentração plasmática de progesterona diária (P4, ng/mL) durante o ciclo estral sincronizado em função dos tratamentos.....	28
Figura 4 - Concentração plasmática de FSH e LH (ng/mL), durante o ciclo estral sincronizado em função dos tratamentos.....	28
Figura 5 - Concentração plasmática de albumina (g/dL), colesterol (mg/dL), uréia (mg/dL) em função do dia do ciclo estral e dos tratamentos.....	30
Figura 6 - Número de folículos pequenos (< 4 mm) em função do dia do ciclo estral e do tratamento - Exp 1.....	31
Figura 7 - Número de folículos médios (4- 8 mm), em função do dia do ciclo estral e do tratamento.....	32
Figura 8 - Diâmetro máximo (cm) do folículo pré-ovulatório após a retirada dos implantes de P4 em função dos tratamentos.....	32
Figura 9 - Diâmetro máximo (cm) do folículo dominante no D8 do ciclo estral em função dos tratamentos - Exp 1.....	33
Figura 10 - Diâmetro máximo (cm) do corpo lúteo no D8 do ciclo estral em função dos tratamentos - Exp 1.....	33
Figura 11 - Ganho de peso total no período (kg) de acordo com os tratamentos- Exp 2.....	36
Figura 12 - Concentração plasmática de FSH (ng/mL) em função dos tratamentos.....	37

Figura 13 - Concentração plasmática de progesterona (P4, ng/mL), durante o ciclo estral sincronizado em função dos tratamentos.....	38
Figura 14 - Concentração plasmática diária (mg/dL) dos metabólitos albumina, colesterol, glicose e uréia em função dos tratamentos e dias do ciclo estral.....	39
Figura 15 - Número de folículos pequenos (< 4 mm) de acordo com o tratamento e dia do ciclo estral.....	41
Figura 16 - Número de folículos médios (4-8 mm) de acordo com o tratamento e dia do ciclo estral.....	41
Figura 17 - Diâmetro máximo (mm) do folículo pré-ovulatório, após a retirada do implante de P4 em função dos tratamentos.....	42
Figura 18 – Diâmetro máximo (mm) do folículo dominante no dia 7 do ciclo estral em função dos tratamentos.....	42
Figura 19 - Diâmetro máximo (mm) do corpo lúteo no D7 do ciclo estral em função dos tratamentos.....	43

ABREVIATURAS

AGCL	Ácido graxo de cadeia longa
ANOVA	Análise de Variância
BI	Blastocisto
BSA	Albumina sérica bovina
°C	Grau Celsius
céls.	Células
CIV	Cultivo embrionário <i>in vitro</i>
CO ₂	Dióxido de Carbono
COC	Complexo <i>cumulus</i> -oócito
CGS	Células da granulosa
DP	Desvio padrão
ECC	Escore de condição corporal
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante
G	Gauge
GLM	“General Linear Model”
h	Horas
HDL	“High density lipoprotein”
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
LH	Hormônio luteinizante
LDL	“Low density lipoprotein”
mg	Miligramas
min	Minutos
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
mL	Mililitro
mm	Milímetro

mM	Milimolar
MS	Matéria Seca
N ₂	Nitrogênio
OPU	Punção folicular guiada por ultra-som
PBS	Tampão salina fosfato
PHE	Penicilamina, hipotaurina e epinefrina
PIV	Produção <i>in vitro</i>
PUFA	“Polyunsaturated fatty acids”
SAS	“Statistical analysis system”
SFB	Soro fetal bovino
SOF	Fluido sintético de oviduto
TALP	“Tyrode’s Albumin Lactate and Pyruvate”
TCM-199	“Tissue culture medium 199”
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
%	Porcentagem
χ ²	Qui-quadrado

RESUMO

O objetivo deste estudo foi verificar os efeitos da suplementação energética e com diferentes fontes de gordura na produção de embriões FIV e no perfil metabólico em novilhas nelore. Foram realizados dois experimentos, no primeiro, vinte novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*) com idade média de 30 meses, com peso médio de 417,0 $\pm$ 42,4 kg foram distribuídas aleatoriamente em 3 tratamentos: T1 (n= 7), animais receberam 100% das exigências de manutenção de energia, calculados conforme NRC (1997), T2 onde os animais receberam 170% das exigências de manutenção de energia (1,7 X M), e T3, onde os animais receberam 170 % das exigências de manutenção de energia com adição de 200 g de gordura protegida-AGCL (Megalac®). No segundo experimento 12 novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*) com idade variando de 14 a 18 meses, com peso médio inicial de 309,6 kg, foram distribuídas em 4 tratamentos, de acordo com peso e população folicular avaliada por ultrasonografia: T1, animais receberam 100% dos requerimentos de manutenção de energia, calculados conforme NRC (1997), T2- animais receberam 170% das exigências de manutenção de energia, T3- idem ao T2, com adição de 4% de óleo de soja na MS, e T4- idem ao T2, com adição de 200 g de AGCL (Megalac®). O período de adaptação foi quinze dias, onde os animais receberam feno de capim *Brachiaria* e ração concentrada com 18%PB e 65%NDT. Após a adaptação, iniciaram-se os tratamentos, e após uma semana os animais foram sincronizados com implante intravaginal, 2mg de benzoato de estradiol e uma dose de PGF₂, para obter uma ovulação em período próximo. Após a retirada do implante foi inicializada a avaliação do desenvolvimento folicular com o uso de ultrasonografia retal. O consumo de MS e o ganho de peso foi menor nos grupos de manutenção, não havendo diferença entre os animais que receberam 1,7 X energia e a adição de gorduras de diferentes fontes

($P>0,05$). Não houve diferença nas concentrações plasmáticas de albumina entre os grupos estudados ($p<0,05$). As concentrações médias de colesterol foram maiores nos grupos que receberam gordura apenas no Exp 2, independentemente da fonte. Assim como a albumina, as concentrações médias de glicose, não variaram ($p>0,05$) entre as diferentes dietas fornecidas. O número de folículos pequenos e médios foi aumentado com o aumento de fornecimento de energia e gordura, assim como o número de oócitos totais aspirados. A quantidade de embriões e percentagem de produção embrionária foi beneficiada com a adição de energia na dieta, não apresentando efeito benéfico da adição de gordura.

Palavras chave: desenvolvimento Folicular, Cultivo *In Vitro*, Gordura, Nutrição x Reprodução, Bovino.

ABSTRACT

Two experiments were carried to evaluate the effect of the energy and fat in the metabolic profile, follicular dynamic, oocyte and *in vitro* embryo production in Nelore heifers (*Bos taurus indicus*). In the first, twenty Nelore heifers with 30 months old, and average weight $417,0 \pm 42,4$ were allocated in 3 treatments, in accordance with weight and follicular population evaluated by ultrasound: T1, animals received 100% of energy maintenance, calculated as NRC (1997), T2- animals received 170% of energy maintenance; T3: animals received 170% of energy maintenance with addition of 200 g Megalac ®. In the second experiment, 12 Nelore heifers with 14-18 months and 309,6 kg average weight, were allocated in 3 treatments, in tree periods: T1, animals received 100% of energy maintenance, calculated as NRC (1997), T2- animals received 170% of energy maintenance; T3: animals received 170% of energy maintenance with addition of 4% soybean oil in Dry Matter and T4: animals received 170% of energy maintenance with addition of 200 g Megalac ®. After adaptation period, the treatment initiated, animals had synchronized ovulation, blood samples were collected, and follicular aspiration was carried to evaluate the oocytes and *in vitro* embryo production. Follicular development was monitored daily by ultrasonography until day post heat. The consumption of MS and the weight gain were lower in group T1 ($P < 0.05$), in relation to the others treatments. The FSH, LH, and albumin concentrations were not different ($P > 0.05$) among treatments. The cholesterol concentrations were higher in the T3 and T4 groups ($P < 0.05$) only in the second experiment. As well as the albumin, the glucose concentrations, did not change ($P > 0.05$) between the different diets. Concentration of plasmatic urea was not different ($P > 0.05$). The number of small follicles (< 4 mm) and medium (4-8 mm) increased ($P < 0.05$) with diets that increased energy and fat. Large (> 8 mm) follicles did not vary ($P > 0.05$) among treatments. The number of aspirated oocytes by OPU

was lower in T1 in both experiments. The embryo number at D7, and the percentage of embryo development was increased with energy supplementation, with no effects of fat addition. These results indicate that short-term increase in nutritional plane can affect follicular recruitment, and oocyte production by OPU in Nelore heifers.

Key-words: Follicular development, *In vitro production*, fat, nutrition vs reproduction, bovine.

1. INTRODUÇÃO

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, sobretudo em bovinos das raças *Bos taurus indicus*, especialmente da raça Nelore. Os processos de obtenção de oócitos viáveis *in vivo* têm se constituído em uma valiosa ferramenta para o incremento na produção de animais de grande potencial genético pelo uso da fertilização *in vitro* (FIV).

Bovinos da subespécie *Bos taurus indicus* têm dado uma significativa contribuição na pecuária de corte ou de leite em várias regiões tropicais do planeta. Dados de desempenho reprodutivo, como taxa de parição, taxa de desmama e índice de sobrevivência dos bezerros, têm demonstrado variações quanto ao desempenho de animais *Bos taurus indicus*. No entanto, verifica-se que estes animais são superiores em desempenho aos das raças *Bos taurus taurus* quando eles são criados em ambientes tropicais ou subtropicais, onde agentes estressantes, como altas temperaturas, umidade, ectoparasitos e forragem de baixa qualidade são maiores (BÓ *et al.*, 2003). Embora se constituindo na maioria do rebanho nacional, muitos dados sobre a fisiologia reprodutiva, níveis hormonais e certos aspectos relacionados com a reprodução de animais *Bos taurus indicus*, não estão claramente elucidados.

Enquanto os efeitos da alteração na nutrição por períodos prolongados, particularmente a restrição alimentar, sobre o desenvolvimento folicular têm sido estudado extensivamente em bovinos, os efeitos da suplementação alimentar por curtos períodos têm sido menos compreendidos. É sabido que a alimentação com 200% dos requisitos de manutenção por 3 semanas aumenta a população de pequenos folículos (< 4 mm) em animais *Bos taurus taurus* (GUTIERREZ *et al.*, 1997). Outros trabalhos demonstraram que a esteroidogênese pelas células da granulosa, o desenvolvimento de folículos pré-ovulatórios e a maturação dos oócitos são também alterados positivamente como resultado da

suplementação de novilhas com oferecimento de 200% das exigências de manutenção, em dietas com alta energia disponível (ARMSTRONG *et al.* (2001) e ARMSTRONG *et al.* (2002)).

Além da energia, o fornecimento de gorduras na dieta pode elevar a concentração energética da mesma e afetar positivamente os parâmetros reprodutivos. THOMAS E WILLIAMS (1996) observaram que a adição de caroço de algodão aumentou as concentrações séricas de GH, insulina, colesterol e IGF-1. Neste estudo, a dieta com caroço de algodão (15% de Matéria Seca (MS)) proporcionou o consumo de 671 g/dia. Com base na estimativa de liberação de ácido linoléico no intestino delgado, que não passa pela biohidrogenação no rúmen, pode ser absorvido até 168 g desse ácido (STAPLES *et al.*, 1998). THOMAS *et al.* (1997) encontraram também um aumento na taxa de crescimento folicular em resposta a suplementação de óleo de soja (4% da MS) em vacas de leite.

Os efeitos do fornecimento de gordura sobre a população folicular têm sido observados para gado de leite e de corte em todos os estágios da lactação. Quando o milho foi substituído por gordura inerte ao nível de 2,2% da MS total, ao mesmo tempo em que a densidade energética da dieta foi mantida constante, observou-se um aumento no número de folículos médios antes do 25º dia após o parto (LUCY *et al.*, 1991). No 25º dia, o ciclo estral foi sincronizado e o número de folículos pequenos e grandes aumentou no grupo de vacas cujas dietas foram suplementadas com gordura. Outros autores (BEAM e BUTLER, 1998; BEAM e BUTLER, 1999) observaram efeitos similares da suplementação de gordura sobre a população folicular de vacas de leite.

A concentração de progesterona (P4) antes e depois da IA tem sido associada com o aumento da fertilidade de vacas de leite e de corte. A adição de gordura às dietas de vacas de leite e de corte aumenta a concentração de P4 no plasma, o que pode ser benéfico para a fertilização e para a sobrevivência do embrião, o que é imprescindível em processo de transferência de embriões (TE) (SANTOS E AMSTALDEN, 1998).

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- Avaliar os efeitos da suplementação nutricional com níveis elevados em relação aos requisitos de manutenção de energia para novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*) sobre o desenvolvimento folicular, perfil metabólico e produção de oócitos e embriões *in vitro*.

- Avaliar os efeitos da adição de diferentes fontes de gordura sobre o desenvolvimento folicular, concentração hormonal e produção de oócitos e embriões *in vitro* em novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*).

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Dinâmica folicular em *Bos taurus indicus*

Cada onda de crescimento folicular em bovinos envolve um processo de recrutamento, seleção e dominância, onde um grande folículo cresce até um tamanho pré-ovulatório e outros folículos começam a regredir alguns dias antes do maior folículo atingir seu tamanho máximo. A avaliação ultrasonográfica diária dos folículos individualmente confirma estas afirmações e promove uma interpretação mais acurada deste processo (SIROIS & FORTUNE, 1988; KNOPF *et al.*, 1989). Em vários rebanhos, foi encontrada uma predominância de duas a três ondas de crescimento folicular durante o ciclo estral. Cada onda é caracterizada pela emergência de um grupo de folículos de 4 mm, crescimento de todos os folículos por poucos dias, e a divergência de um grande folículo que continua a crescer e pequenos folículos que regridem.

Em geral, as características de crescimento e dominância folicular são similares em animais *Bos taurus indicus* e em *Bos taurus taurus*, com exceção que os primeiros apresentam menores diâmetros máximos dos folículos dominantes (10-12 mm) e do corpo lúteo (CL) (17-21 mm) (BÓ *et al.*, 1993 a,b; FIGUEIREDO *et al.*, 1997; RHODES *et al.*, 1995) quando em comparação com *Bos taurus taurus* (14-20 mm e 20-30 mm, respectivamente) (GINTHER *et al.*, 1989; KASTELIC *et al.*, 1990; BO *et al.*, 1993b). Essas diferenças têm importantes aplicações práticas, pois a identificação do CL torna-se mais difícil em animais *Bos taurus indicus*. Estudos também têm demonstrado que as concentrações de progesterona são menores em *Bos taurus indicus* que em *Bos taurus taurus* de corte. Uma das maiores diferenças entre animais *B. taurus* e *Bos taurus indicus* nestes estudos foi a alta incidência de quatro ondas de crescimento folicular nos *Bos taurus indicus* (4/25 - 16%), comparado com *Bos taurus taurus* (0/17). Quatro ondas de crescimento folicular também têm sido relatadas em novilhas Brahman (8/117 - 6,8%) (RHODES *et al.*,

1995) e em vacas (3/32 - 9,3%) (ZEITOUN *et al.*, 1996), e em vacas Gir (4/15 - 26,7%) (VIANA *et al.*, 1998). Contrariamente, em um estudo de FIGUEIREDO *et al.* (1997) com novilhas Nelore, esse número foi reduzido (1/17 - 5,8%).

Em relação à população folicular, têm sido reportado que os ovários de novilhas *Bos taurus indicus* apresentam maior quantidade de folículos menores que 5 mm de diâmetro do que novilhas *Bos taurus taurus* (SEGERSON *et al.*, 1994). Também há evidências que os sistemas ovarianos de insulina e de fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) de animais *Bos taurus indicus* diferem dos animais *Bos taurus taurus*, como observado por BURATINI *et al.* (2000), onde o tratamento com somatotropina recombinante bovina (bST) aumentou as concentrações plasmáticas de IGF-1 e o número de pequenos folículos (<5 mm). Fato similar foi observado em *Bos taurus taurus* (GONG *et al.*, 1991), porém com uma taxa de incremento do número de folículos menor que o observado em *Bos taurus indicus*, sugerindo que o sistema ovariano de IGF-1 pode diferir entre animais *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*. Também foi observado que vacas Brahman apresentam maiores concentrações plasmáticas de IGF-1 (SIMPSON *et al.*, 1994, ALVAREZ *et al.*, 2000) e menores concentrações plasmáticas de FSH que vacas Angus, sugerindo que o maior número de folículos em vacas Brahman, mesmo com menores concentrações de FSH, possa ser devido as altas concentrações de IGF-1. Além disso, elevadas concentrações de IGF-1 e menores concentrações de FSH resultam em folículos dominantes menos persistentes, o que resulta em um maior número de ondas foliculares durante um ciclo estral, traduzindo-se em uma maior incidência de ciclos estrais com quatro ondas (ALVAREZ *et al.*, 2000). Tal diferença pode também explicar o porquê *Bos taurus indicus* são tão sensíveis às dosagens aplicadas de FSH comumente usadas para superovulação de animais *Bos taurus taurus* (BARROS e NOGUEIRA, 2001).

3.2. Efeitos da nutrição sobre o desenvolvimento folicular e produção de embriões

Em fêmeas bovinas, acredita-se que o maior determinante do sucesso reprodutivo é o processo fisiológico onde as gonadotrofinas (FSH e LH) secretadas pela glândula hipófise irão agir sobre receptores específicos no ovário para estimular o desenvolvimento folicular e produzir um oócito maduro e competente (DRIANCOURT, 2001). Vários estudos mais antigos investigaram a hipótese de que a nutrição e sinais metabólicos relacionados influenciam a função ovariana por alterarem o eixo hipotalâmico-hipofisário a modularem a secreção de gonadotrofinas. Esses estudos não demonstraram uma relação consistente entre a nutrição e a secreção de gonadotrofinas em bovinos, como observado por RHODES *et al.* (1996), que não encontraram alterações nas concentrações circulantes de FSH em novilhas durante e após o anestro induzido por um longo período de restrição na ingestão de matéria seca, e por GUTIERREZ *et al.* (1997), onde a suplementação com 200% das exigências de manutenção por 3 semanas também não produziu alterações nas concentrações destes hormônios. Enquanto mudanças severas e prolongadas na nutrição podem alterar a secreção de LH em bovinos, alterações por curtos períodos parecem não afetar a secreção pulsátil de LH e FSH em bovinos (BOLAND *et al.*, 2001).

A restrição alimentar em novilhas pode afetar adversamente parâmetros morfológicos e funcionais do desenvolvimento folicular, como tamanho, taxa de crescimento e atividade esteroidogênica do folículo dominante (BEAM & BUTLER, 1999; RHODES *et al.*, 1996). Inversamente, a prática de “flushing” (aumento da ingestão de energia por curtos períodos) têm sido responsável por melhorar o desenvolvimento do folículo ovariano e diminuir a percentagem de folículos atrésicos nos ovários (MAURASSE *et al.*, 1985). Entretanto, alguns autores não têm encontrado aumento na população folicular ou melhoras na resposta de produção de embriões quando novilhas e vacas foram suplementadas com níveis aumentados de energia na dieta (BASTOS *et al.*, 2007 a; BASTOS *et al.*, 2007 b)

Já NOLAN *et al.* (1998) demonstraram em seu trabalho, que a restrição alimentar com suplementação de dieta contendo 9,6 MCal/kg/cab/dia de EM (2,18 Kg NDT) contribuiu para o aumento das concentrações circulantes de Progesterona (P_4) em novilhas taurinas em relação aos animais que receberam alimentação *ad libitum*. Tais resultados devem-se, provavelmente, ao aumento do fluxo sanguíneo pelo fígado quando do aumento da ingestão de alimentos, o que resulta na maior metabolização hepática da P_4 pelo fígado. No mesmo trabalho também foi encontrado que animais recebendo uma dieta restrita apresentaram aumento no número de folículos após a administração de 600 UI de pFSH, sem no entanto apresentar diferenças nas taxas de cultivo e de blastocisto quando comparadas aos animais que receberam dietas *ad libitum*.

Estudos mais recentes têm testado a hipótese que hormônios relacionados com a reprodução exercem suas funções diretamente nos ovários. Em bovinos, tratamentos com bST aumentam significativamente a população de pequenos folículos (<4 mm). Este aumento está relacionado com aumento nas concentrações de insulina e IGF-1. Nestes estudos, as concentrações plasmáticas de insulina foram positivamente correlacionadas com a energia da dieta e foi proposto que este hormônio é um fator chave que modula os efeitos da nutrição sobre a função ovariana. Tal fator é explicado pelas observações que as células da granulosa do folículo bovino são dependentes de concentrações fisiológicas de insulina (HOLTORF *et al.*, 1989; GUTIERREZ *et al.*, 1997; GLISTER *et al.*, 2001) e que a infusão de insulina em novilhas de corte aumenta o diâmetro de folículos dominantes (SIMPSON *et al.*, 1994). BEAM E BUTLER (1997) observaram que falhas na ovulação durante a primeira onda folicular em vacas foram associadas à baixas concentrações de insulina, sugerindo que a baixa fertilidade pode estar associada à este hormônio. Os receptores de insulina são largamente distribuídos no ovário e existe a evidência *in vitro* e, indiretamente, *in vivo*, para um efeito estimulatório da insulina sobre a esteroidogênese ovariana.

Assim como a insulina, o IGF-1 é um potente estimulador da secreção de P_4 pelo corpo lúteo (CL) (SPICER & ECHTERNKAMP, 1995; MAMLUK

et al., 1999). Ambos hormônios atuam juntamente com as gonadotrofinas para aumentar a proliferação celular e a esteroidogênese pelas células da granulosa e da teca (SPICER e ECHTERNKAMP, 1995).

As concentrações plasmáticas de Insulina e IGF-1 diminuem quando as dietas deficientes levam os animais ao anestro, mas ao contrário da insulina, que tem ação sistêmica e é levada aos ovários pelo sangue, IGF-1 também é produzida localmente no ovário, e suas concentrações no fluido folicular não são afetadas pelo estado nutricional (SPICER *et al.*, 1992). Portanto, as concentrações de insulina estão mais relacionadas a atuarem como um “sinal” nutricional para os centros hipotalâmicos que regulam a secreção de GnRH e a ciclicidade (MILLER *et al.*, 1995).

Existem várias formas de elevar os níveis circulantes de insulina, dentre elas, as dietas que promovem o aumento da produção de propionato no rúmen podem ser eficazes, mas podem diminuir o apetite dos animais (FARNINGHAM & WHYTE, 1993). O fornecimento de gordura para vacas Brahman resultou em maiores níveis circulantes de insulina (THOMAS *et al.*, 1997), mas elevou também a produção de leite em vacas Holandesas (BEAM & BUTLER, 1997), interferindo negativamente no balanço energético dos animais. A suplementação com altos níveis de proteína para ruminantes está associada com o aumento dos níveis circulantes de insulina em vários estudos (BASSETT *et al.*, 1971), e conforme observado por LANDAU *et al.* (1996), altera a foliculogênese dos animais já aos cinco dias após o início da suplementação. Também a infusão de aminoácidos de cadeia ramificada, como a leucina, ou a inclusão de alimentos ricos em leucina na dieta aumenta as concentrações plasmáticas de insulina (LANDAU *et al.*, 1996).

Uma grande variedade de dietas tem mostrado afetar não somente o crescimento folicular, mas também a qualidade do oócito (ARMSTRONG *et al.*, 2001; BOLAND *et al.*, 2001). Mudanças na ingestão de energia são capazes de influenciar negativamente a morfologia e a competência de oócitos. O aumento da ingestão de Proteína Degradável no Rúmen (PDR) produz um aumento da concentração de amônia no fluido folicular, porém diminui as concentrações plasmáticas de insulina

(SINCLAIR *et al.*, 2001). Essas alterações foram associadas com mudanças no padrão de crescimento folicular e redução na taxa de clivagem e de blastocisto *in vitro*. Embora estas mudanças alterem as taxas de produção *in vitro*, o mesmo não tem ocorrido com embriões *in vivo*, e melhoras no desenvolvimento embrionário precoce têm sido demonstradas em novilhas suplementadas com uma taxa aumentada de insulina em relação ao glucagon (MANN *et al.* 2003).

O sistema ovariano do IGF pode ser influenciado pela dieta, e tem o potencial de interagir diretamente com o oócito através do receptor Tipo I (ARMSTRONG *et al.*, 2001, 2002). Os folículos pequenos de novilhas alimentadas com grandes quantidades de energia tem menores níveis de mRNA para IGFBP-2 e 4 (ARMSTRONG *et al.*, 2001), o que regula a biodisponibilidade de IGF. Provavelmente este é o fator crítico que controla a capacidade de desenvolvimento do oócito (ARMSTRONG *et al.*, 2002). Certamente a superestimulação pelo IGF, e possivelmente pela insulina, podem ter efeitos negativos no desenvolvimento do oócito. Alguns estudos têm demonstrado que as concentrações de IGF-1 são ótimas para o crescimento de folículos *in vitro*, mas podem ter efeitos negativos na maturação oocitária (MCCAFFERY *et al.*, 2000). Estes dados sugerem que mudanças induzidas pela nutrição nos níveis circulantes de insulina e IGF-1 e no sistema ovariano de IGF-1 são importantes para o recrutamento folicular, no entanto, estas mudanças podem ter efeitos negativos na qualidade do oócito presente no folículo em crescimento, dependendo dos níveis sanguíneos de insulina e do ECC dos animais (ADAMIAK *et al.*, 2005).

Trabalhando com ovelhas MCEVOY *et al.* (1995) e LOZANO (2003) observaram uma menor viabilidade ovocitária ou uma produção *in vitro* menor de embriões viáveis nos animais recebendo dietas acima dos níveis de manutenção em relação àqueles com dietas abaixo da manutenção.

Em trabalho onde foi avaliada a produção *in vitro* de embriões em grupos de novilhas taurinas recebendo dietas com alta ou baixa quantidade de energia, NOLAN *et al.* (1998), encontrou maior quantidade de folículos aspirados nas dietas com alta energia, porém com menores taxas de clivagem e de blastocistos. Em

outro estudo, novilhas taurinas alimentadas por um curto período de tempo com feno tiveram mais oócitos fecundados comparadas às demais recebendo silagem, sem diferenças, entretanto na produção *in vitro* de embriões (YAAKUB *et al.*, 1999)

ADAMIAK *et al.* (2005) observaram que o fornecimento de dietas com 200% dos requerimentos de manutenção associado a um ECC alto em bovinos, foi prejudicial à qualidade oocitária e produção *in vitro* de embriões, porém a alta ingestão alimentar em novilhas com baixo ECC apresentou efeito positivo no desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto. Os autores sugerem que o “flushing” nutricional associado ao alto ECC nos animais possa exercer um efeito deletério sobre a maturação oocitária e produção de embriões, possivelmente devido à hiperinsulinemia observada neste grupo de novilhas (BASTOS *et al.*, 2007 ab). Já FRERET *et al.* (2006) encontraram efeitos prejudiciais do alto ganho de peso em novilhas holandesas na produção *in vitro* de embriões comparadas a novilhas com baixo ganho de peso, valendo ressaltar que estes animais apresentavam balanço energético positivo, e moderado ECC.

3.3. Adição de gordura dietética

A gordura suplementar pode aumentar a concentração de energia da dieta e o status energéticos dos bovinos, melhorando desta forma a fertilidade. No entanto, os ácidos graxos (AGs) também parecem afetar os processos reprodutivos de maneira que não estão relacionadas à energia. Como exemplo, a maior disponibilidade de precursores dos ácidos graxos permite maior secreção de esteróides e eicosanóides, que podem alterar a função uterina e ovariana. Nas células, os ácidos graxos podem ter efeitos diretos na transcrição dos genes que codificam proteínas essenciais para os eventos reprodutivos, afetando ainda a estrutura da membrana celular.

Gorduras de origem vegetal e animal contém os AGs insaturados palmítico, oléico, linoléico e linolênico. O AG mais freqüente em sementes de

oleaginosas é o ácido linoléico (C18:2), já em forragens há a predominância do ácido linolênico (C18:3). Os AGs derivados de óleos vegetais parecem ter maior impacto sobre o desempenho reprodutivo. Das diversas fontes as mais comuns incluem: semente ou óleo de girassol, semente de cártamo, caroço de algodão, farelo de arroz, e grão de soja (FUNSTON, 2004).

Existem evidências de que a suplementação com gorduras altera o clearance de progesterona. GARCIA-BOJALIL *et al.* (1998) verificaram que a suplementação de vacas de leite em lactação com sais de Ca de ácidos graxos de cadeia longa duplicou o número de corpos lúteos, reduzindo o tempo da primeira elevação de P4, duplicou o número de fases lúteas normais e aumentou as concentrações plasmáticas de P4, elevando também as taxas de prenhez de 52,3 para 86,4%, com aumento do tamanho dos corpos lúteos. Em outro estudo, onde células da granulosa foram coletadas de vacas suplementadas com gordura, estas apresentaram maiores secreções de P4 e androstenediona (WEHRMAN, 1991).

No entanto, existem evidências de que apenas ácidos graxos saturados ou monoinsaturados melhoram as concentrações de P4 circulante. A incubação de células lúteas dispersas de bovinos com PUFA diminuiu a secreção de P4 (HINCKLEY *et al.*, 1996). Em outro estudo, as mesmas dietas reduziram a progesterona plasmática, particularmente no início da fase lútea (ROBINSON, *et al.*, 2001).

HOMA E BROWN (1992) estudaram a composição do fluido folicular de folículos em desenvolvimento, em relação à quantidade de ácidos graxos. O ácido linoléico foi o principal ácido graxo encontrado, constituindo um terço dos encontrados. O ácido oléico representava 19% dos ácidos graxos totais em folículos pequenos e 17% em folículos grandes. Os ácidos graxos saturados representavam menos de 30% dos ácidos graxos totais no fluido folicular. A proporção de ácido linoléico foi significativamente menor no fluido folicular de folículos grandes (31% dos ácidos graxos totais) do que de folículos pequenos (35% dos ácidos graxos totais). Houve correlação inversa entre o diâmetro do folículo e a proporção de ácido linoléico no fluido folicular.

ADAMIAK *et al.* (2006) compararam a composição de AGs plasmáticos com a de células da granulosa (CGs) e de complexos cumulus-oócito (COCs) em novilhas suplementadas com 0 ou 6% de sais de cálcio e óleo de palma. Altos níveis de AGs na dieta reduziram o número de blastocistos em novilhas com escore de condição corporal (ECC) baixa, mas não no ECC moderado. As alterações induzidas pela dieta no conteúdo de AGs no plasma foram menos aparentes nas CGs do que nos COCs. Ainda que os lipídeos da dieta aumentassem o teor de AGs nos COCs, a captação seletiva de AGs saturados, assegurou que a composição dos COCs não fosse influenciada pela dieta. Contudo, a concentração de AGs saturados dentro dos COCs foi elevada, e aumentos posteriores no teor de AGs podem ter comprometido o desenvolvimento pós-fertilização.

FOULADI-NASHTA *et al.* (2007) estudaram os efeitos dos AGs da dieta sobre a qualidade do oócito em vacas leiteiras em lactação, que foram alimentadas com dietas contendo níveis altos (0,8 kg/d) ou baixos (0,2 kg/d) de sais de cálcio de óleo de palma, e os oócitos foram coletados por OPU. Durante o cultivo *in vitro*, uma maior proporção de oócitos fertilizados do grupo tratado com alto teor de gordura desenvolveu-se até o estágio de blastocisto. Os mesmos autores compararam também os sais de cálcio de óleo de palma com gorduras protegidas na forma de soja (ricas em ácido linoléico) ou linhaça (ricas em ácido linolênico). Foram encontradas diferenças nos perfis de AGs do soro e do leite, que estavam diretamente relacionados com os perfis de AGs da dieta. A taxa de clivagem e a qualidade dos oócitos foram menores nas vacas que receberam gorduras com altos teores de ácido linoléico ou linolênico. Não se sabe se estes efeitos são devido às diferenças na estrutura da membrana do oócito, status oxidativo ou AGs como fonte de energia.

Os efeitos do fornecimento de gordura sobre a população folicular têm sido observados para gado de leite e de corte em todos os estágios da lactação. Quando o milho foi substituído por gordura inerte ao nível de 2,2% da MS total, ao mesmo tempo em que a densidade energética da dieta foi mantida constante, observou-se um aumento no número de folículos médios antes do 25º dia após o

parto (LUCY *et al.*, 1991). No 25º dia, o ciclo estral foi sincronizado e o número de folículos pequenos e grandes aumentou no grupo de vacas cujas dietas foram suplementadas com gordura. Outros autores (BEAM E BUTLER, 1998; BEAM E BUTLER, 1997) observaram efeitos similares da suplementação de gordura sobre a população folicular de vacas de leite.

THOMAS *et al.*(1997) observaram que a adição de caroço de algodão aumentou as concentrações séricas de GH, insulina, colesterol e IGF-1. No presente estudo, a dieta com caroço de algodão (15% MS) proporcionou o consumo de 671 g/dia. Com base na estimativa de liberação de ácido linoléico no intestino delgado, que não passa pela biohidrogenação no rúmen, pode ser absorvido até 168 g desse ácido (STAPLES *et al.*, 1998). THOMAS E WILLIAMS (1996) encontraram também um aumento na taxa de crescimento folicular em resposta a suplementação de óleo de soja (4% da MS) em vacas de leite.

Efeitos similares da suplementação com gordura sobre o número e o tamanho dos folículos ovarianos têm sido observados em vacas de corte pós-parto, embora alguns resultados sejam contraditórios. A adição de gordura à dieta aumentou o número de folículos de todas as classes de tamanho em vacas no pós-parto (THOMAS E WILLIAMS, 1996). Um aumento no número de folículos menores pode refletir em uma seleção maior de estruturas disponíveis para desenvolvimento posterior. Um número maior de folículos pode indicar um processo de seleção folicular alterado e maior disponibilidade de estruturas para ovular ou disponíveis para aspiração folicular (OPU).

O colesterol é a substância precursora para a síntese de progesterona pelos tecidos esteroidogênicos, e a HDL e a LDL fornecem colesterol aos tecidos ovarianos para a síntese de hormônios esteróides (GRUMMER E CARROLL, 1991; GRUMMER E CARROLL, 1988). A hipercolesterolemia pode aumentar a concentração plasmática de progesterona em bovinos. Entretanto, o mecanismo parece estar associado com a taxa de metabolização de progesterona, e não com a sua síntese pelo CL (HAWKINS *et al.*, 1995).

Aumentos na fertilidade do rebanho têm sido associados com uma concentração mais alta de progesterona durante as fases luteais anterior e posterior à inseminação (BRITT *et al.*, 1996; GRUMMER E CARROLL, 1991). Tem sido demonstrado que a adição de gordura às dietas de vacas de leite e de corte aumenta as quantidades de colesterol no plasma, e a concentração de colesterol nos fluidos corporal e folicular e no CL (STAPLES *et al.*, 1998; RYAN *et al.*, 1992; GRUMMER E CARROLL, 1991). O aumento nas concentrações de colesterol plasmático em bovinos deve-se principalmente ao aumento do nível de lipoproteínas de alta densidade (HDL) (HAWKINS *et al.*, 1995), sendo esta a única lipoproteína com acesso ao compartimento intrafolicular, independentemente da espécie.

GRUMMER E CARROLL (1991) revisaram diversos estudos nos quais lipídeos foram acrescentados à dieta de vacas de leite. Eles observaram que, em todos eles, as concentrações de colesterol no plasma foram consistentemente elevadas nas dietas com suplementação com gordura, em relação às dietas controle. Utilizando dados com gado de leite e de corte (SANTOS E AMSTALDEN, 1998), foram observados resultados similares aos descritos por aqueles autores.

Como o colesterol circulante é o substrato primário para a síntese de P4 em mamíferos, a adição de gordura poderia propiciar um aumento na síntese de P4, e elevar a progesterona plasmática. Este efeito tem sido observado tanto para vacas de leite como de corte. A concentração de progesterona no fluido folicular e no tecido luteal aumentou, conforme demonstrado em alguns estudos (RYAN *et al.*, 1995; RYAN *et al.*, 1992), mas não em todos (LAMMOGLIA *et al.*, 1997) quando gordura foi adicionada à dieta.

HAWKINS *et al.* (1995) sugeriram que o aumento na concentração de progesterona plasmática em vacas alimentadas com gordura não é devido ao aumento na sua síntese, mas sim devido a uma menor taxa de metabolização. Estes resultados podem explicar a razão pela qual vacas de leite e de corte têm maiores níveis de progesterona no plasma, sem efeito no número ou no tamanho (área) do CL, quando elas são alimentadas com dietas contendo gordura (GARCIA-BOJALIL *et*

al., 1998; LAMMOGLIA *et al.*, 1997; THOMAS E WILLIAMS, 1996; RYAN *et al.*, 1995).

A concentração de progesterona antes e depois da IA tem sido associada com o aumento da fertilidade de vacas de leite e de corte. A recuperação de embriões 7 dias após o cio em vacas de leite em lactação aumentou à medida que a concentração de progesterona no plasma aumentou durante a fase luteal do ciclo anterior (BRITT *et al.*, 1996). Entretanto, a suplementação com gordura na dieta de vacas de corte não afetou a taxa de fertilização nem a recuperação de embriões após a superovulação (RYAN *et al.*, 1992).

3.4. Metabólitos Sanguíneos

A quantificação de metabólitos sanguíneos é uma ferramenta para avaliação do estado de deficiências nutricionais e anormalidades que podem estar ligadas com a infertilidade bovina (ROWLANDS *et al.*, 1980). Vários estudos têm sido realizados com o intuito de verificar as relações e efeitos de metabólitos sanguíneos nos parâmetros reprodutivos, entre eles glicose, uréia, colesterol, albumina e insulina, mas os resultados são contraditórios. Ureia e glicose podem ser usados para monitorar a ingestão de alimentos protéicos e energéticos, segundo ROWLANDS *et al.* (1980). RUAS *et al.* (2000) não observaram relação dos níveis plasmáticos de colesterol com a fertilidade, enquanto que KAPPEL *et al.* (1984) a encontraram. RUTTER & MANNS (1987) relacionaram a hipoglicemia com a depressão da função reprodutiva, enquanto que BLOWEY *et al.* (1973) e ROWLANDS *et al.* (1980) não encontraram correlação de níveis plasmáticos de glicose com a fertilidade. RICHARDS *et al.* (1989) e VIZCARRA *et al.* (1998) associaram concentrações reduzidas tanto de glicose como de insulina com anestro nutricional. Vários autores têm observado que baixas concentrações de albumina ou a incapacidade para manter seus níveis estáveis no pós-parto atrapalham a função reprodutiva (CARROLL *et al.*, 1988).

3.5. Produção *in vitro* de embriões

Por mais de uma década, têm sido produzidos bezerros através da maturação (MIV), fecundação (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV), entretanto a proporção de oócitos que se desenvolvem até o estágio de blastocisto não tem aumentado (FARIN *et al.*, 2001). Muita atenção têm sido dada ao ambiente de desenvolvimento *in vitro*, no entanto, a inabilidade em aumentar a produção *in vitro* de embriões pode ser resultado de uma inerente competência dos oócitos colhidos de pequenos folículos (2-6 mm de diâmetro). A maioria dos COCs obtidos de folículos de 2-6 mm conseguem completar a maturação nuclear *in vitro*, mas muitos não são capazes de produzir blastocistos (BRACKET & ZUELKE, 1993). A competência oocitária, definida como a habilidade de um oócito desenvolver-se até o estágio de blastocisto em cultivo *in vitro*, têm sido examinada em relação ao diâmetro folicular em bovinos (PAVLOK *et al.*, 1992; DODE *et al.*, 2000), e o diâmetro folicular têm sido usado como o principal método para selecionar COCs para a produção *in vitro*. No entanto, folículos de mesmo diâmetro podem estar em fases fisiológicas distintas, desde a fase de crescimento até a fase de atresia, dependendo do estágio de desenvolvimento da onda folicular no momento da aspiração folicular. Alguns estudos são controversos quando da indicação do melhor momento para obtenção de oócitos competentes para a produção *in vitro* de embriões.

DODE *et al.* (2000) não observaram diferenças nas taxas de maturação nuclear e clivagem em oócitos obtidos de vacas zebuínas, em relação ao diâmetro folicular (1-9mm), sugerindo que a competência para maturação em zebuínos é adquirida mais cedo ou com tamanho menor de folículo do que em taurinos.

Em estudo com animais *Bos taurus taurus*, VASSENA *et al.* (2003) encontraram diferenças na taxa de produção de blastocisto a partir de oócitos obtidos em diferentes dias de crescimento folicular. Os oócitos coletados a partir de folículos

com 5 dias após o início de crescimento de uma onda folicular, apresentaram taxa de produção de blastocisto de 23%, superior aos coletados nos dias 2, 3 e 7 que apresentaram taxas de 12, 13 e 16%, respectivamente. Estes dados sugerem que os oócitos contidos em folículos subordinados de 5 dias de crescimento encontravam-se no início da fase de atresia, e que a atresia inicial é benéfica a competência oocitária, embora as razões não sejam bem conhecidas. Já MACHATKOVA *et al.* (2004) avaliando a recuperação e as taxas de produção de blastocisto a partir de oócitos de diferentes classes de tamanho em duas fases de crescimento (3 e 7 dias após início de onda folicular), não encontraram diferenças nas taxas de produção de oócitos, e as melhores taxas de produção de blastocistos a partir de oócitos e o número médio de embriões por doadora foram maiores na fase de crescimento (dia 3) do que na fase de dominância (dia 7), com valores de 30,3 e 14,9% para taxa de produção de blastocisto, e 8 e 3,8 para número de embriões, respectivamente. HENDRIKSEN *et al.* (2004) encontraram melhores taxas de produção de blastocistos quando os oócitos foram aspirados no dia 2 (27%) e no dia 5 (29%), em comparação com o dia 8 (15%) a partir do início do crescimento de uma nova onda folicular, o que sugere um efeito negativo do folículo dominante sobre a competência oocitária.

4. MATERIAL E METODOS

4.1. Animais e tratamentos

Experimento 1 – Efeito da suplementação energética e com Megalac sobre o perfil metabólico, desenvolvimento folicular e produção de oócitos e embriões em novilhas Nelore

Vinte novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*) com idade média de 30 meses, com peso médio de $417,0 \pm 42,4$ kg foram distribuídas aleatoriamente em 3 tratamentos, de acordo com o peso e a população folicular avaliada por ultrasonografia: T1 (n= 7), cujos animais receberam 100% das exigências de manutenção de energia (MANT), calculados conforme NRC (1997), T2 (n= 6), onde os animais receberam 170% das exigências de manutenção de energia (1,7 X M), conforme NRC, e T3 (n= 7), onde os animais receberam 170 % das exigências de manutenção de energia (1,7X M), conforme NRC, com adição de 200 g de gordura protegida (Megalac®) (MEGA). O período de adaptação das dietas foi de 14 dias, onde os animais receberam feno de capim *Brachiaria* e suplemento concentrado com 18% Proteína Bruta (PB) e 65% Nutrientes Digestíveis Totais (NDT), composta de milho, farelo de soja e premix mineral, para atender 100% dos requisitos de manutenção de energia e proteína, em quantidade equivalente a 2% do peso vivo em matéria seca (MS). O fornecimento de ração foi realizado em duas refeições diárias, às 08:00 h e às 16:00 h, nas dependências da EMBRAPA-CNPGC, em Campo Grande-MS. Antes do fornecimento do suplemento foram avaliadas e pesadas as sobras da refeição anterior, para mensuração do consumo individual.

Imediatamente após o período de adaptação, foi iniciada a suplementação diferenciada, de acordo com os tratamentos descritos acima, os quais se encontram sumarizados na Tab 1.

Tabela 1- Composição das dietas experimentais do exp 1.

	T1 (MANT)	T2 (1,7XM)	T3 (MEGA)
Feno (kg/dia)	4,40	4,40	4,50
Milho (kg/dia)	0,51	3,85	3,40
Farelo Soja(kg/dia)	0,22	0,63	0,58
Suplemento mineral (6% P)	0,03	0,02	0,02
Uréia (kg/dia)	0,14	0,02	0,02
Gordura Protegida (kg/dia)	-	-	0,20

4.1.2. Experimento 2- Efeito da suplementação energética e com diferentes fontes de gordura sobre desenvolvimento folicular e produção de oócitos e embriões de Novilhas Nelore

Doze novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*) com idade variando de 14 a 18 meses, com peso médio inicial de 338,6 kg, foram distribuídas em 4 tratamentos, de acordo com o peso e a população folicular avaliada por ultrasonografia: T1 (n=3), cujos animais receberam 100% das exigências de manutenção de energia, calculados conforme NRC (1997) (MANT), T2 (n=3), onde os animais receberam 170% das exigências de manutenção de energia, conforme NRC (1,7 X M), T3 (n=3), onde os animais receberam 170% das exigências de manutenção de energia, conforme NRC, com adição de 4% de óleo de soja na MS (SOJA), e T4 (n=3), onde os animais receberam 170% das exigências de manutenção de energia, conforme NRC, com adição de 200 g de gordura protegida-ácidos graxos de cadeia longa (Megalac®) (MEGA). A composição das dietas experimentais encontra-se sumarizada na Tab. 2.

O período de adaptação foi de quinze dias, durante o qual os animais receberam silagem de milho e suplemento energético com 18% PB e 65% NDT composta de milho, farelo de soja e premix mineral, para atender 100% dos requisitos de manutenção de energia e proteína, em quantidade equivalente a 2% do peso vivo em matéria seca. O fornecimento de ração foi realizado em duas refeições diárias, as 08:00 h e as 16:00 h. Antes do fornecimento da ração foram avaliadas e pesadas as sobras da refeição anterior, para avaliação do consumo.

Imediatamente após o período de adaptação, foi iniciada a suplementação diferenciada, de acordo com os tratamentos descritos acima. Após o período de adaptação, coleta de sangue, avaliação do desenvolvimento folicular e aspiração folicular para fertilização *in vitro*, com duração total de 35 dias, os animais foram novamente colocados na dieta de adaptação, e alternados de dieta, totalizando três períodos de coleta.

Tabela 2 - Composição das dietas experimentais exp 2.

	T1 (MANT)	T2 (1,7X M)	T3 (SOJA)	T4 (MEGA)
Silagem milho(kg/dia)	3,63	4,60	4,30	4,30
Suplemento Energético (18% PB-65 NDT)	1,35	3,60	3,20	3,20
Suplemento mineral (6% P)	0,07	-	-	-
Uréia	0,14	-	-	-
Óleo Soja (kg/dia)	-	-	0,32	-
Gordura Protegida (kg/dia)	-	-	-	0,20

4.2. Sincronização de cio e avaliação do desenvolvimento folicular

Após quinze dias de arraçoamento com as dietas experimentais, os animais foram sincronizados para apresentarem ovulação em um período próximo, através da utilização de implante de dispositivo intravaginal contendo 1,0 g de progesterona (Cronipress® - Biogenesis Arg) e aplicação de 2 mg de benzoato de estradiol no dia da colocação do implante. O implante foi mantido por oito dias, e dois dias antes da retirada dos implantes foi aplicada uma dose de PGF₂ (Croniben® - Biogenesis - Arg). Um dia após a retirada do implante, foi aplicado 100 µg de acetato de Buserelina para indução de ovulação e foi realizada a identificação visual do estro dos animais. Após a visualização do folículo pré-ovulatório foi acompanhado diariamente o desenvolvimento folicular com a utilização de aparelho de ultra-som com transdutor transretal de 7,5 MHZ (Falcon 100, Pie Medical®) até o oitavo dia do

novo ciclo estral, com a identificação e aspiração do folículo dominante, com no mínimo 0,8 cm de diâmetro, conforme descrito por FIGUEIREDO *et al.* (1997). A cada avaliação dos animais, os folículos foram identificados, desenhados em diagramas e mensurados, sendo os maiores acompanhados individualmente pela posição e diâmetro durante os dias sucessivos para a determinação dos folículos dominantes e subordinados.

O número de folículos à emergência da onda, o diâmetro e a taxa de crescimento do folículo dominante e pré-ovulatório foi avaliada.

Na Fig. 1 encontram-se sumarizadas as atividades desenvolvidas durante o período experimental.

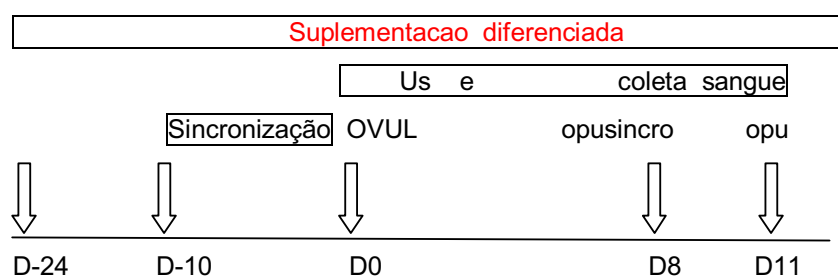


Figura 1- Atividades durante o período experimental

D -24: Início da suplementação diferenciada;

D -10: Implante Progesterona e aplicação estradiol;

D -4: Aplicação PgF2 α ;

D-2: Retirada implante;

D-1 até D 0: Observação cio animais e desenvolvimento folicular;

D1 até D8: Avaliação desenvolvimento folicular e coleta de sangue

D8: Aspiração folículo dominante e maiores 5mm

D 11: OPU e MIV

4.3 Colheita de sangue e dosagens de metabólitos sanguíneos

Nos dias 1 e 2 após a ovulação foram colhidas duas amostras de sangue, as 7:00 e 18:00 h, e após o dia 3 até o dia 8 do ciclo estral, foi colhida às 7:00, antes do fornecimento da alimentação, uma amostra de sangue através da veia coccígea, em tubos contendo heparina, para obtenção do plasma sanguíneo. Os tubos foram mantidos em gelo até a centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação, as amostras foram acondicionadas em tubos Eppendorf e armazenadas a -20°C até a determinação das concentrações hormonais. Após a separação do plasma sanguíneo foi efetuada a avaliação das concentrações plasmáticas de glicose, uréia, albumina e colesterol com utilização de kits comerciais, envolvendo reações enzimáticas colorimétricas com o uso de espectrofotômetro.

4.4. Radioimunoensaio

A dosagem da concentração plasmática dos hormônios foi realizada na FMVA-Unesp Câmpus de Araçatuba, Laboratório de Endocrinologia, Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal (DAPSA). Para a dosagem de progesterona foi utilizado um kit comercial (Coat-a-Count, Diagnostic Products Corporation, CA, USA), utilizado de acordo com as recomendações do fabricante. Em um ensaio realizado a sensibilidade foi de 0,01 ng/mL e o coeficiente intra-ensaio 2,4%.

A dosagem da concentração plasmática de FSH foi determinada utilizando radioimunoensaio validado para bovinos, com FSH bovino (USDA-bFSH) para iodação e padrão de referência e NIDDK-anti-oFSH como primeiro anticorpo, previamente descrito por BOLT E ROLLINS (1983). Em um ensaio realizado a sensibilidade foi 0,009 ng/mL e o coeficiente intra-ensaio de 4,93%.

Os ensaios para determinação de LH bovino foram adaptados dos descritos por BOLT E ROLLINS (1983) e BOLT *et al.* (1990). Em um ensaio realizado a sensibilidade foi 0,001 ng/mL e o coeficiente intra-ensaio de 3,6 %.

4.5. Aspiração folicular

No dia 8 de crescimento folicular, os folículos dominantes e todos os folículos maiores que 5 mm foram aspirados para sincronização de uma nova onda de crescimento folicular, e foi realizada a aplicação de 2 mL de PGF2 α (Croniben ®- Biogenesis Arg). Três dias após a aspiração do folículo dominante, foram aspirados todos os folículos visualizados nos ovários para obtenção dos oócitos, com utilização de agulhas de 18 G, acopladas à sonda convexa transvaginal, com bombas de sucção a vácuo (70 mm/hg), produzindo um fluxo de 15 mL/ minuto. Subseqüentemente, o fluido folicular foi inspecionado em placa de Petri sob microscópio estereoscópico para a obtenção dos Complexos cumulus-oócito (COCs). Após a seleção dos oócitos, os mesmos foram lavados 2 vezes em meio de lavagem H-199 (constituído de meio TCM 199, suplementado com 0,2 mM de Piruvato, 20 mM de HEPES, 5 mM de Bicarbonato de sódio, 75 μ g de Kanamicina/mL) e uma vez em meio de maturação B-199 (constituído de TCM 199 com aditivos), antes de serem tranferidos para criotubos contendo 200 μ L de meio de maturação coberto com óleo mineral. Os criotubos foram acondicionados em incubadora portátil Minitub em atmosfera ambiente, em temperatura de 38,5°C e encaminhados até o Laboratório de Fisiologia da Reprodução da Unesp, Câmpus de Araçatuba.

4.6. Produção *in vitro* de embriões

No laboratório, os COCs selecionados foram removidos dos criotubos e transferidos para placa de cultivo celular (35 mm de diâmetro - Corning),

em microgotas de 100 μ L de meio de maturação recobertas com óleo mineral (20 COCs por gota). O meio de maturação utilizado (B-199) foi o TCM 199 adicionado de 0,2 mM de Piruvato, 25 mM de Bicarbonato de sódio, 75 μ g de Kanamicina/mL, 0,5 μ g de FSH/mL, 100 UI de hCG/mL, 1 μ g de 17- β Estradiol/mL e 10% SFB. O cultivo de maturação ocorreu por um período total de 24 horas em estufa a 38,5 °C, contendo 5% de CO₂ em ar atmosférico e 99% de umidade.

Foi utilizado sêmen de um único doador e uma única partida. As palhetas de sêmen foram descongeladas em banho-maria a 35-37°C durante 30 segundos. Os espermatozóides foram capacitados em heparina (30 μ g/mL) e a motilidade foi estimulada por PHE (40 μ L/mL) (BAVISTER, 1989). A concentração foi ajustada para 25x10⁶ espermatozóides vivos por mL, sendo adicionados 4 μ L para cada gota de fecundação (concentração final de 100 x 10³ espermatozóides por gota de meio).

Após a maturação, os oócitos foram lavados no meio de fecundação (TALP) suplementado com 10 μ g/mL de heparina, 160 μ L PHE e 0,6% BSA, sendo então transferidos para as microgotas de fecundação (20 oócitos/microgota). A fecundação foi realizada a 38,5°C, por 18 horas em estufa contendo 5% CO₂ em ar atmosférico e 99% de umidade.

Após, os prováveis zigotos foram lavados duas vezes em meio TALP e uma vez em meio SOF-Modificado, sendo então transferidos para as microgotas do CIV. O cultivo de desenvolvimento embrionário foi realizado em microgotas de 100 μ L de meio SOF-Modificado suplementado com 0,5% de BSA e 2,5% SFB. O cultivo foi conduzido em estufa à temperatura de 38,5°C, contendo 5% de CO₂ em ar atmosférico e 99% de umidade, durante 7 dias. A cada 48 horas, 50% do meio de cultivo foi renovado. A avaliação do desenvolvimento embrionário foi realizada 40 (clivagem), 120 (formação de mórulas e blastocistos), 168 horas pós-inseminação (formação de blastocistos), quando os blastocistos foram avaliados.

4.7. Análise estatística

Experimento 1

A análise estatística foi efetuada empregando-se o sistema SAS (Statistical Analysis System) (SAS, 1998), através do PROC GLM. Os dados de peso, consumo de alimentos, concentrações hormonais e desenvolvimento folicular (número e tamanho dos folículos), foram avaliados em amostras repetidas utilizando análise de variância, com aplicação de teste de comparação de médias (SNK $P > 0,05$) em um delineamento inteiramente casualizado. As percentagens de desenvolvimento embrionário foram avaliadas utilizando teste de Qui-quadrado (χ^2).

Experimento 2

Na análise estatística foi utilizado o programa SAS, aplicando-se análise de variância, visando comparar as concentrações dos metabólitos sanguíneos e dados do desenvolvimento folicular (número e tamanho de folículos e corpo lúteo), produção de oócitos, em amostras repetidas, tendo como fonte de variação os tratamentos e os períodos de colheita, em um delineamento em blocos ao acaso. As diferenças observadas na análise de variância foram testadas utilizando-se teste de comparação de médias (SNK, $P > 0,05$). Para análise das taxas de produção de embriões foi utilizado o teste Qui-quadrado χ^2 .

5. RESULTADOS

5.1. Experimento 1 – Efeito da suplementação energética e com Megalac sobre o perfil metabólico, desenvolvimento folicular e produção de oócitos e embriões em novilhas Nelore

5.1.1. Consumo de alimentos e ganho de peso

Os animais dos grupos T2 e T3 consumiram uma maior quantidade de matéria seca, que o grupo T1 ($P<0,05$) (Tab. 3). Ao início do tratamento, o peso das novilhas foi semelhante entre os tratamentos, com valores de 425,0; 419,3 e 398,0 Kg para os grupos T1, T2 e T3 respectivamente. Ao final do experimento, o ganho de peso total dos animais dos grupos T2, T3 ($22,0 \pm 12,68$ e $21,4 \pm 11,67$, respectivamente) foi maior ($P<0,05$) do que o grupo T1 ($1,4 \pm 18,33$) (Tab. 3 e Fig. 2).

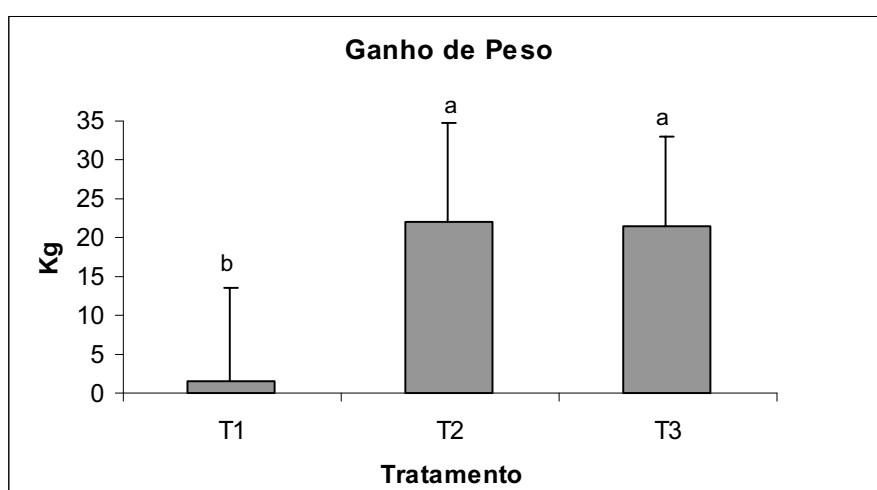


Figura 2- Ganho de peso total (kg), de acordo com o tratamento- Exp 1

Tabela 3 - Ganho de peso (Kg) e consumo de alimento (Kg/MS/dia) durante os períodos experimentais em função dos tratamentos- exp 1.

	N	Ganho médio diário (Kg/animal/dia)	ECC inicial (1-9)	Ganho peso (Kg)	Consumo de alimento
T1 (MANT)	7	0,1 ^b	4,0 ^a	1,40 ± 1,80 ^b	5,32 ± 0,3 ^b
T2 (1,7 XM)	6	0,9 ^a	4,2 ^a	22,0 ± 12,7 ^a	8,14 ± 0,4 ^a
T3 (MEGA)	7	0,9 ^a	3,9 ^a	21,4 ± 11,7 ^a	8,03 ± 0,6 ^a

Médias, na coluna, seguidas de letras distintas são diferentes (P<0,05) pelo teste SNK.

Das 20 novilhas sincronizadas, uma novilha do grupo T1 e uma novilha do grupo T3 não apresentaram ovulação após a retirada dos implantes, e os dados referentes foram suprimidos para as análises estatísticas.

5.1.2. Concentrações hormonais (P4), LH e FSH

Os valores de P4 variaram de 0,2 ng/dL no primeiro dia do ciclo após a ovulação até 3,8 ng/dL no dia 8, com maior valor total para o grupo T3 (P<0,05) (Tab. 4), menor valor para os grupos T1, e valor intermediário para o grupo T2. Foi encontrada diferença na concentração diária deste hormônio nos dias 6 e 7 do ciclo estral, com maiores valores para o grupo T3 (Fig. 3). As concentrações de FSH, assim como de LH não foram diferentes entre os tratamentos (P>0,05) (Fig 4).

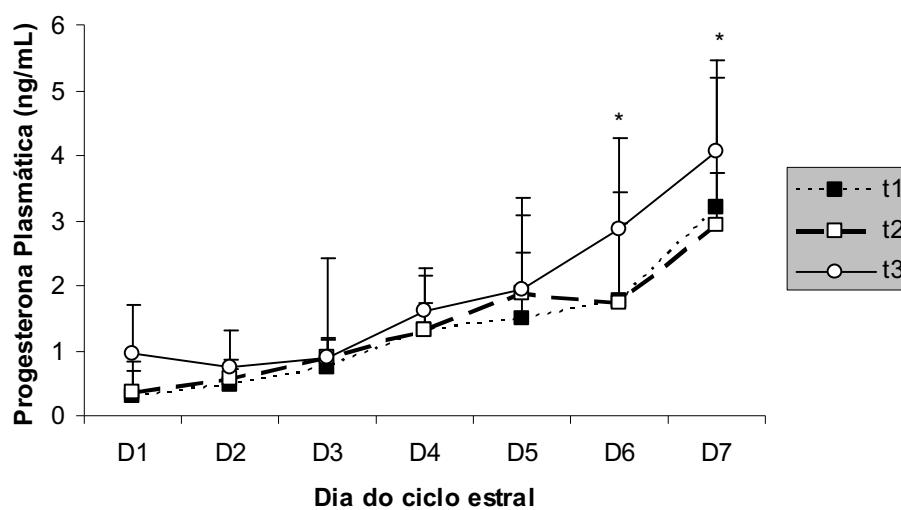


Figura 3 - Concentração plasmática de progesterona (P4, ng/mL), durante o ciclo estral sincronizado em função dos tratamentos.

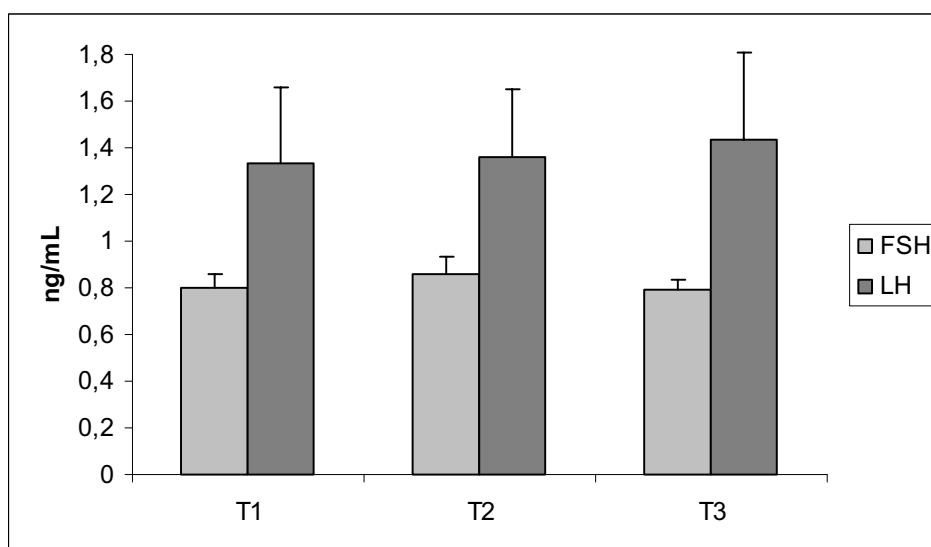


Figura 4 - Concentração plasmática de FSH e LH (ng/mL), durante o ciclo estral sincronizado em função dos tratamentos.

5.1.3. Uréia, albumina, colesterol e glicose

Não houve diferença na concentração plasmática total de albumina entre os grupos estudados ($P>0,05$) (Tab. 4). Os valores diários de albumina apresentaram diferenças entre os tratamentos nos dias 2 e 6 do ciclo estral, com maiores valores encontrados no T1 (Fig 5).

Tabela 4 - Concentrações dos metabólitos sanguíneos totais (Albumina, Colesterol, Glicose e Uréia) e hormônios (FSH, LH, P4), em função dos tratamentos.

	T1 (MANT)	T2 (1,7X M)	T3 (MEGA)
Albumina (g/dL)	$2,4 \pm 0,5^a$	$2,2 \pm 0,4^a$	$2,2 \pm 0,5^a$
Colesterol (mg/dL)	$112,8 \pm 27,0^a$	$104,6 \pm 23,5^a$	$115,1 \pm 31,8^a$
Glicose (mg/dL)	$66,2 \pm 23,5^a$	$75,6 \pm 31,2^a$	$73,2 \pm 44,1^a$
Uréia (mg/dL)	$17,3 \pm 5,1^c$	$25,8 \pm 8,2^a$	$24,0 \pm 7,2^a$
FSH (ng/mL)	$0,8 \pm 0,1^a$	$0,9 \pm 0,1^a$	$0,8 \pm 0,1^a$
LH (ng/mL)	$1,3 \pm 0,3^a$	$1,4 \pm 0,3^a$	$1,4 \pm 0,3^a$
Progesterona (ng/mL)	$1,8 \pm 0,7^b$	$2,1 \pm 0,8^{ab}$	$2,6 \pm 1,4^a$

Médias, na linha, seguidas de letras distintas são diferentes ($P<0,05$) pelo teste SNK.

As concentrações plasmáticas de glicose não variaram com os tratamentos, tampouco, entre os dias do ciclo estral ($P>0,05$). Os valores de uréia foram maiores nos grupos T2 e T3, do que no grupo T1 ($P<0,05$). Também os valores de colesterol foram numericamente superiores no T1 e T3, porém não diferindo estatisticamente entre si e entre o T2 (Tab 4).

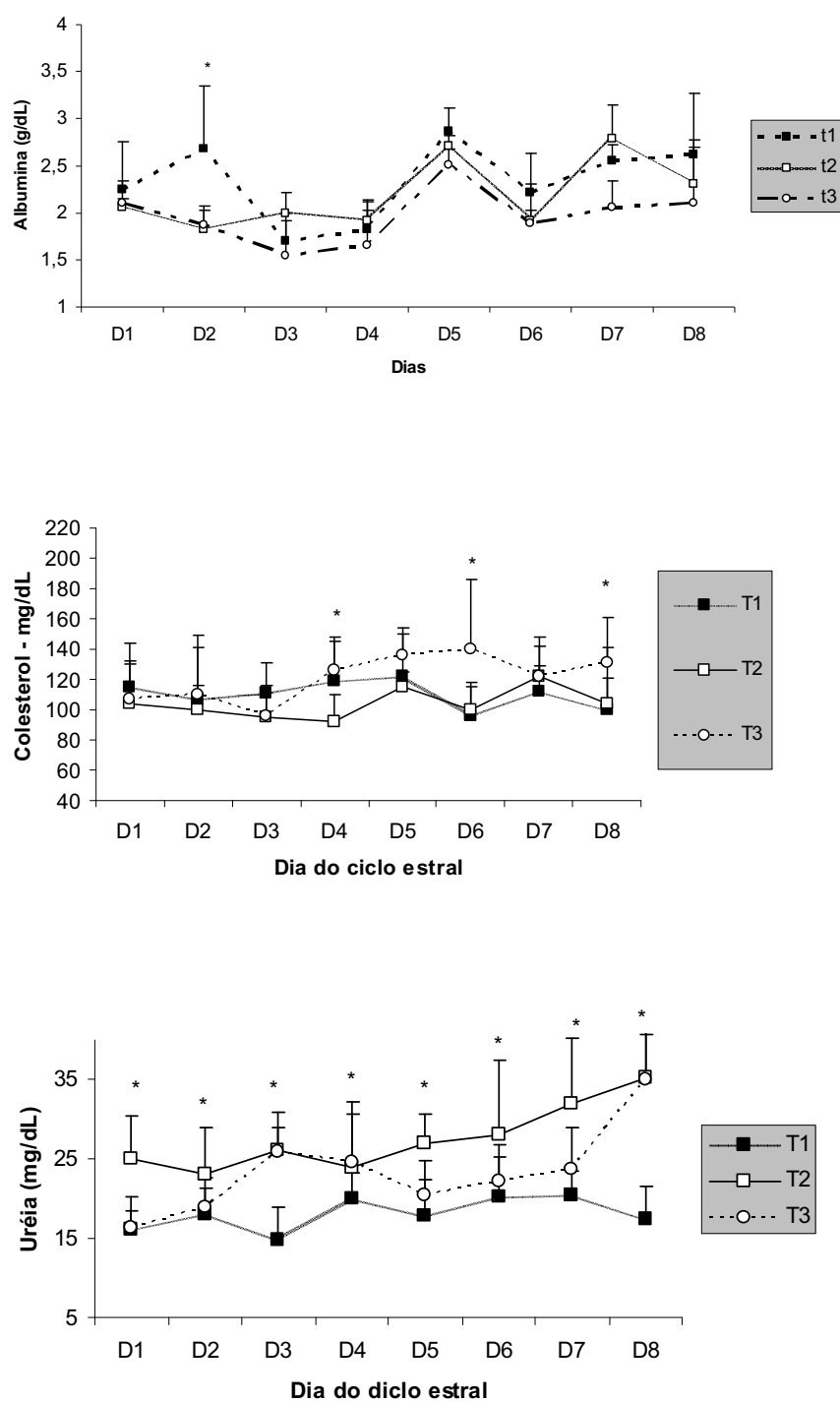


Figura 5 - Concentração plasmática de albumina(g/dL), colesterol (mg/dL), uréia (mg/dL) em função do dia do ciclo estral e dos tratamentos.

5.1.4. Desenvolvimento folicular

Em relação ao número de folículos menores que 4 mm, avaliados por ultrasonografia, foi encontrado um aumento ($P<0,03$) no número de folículos nos tratamentos T2, T3 em relação ao T1, a partir do dia 1 até o dia 2 do ciclo estral (Fig. 6). Foi encontrado um efeito ($P<0,05$) do dia do ciclo no número de folículos pequenos encontrados, e partir do dia 3 esse efeito não foi notado entre os tratamentos ($P>0,05$). O número de folículos médios, com diâmetro entre 5 e 8 mm, e grandes, com diâmetro superior a 8 mm, encontrados variou apenas com o dia do ciclo, mas não sofreu influência dos tratamentos ($P>0,05$) (Fig. 7).

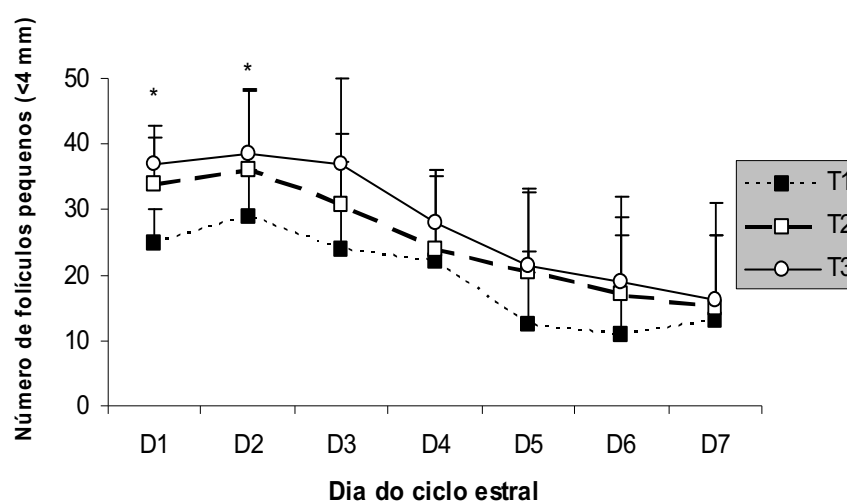


Figura 6 - Número de folículos pequenos (<4mm), em função do dia do ciclo estral e do tratamento.

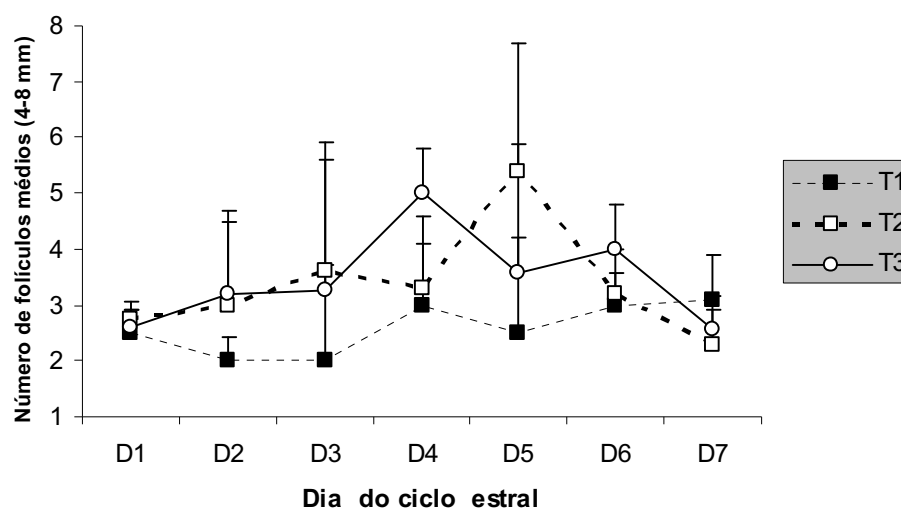


Figura 7 - Número de folículos médios (4- 8 mm), em função do dia do ciclo estral e do tratamento.

5.1.5. Diâmetro folicular e do corpo lúteo

O diâmetro do folículo pré-ovulatório no T2 foi de 1,43 cm, não diferindo dos grupos T1 e T3 (Fig. 8). O tamanho do folículo dominante aspirado no dia 8 do ciclo também não sofreu efeito do tratamento ($P>0,05$) (Fig. 9).

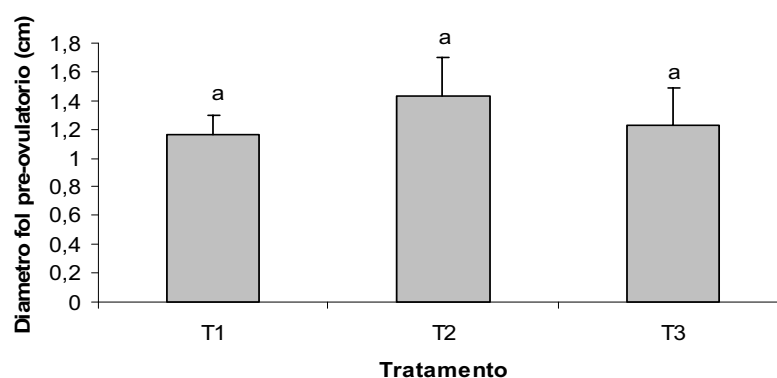


Figura 8 - Diâmetro máximo (cm) do folículo pré-ovulatório após a retirada dos implantes de P4 em função dos tratamentos.

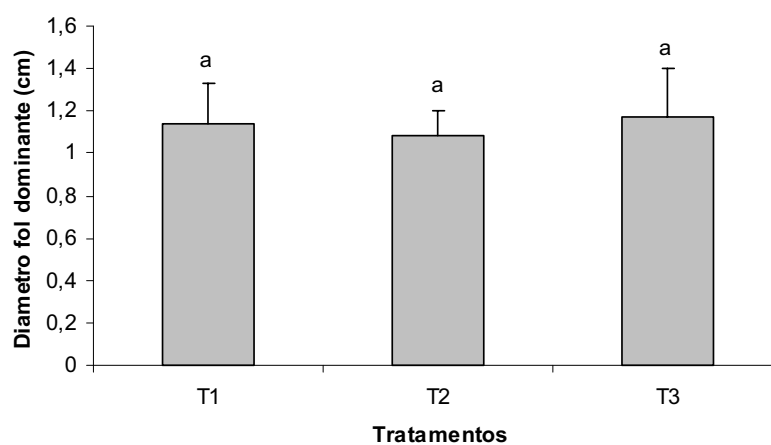


Figura 9-Diâmetro máximo (cm) do folículo dominante no D8 do ciclo estral em função dos tratamentos.

O diâmetro do corpo lúteo no dia 8 do ciclo apresentou o mesmo comportamento em relação aos folículos dominantes aspirados no d8, portanto sem efeito dos tratamentos ($P>0,05$) (Fig.10), mas com valores numericamente superiores no T3.

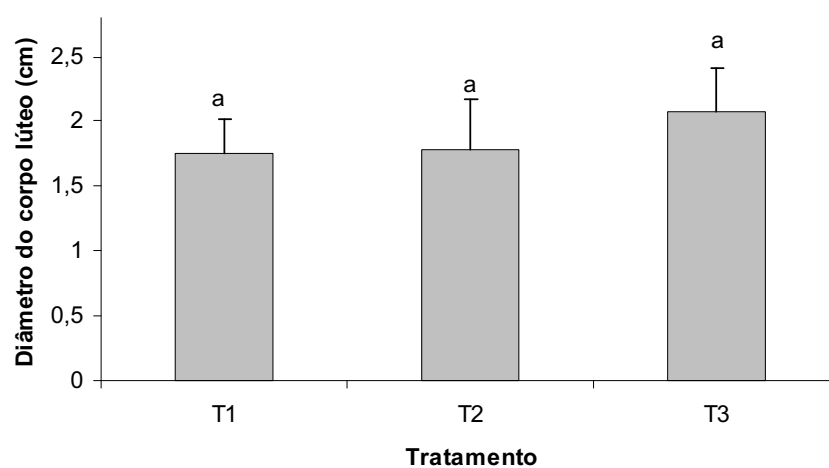


Figura 10- Diâmetro máximo (cm) do corpo lúteo no D8 do ciclo estral em função dos tratamentos.

5.1.6. Aspiração folicular, recuperação oocitária e produção *in vitro* de embriões

Foram realizadas quarenta sessões de aspiração folicular, em dois momentos distintos, totalizando ao final 393 oócitos, ou seja, em média 9,83 oócitos por novilha por sessão de aspiração. O total de oócitos maturados foi de 360, resultando em 111 embriões desenvolvidos em estágio de mórula ou blastocisto no sétimo dia após a maturação oocitária, totalizando 3,24 embriões por sessão de aspiração. Não foi encontrado efeito dos tratamentos sobre a quantidade de oócitos desnudos e atrésicos, tampouco sobre a quantidade de embriões no dia 7 de desenvolvimento folicular. Entretanto a percentagem de desenvolvimento embrionário foi afetada pelos tratamentos, sendo encontrado maiores valores no T1 e T2, e menor no T3 (Tab 5).

Na tabela 5, estão demonstrados os efeitos dos tratamentos sobre a média de oócitos por sessão de aspiração, qualidade dos oócitos, quantidade de embriões por animal e porcentagem de desenvolvimento de blastocistos.

Tabela 5 - Folículos aspirados, oócitos recuperados e embriões produzidos *in vitro* por novilha, por sessão de aspiração (Média $\pm$ DP).

	T1 (MANT)	T2 (1,7XM)	T3 (MEGA)
Folículos aspirados	17,3 $\pm$ 12,1 ^b	23,0 $\pm$ 7,3 ^a	26,3 $\pm$ 8,5 ^a
Oócitos recuperados	7,5 $\pm$ 3,2 ^b	10,2 $\pm$ 6,4 ^{ab}	11,8 $\pm$ 7,3 ^a
Desnudos e atrésicos	2,0 $\pm$ 1,2 ^a	2,1 $\pm$ 0,9 ^a	3,2 $\pm$ 1,5 ^a
Blastocistos no D7	2,7 $\pm$ 3,7 ^a	3,9 $\pm$ 4,4 ^a	3,2 $\pm$ 2,3 ^a
% Blastocisto	35,4 ^a	38,2 ^a	26,6 ^b

Médias, nas linhas seguidas de letras distintas são diferentes (P<0,05) pelo teste SNK.

* Médias, na linha, seguidas de letras distintas são diferentes (P<0,05) pelo teste χ^2 .

5.2. Experimento 2: Efeito da suplementação energética e com diferentes fontes de gordura sobre o desenvolvimento folicular e produção de oócitos e embriões de novilhas Nelore

5.2.1. Consumo de alimentos e ganho de peso

O consumo de matéria seca foi menor no grupo T1 ($P < 0,05$), em relação aos grupos T2, T3 e T4, que não diferiram entre si. Ao início do experimento, não houve diferença no peso das novilhas dos diferentes grupos ($338,0 \pm 17,4$). Os animais do grupo T1 ganharam menos peso no período ($5,1 \pm 4,3$ kg) que os animais dos grupos T2, T3 e T4 ($P < 0,05$), não havendo efeito do período experimental no ganho de peso dos animais ($P > 0,05$) (Tab 6).

Tabela 6 - Peso inicial (kg), ganho médio diário (kg/animal/dia), ganho de peso no período (kg) e consumo de alimento (kg/MS/animal/dia) durante os períodos experimentais em função dos tratamentos- exp 2.

	N	Peso Inicial (kg)	ECC inicial	GMD (kg/animal/dia)	Ganho de peso no período (kg)	Consumo de alimento (MS)
T1(MANT)	9	$341,4 \pm 34,1^a$	4,4	$0,1 \pm 0,1^b$	$5,1 \pm 4,3^b$	$5,3 \pm 0,5^b$
T2 (1,7XM)	9	$331,7 \pm 36,2^a$	4,2	$1,0 \pm 0,4^a$	$35,7 \pm 15,7^a$	$8,2 \pm 0,7^a$
T3 (SOJA)	9	$339,8 \pm 47,2^a$	4,2	$0,9 \pm 0,5^a$	$32,3 \pm 16,8^a$	$7,6 \pm 0,8^a$
T4(MEGA)	9	$341,6 \pm 31,2^a$	4,5	$0,9 \pm 0,6^a$	$31,2 \pm 20,5^a$	$7,7 \pm 1,1^a$

Médias, na coluna, seguidas de letras diferentes são diferentes ($P < 0,05$) pelo teste SNK.

O consumo de alimento, como esperado, foi menor no grupo Manutenção (T1) ($P < 0,05$), quando comparado com os tratamentos T2, T3 e T4, que não diferiram entre si. O consumo acompanhou o fornecimento de alimentos aos grupos experimentais, a fim de ajustar a quantidade de nutrientes previamente calculada.

O ganho de peso médio diário dos animais diferiu entre os grupos experimentais, sendo menor no grupo T1, com valor de $0,1 \pm 0,1$ kg/animal/dia, em relação aos grupos T2, T3 e T4, com valores de $1,0 \pm 0,4$; $0,9 \pm 0,5$ e $0,9 \pm 0,6$ kg, respectivamente ($P < 0,01$) (Fig. 11).

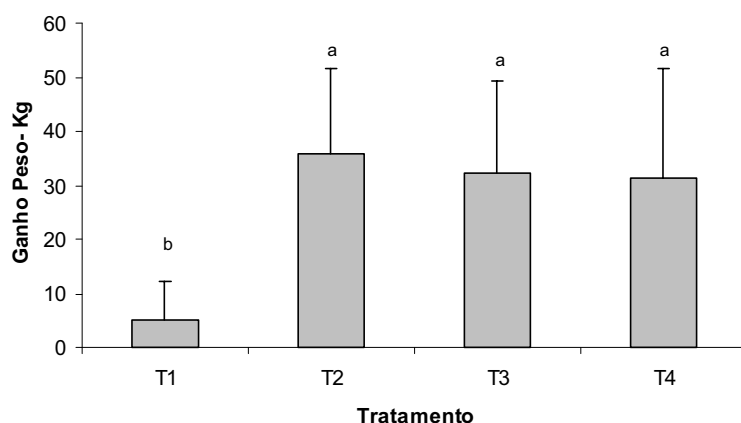


Figura 11 - Ganho de peso total no período (kg) de acordo com os tratamentos.

5.2.2. Metabólitos sanguíneos, FSH e P4

Não houve diferença nas concentrações plasmáticas de albumina entre os grupos estudados ($P > 0,05$) (Tab. 7). Os valores diários também não mostraram diferenças entre os tratamentos (Fig. 12).

As concentrações médias de colesterol foram maiores nos grupos T3 e T4 ($P < 0,05$), em relação aos grupos T1, com valor intermediário no T2, que não diferiram entre si. Não havendo diferença nas concentrações diárias deste metabólito.

Assim como a albumina, a concentração total de glicose, não variou entre as diferentes dietas fornecidas. Para a glicose, o menor valor médio encontrado de $70,2 \pm 34,9$ para o grupo T3, e o maior valor de $78,6 \pm 33,3$ para o grupo suplementado com 1,7 X M mais gordura protegida (T4), no entanto sem diferença estatística ($P > 0,05$) (Fig 14).

Tabela 7 - Concentração plasmática dos metabólitos sanguíneos totais (albumina, colesterol, glicose e uréia), em mg/dL, e hormônios (FSH e P4) em ng/mL em função dos tratamentos.

	T1	T2	T3	T4
Albumina (mg/dL)	2,2 ± 0,9 ^a	2,4 ± 1,0 ^a	2,9 ± 1,0 ^a	3,1 ± 1,0 ^a
Colesterol (mg/dL)	106,2 ± 30,3 ^b	111,2 ± 32,0 ^{ab}	124,7 ± 30,3 ^a	123,3 ± 30,7 ^a
Glicose (mg/dL)	76,2 ± 28,9 ^a	73,6 ± 40,2 ^a	70,2 ± 34,9 ^a	78,6 ± 33,3 ^a
Uréia (mg/dL)	20,5 ± 6,7 ^b	23,5 ± 7,8 ^a	22,2 ± 8,5 ^{ab}	23,8 ± 6,4 ^a
FSH (ng/mL)	0,7 ± 0,2 ^a	0,6 ± 0,1 ^a	0,7 ± 0,1 ^a	0,7 ± 0,2 ^a
P4 (ng/ml)	2,37 ± 2,05 ^a	1,06 ± 0,86 ^b	2,48 ± 2,24 ^a	2,04 ± 1,58 ^a

Médias, na linha, seguidas de letras distintas são diferentes ($P < 0,05$) pelo teste SNK.

As concentrações plasmáticas de FSH não variaram entre os tratamentos ($P > 0,05$). Já as concentrações totais de P4 foram menores no T2, com maiores valores para T1, T3 e T4 (Tab 7). Os valores diários de P4 diferiram apenas no D7, com maiores valores para o grupo T3, intermediário no T1 e T4, e menor valor no T2 (Fig 13).

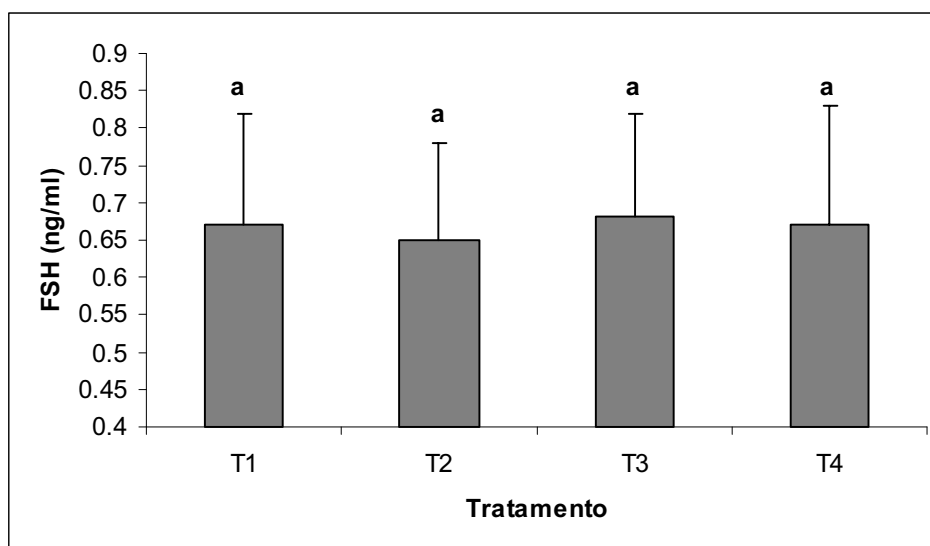


Figura 12 - Concentração plasmática de FSH (ng/mL) em função dos tratamentos.

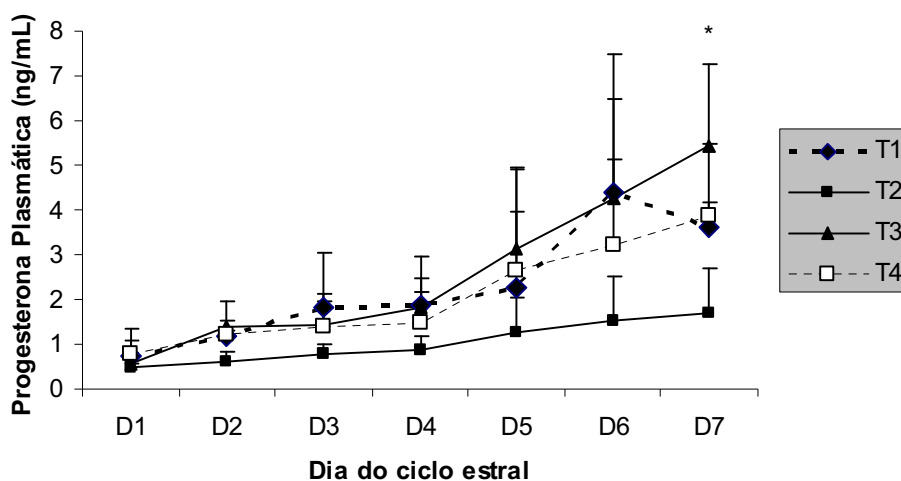


Figura 13 - Concentração plasmática de progesterona (P4, ng/mL), durante o ciclo estral sincronizado em função dos tratamentos

Os valores de uréia plasmática variaram entre os grupos, com o menor valor encontrado no T1, valores intermediários no T3, e maiores valores nos grupos T2 e T4 ($P < 0,02$). Em relação à variação diária dos metabólitos, apenas no d8 houve uma variação nas concentrações de uréia, com maiores valores encontrados no grupo T4, em relação aos demais ($P < 0,05$) (Fig14).

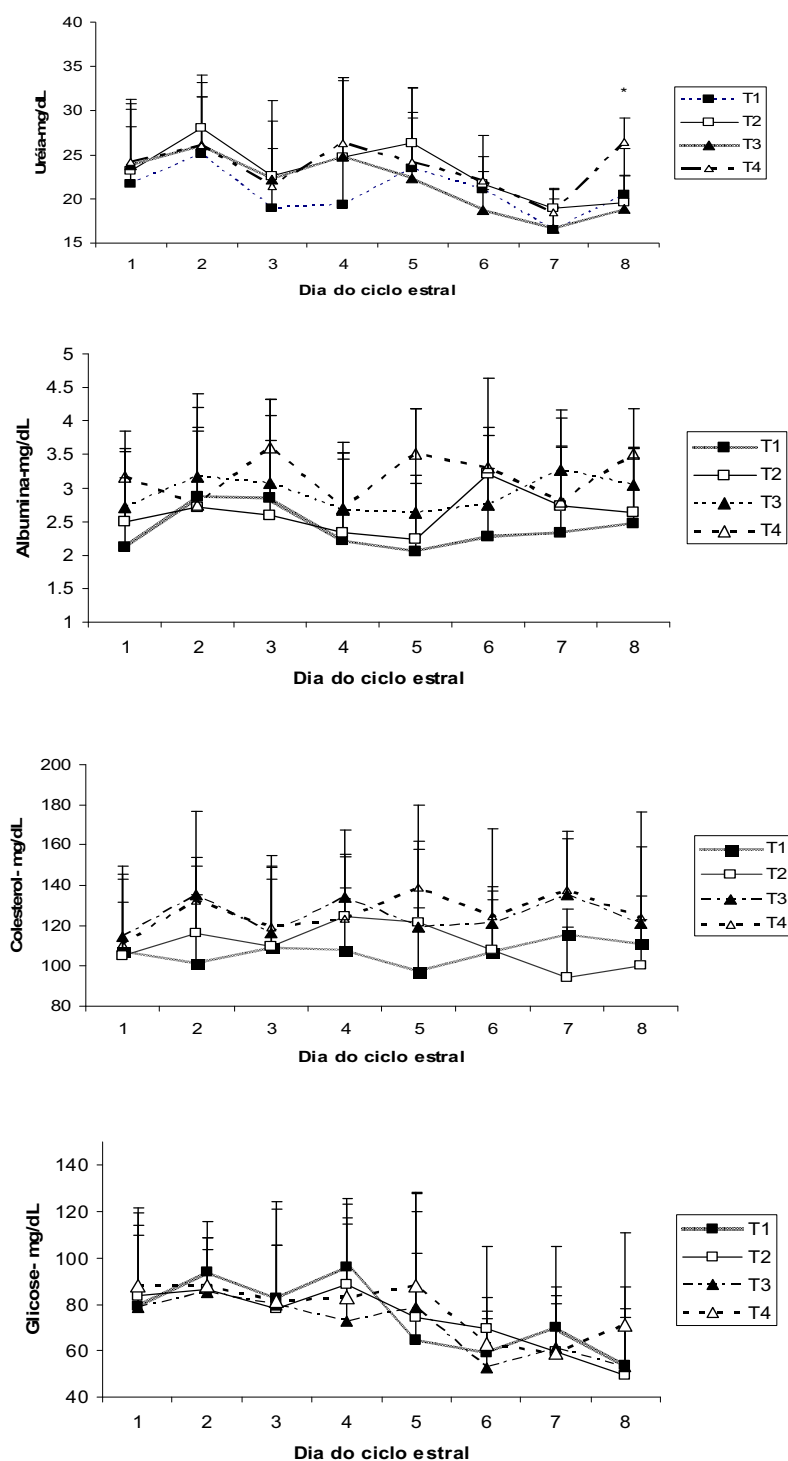


Figura 14 - Concentração plasmática diária (mg/dL) dos metabólitos albumina, colesterol, glicose e uréia em função dos tratamentos e dias do ciclo estral.

5.2.3. Desenvolvimento folicular

Em relação ao número de folículos pequenos avaliados por ultrasonografia, foi encontrado um aumento ($P<0,02$) no número de folículos nos tratamentos T2, T3, e T4, em relação ao T1, a partir do dia 1 até o dia 3 do ciclo estral. A partir do dia 4, não foi verificado efeito dos tratamentos sobre o número de folículos pequenos encontrados ($P>0,05$) (Fig 15). Existiu um efeito ($P<0,03$) do dia do ciclo no número de folículos pequenos encontrados, bem como sobre o número total de folículos pequenos, com maior valor nos tratamentos T3 e T4 (Tab 8). O número de folículos médios encontrados variou com o dia do ciclo, sendo também encontrado menores valores no T1 ($P<0,03$). Em relação aos folículos grandes (acima 8 mm) não houve diferença entre os tratamentos sobre o número total, apresentando apenas diferença entre os dias do ciclo.

Tabela 8 - Quantidade média de folículos, e diâmetro (mm) dos folículos pré-ovulatório, dominante e do corpo lúteo de acordo com os tratamentos.

	T1 (MANT)	T2 (1,7XM)	T3 (SOJA)	T4 (MEGA)
Fol Pequenos (< 4 mm)	16,7 ± 5,4 ^c	31,3 ± 11,7 ^b	37,4 ± 10,7 ^a	35,2 ± 11,3 ^{ab}
Fol médios (4-8 mm)	2,9 ± 1,4 ^b	4,1 ± 1,7 ^a	4,3 ± 2,6 ^a	3,8 ± 1,9 ^a
Fol Pré-ovulatório (mm)	12,0 ± 2,5 ^b	12,7 ± 0,1 ^b	13,2 ± 0,1 ^b	15,0 ± 1,3 ^a
Fol Dominante (mm)	11,0 ± 3,0 ^a	11,4 ± 3,1 ^a	11,9 ± 2,4 ^a	13,9 ± 2,2 ^a
Corpo lúteo (mm)	16,1 ± 1,7 ^a	16,8 ± 1,6 ^a	19,2 ± 1,2 ^a	17,4 ± 4,3 ^a

Médias, na linha, seguidas de letras distintas são diferentes ($P<0,05$) pelo teste SNK.

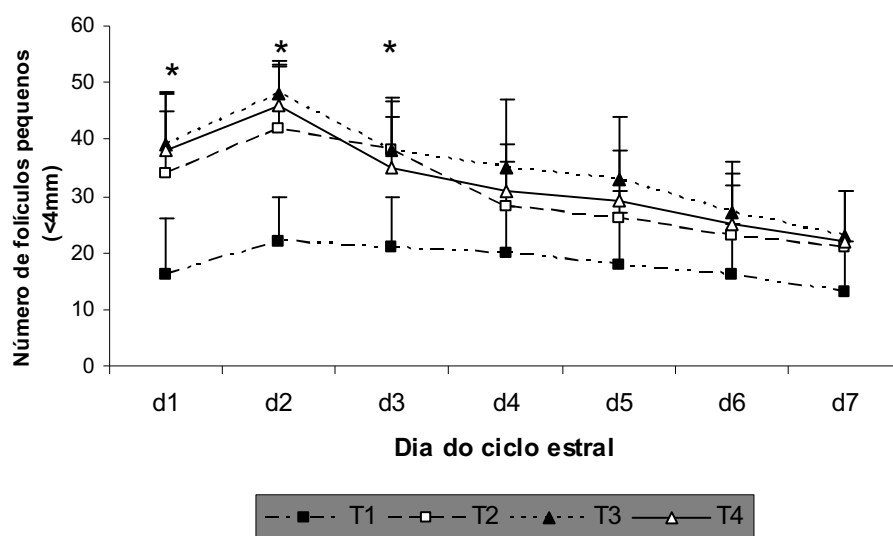


Figura 15 - Número de folículos pequenos (< 4mm) de acordo com o tratamento e dia do ciclo estral.

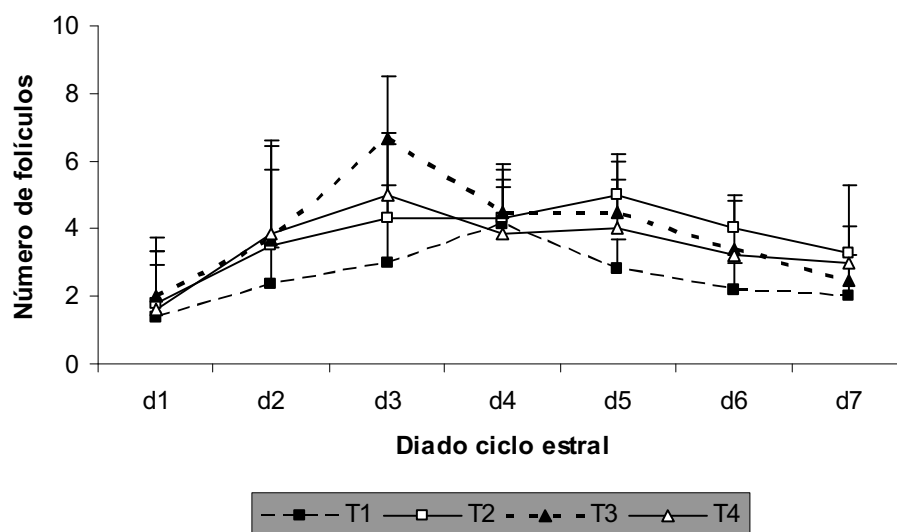


Figura 16 - Número de folículos médios (4-8 mm) de acordo com o tratamento e dia do ciclo estral.

5.2.4. Diâmetro folicular e do corpo lúteo

O tamanho do folículo pré-ovulatório, sofreu efeito dos tratamentos, com o grupo T4 apresentando o maior diâmetro, em relação aos demais grupos. O mesmo não foi encontrado com o diâmetro do folículo dominante aspirado no dia 8 do ciclo estral, que não sofreu efeito do tratamento ($P>0,05$), apresentando uma ligeira superioridade numérica dos tratamentos T3 e T4 em relação aos demais grupos. O mesmo foi observado em relação ao diâmetro do corpo lúteo no dia 8 do ciclo, que não foi diferente entre os grupos avaliados ($P>0,05$) (Figs 17, 18 e 19).

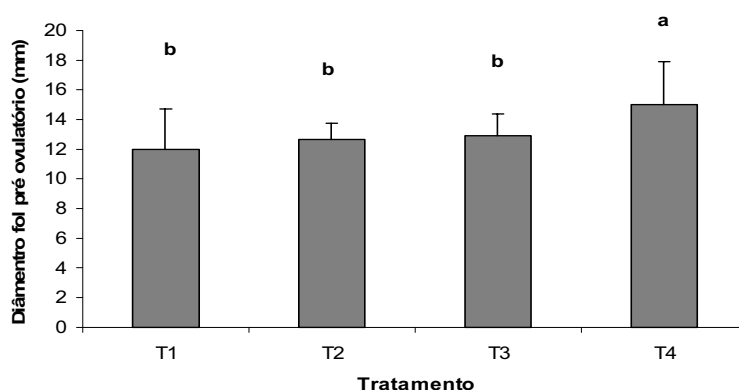


Figura 17 – Diâmetro máximo (mm) do folículo pré-ovulatório, após a retirada do implante de P4 em função dos tratamentos.

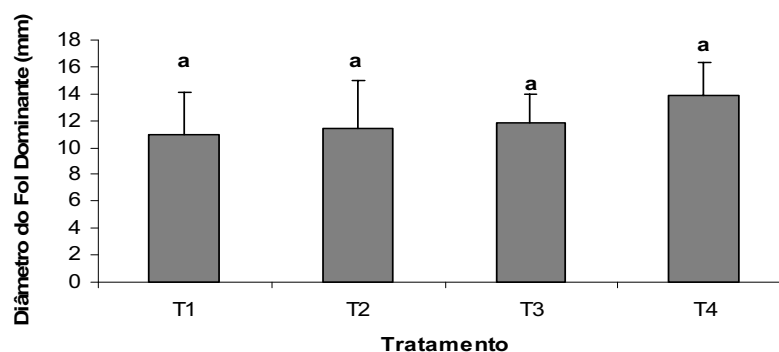


Figura 18 – Diâmetro máximo (mm) do folículo dominante no dia 7 do ciclo estral em função dos tratamentos.

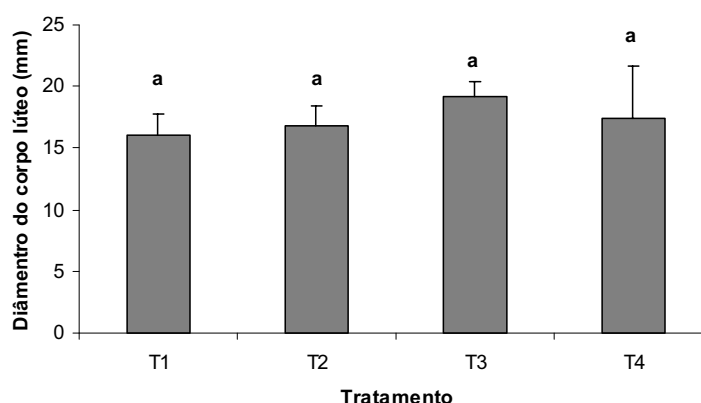


Figura 19 - Diâmetro máximo (mm) do corpo lúteo no D7 do ciclo estral em função dos tratamentos.

5.2.5. Aspiração folicular, recuperação oocitária e produção *in vitro* de embriões

Foram realizadas 33 sessões de aspiração folicular, em 3 períodos de colheita, totalizando ao final 323 oócitos, ou seja, em média 9,78 oócitos por novilha. Os dados de 3 sessões de aspiração foram perdidos. Foram conduzidos à maturação apenas os oócitos provenientes dos dois primeiros períodos de colheita (períodos 1 e 2). O total de oócitos maturados foi de 180, resultando em 67 embriões desenvolvidos em estágio de mórula ou blastocisto no sétimo dia após a maturação oocitária, totalizando 3,19 embriões por sessão de aspiração.

Na Tab 9, estão demonstrados os efeitos dos tratamentos sobre a média de oócitos por sessão de aspiração, qualidade dos oócitos, quantidade de embriões por animal e porcentagem de desenvolvimento de blastocistos.

No dia da aspiração folicular, foi encontrado efeito dos tratamentos sobre o número de folículos aspirados, e de oócitos recuperados. Foram aspirados $15,3 \pm 6,3$ folículos no T1, e um número maior no T2, T3 e T4 ($26,6 \pm 5,7$; $30,8 \pm 8,2$; $28,4 \pm 7,4$, respectivamente) ($P > 0,05$) (Tab.9).

Tabela 9 - Folículos aspirados, oócitos recuperados e embriões por novilha, por sessão de aspiração (Média± DP)- exp 2.

	T1	T2	T3	T4
Folículos aspirados (períodos 1, 2 e3)	15,3 ± 6,3 ^b	26,6 ± 5,7 ^a	30,8± 8,2 ^a	28,4± 7,4 ^a
Oócitos recuperados (períodos 1, 2 e3)	6,7 ± 2,9 ^b	12,6 ± 5,8 ^a	12,5 ± 9,5 ^a	14,6 ± 5,2 ^a
Desnudos e atrésicos (períodos 1, 2 e3)	1,3 ± 0,5 ^a	2,2 ± 1,8 ^a	2,2 ± 1,1 ^a	3,5 ± 0,7 ^a
Oócitos em MIV (períodos 1 e 2)	5,7 ± 1,8 ^b	9,1 ± 4,7 ^a	14,9 ± ,7,2 ^a	13,8 ± 6,4 ^a
Blastocistos no D7 (períodos 1 e 2)	1,8 ± 0,8 ^b	4,6 ± 2,9 ^a	5,0 ± 3,6 ^a	5,0 ±4,2 ^a
% Blastocisto (períodos 1 e 2)	31,6 ^b	50,5 ^a	33,5 ^b	36,1 ^b

Médias, nas linhas seguidas de letras distintas são diferentes (P<0,05) pelo teste SNK.

* Médias, na linha, seguidas de letras distintas são diferentes (P<0,05) pelo teste χ^2 .

Em relação à qualidade dos oócitos, não foi verificado efeito dos tratamentos sobre a quantidade de oócitos desnudo e atrésicos (P<0,05). Foi encontrada diferença sobre a quantidade de blastocistos no D7 de cultivo embrionário, com menor quantidade no T1, bem como na porcentagem de desenvolvimento embrionário, com maior valor no tratamento T2 (P>0,05).

6. DISCUSSÃO

O ganho de peso dos animais recebendo dietas de manutenção foi menor em relação aos tratamentos com aumento de energia, o que era esperado devido ao fornecimento de alimentos menor naqueles grupos. Não foi encontrada diferença dos grupos recebendo dietas com elevada energia independente da fonte (amido ou gorduras [óleo de soja ou Megalac]), concordando com os dados de THOMAS *et al.* (1997), que não encontraram diferenças no ganho de peso de vacas que receberam dietas sem adição de gordura ou adição de gordura, saturada, insaturada e altamente saturada.

Os resultados demonstraram que não existem diferenças nas concentrações de glicose de acordo com as dietas, fato este relatado por vários autores (GUTIERREZ *et al.*, 1997; RUAS *et al.* 2000). Os ruminantes utilizam AGVs como a principal fonte de energia, e alterações entre os estados de fome ou sobre alimentação são rapidamente regulados pela insulina, o que promove um nível praticamente constante nas concentrações de glicose sanguínea. Existiu uma tendência de diminuição da glicose com o decorrer dos dias de colheita sanguínea. Tais dados sugerem o efeito de estresse dos animais, sobretudo nos primeiros dias de colheita sanguínea, que podem ter elevado os valores de glicose, por trata-se de animais *Bos taurus indicus*, mais propensos ao estresse, mesmo adaptados às condições experimentais (RUAS *et al.* 2000, WEEKES, 1991).

As concentrações de uréia são indicadores de consumo protéico, e como esperado têm uma relação positiva com a dieta. Como as dietas foram ajustadas para apresentarem a mesma quantidade de proteína bruta, o aumento encontrado nos grupos com aumento de energia deveu-se provavelmente a maior quantidade de proteína verdadeira ingerida nestes grupos, já que a correção dos níveis de proteína foi realizada com adição de uréia. Os valores máximos e mínimos de uréia plasmática encontrados equivalem respectivamente a 8,06 e 12,02 mg/dL de

Nitrogênio Uréico Plasmático no experimento 1 e 9,56 mg/dL e 11,09 mg/dL no experimento 2, o que segundo vários autores (ELROD (1993), BARTON *et al.* (1996) e BUTLER *et al.* (1996)), estão em níveis adequados. Esses autores encontraram concentrações de até 21 mg/dL, e sugeriram que o nitrogênio uréico plasmático pode alterar a fertilidade, quando as concentrações ultrapassarem a 18 mg/dL, valores não encontrados neste trabalho. ARMSTRONG *et al.* (2001) demonstraram que a qualidade dos oócitos de folículos pequenos foi correlacionada negativamente com as concentrações de uréia plasmática. Também SINCLAIR *et al.* (2001) relatam que a exposição de oócitos no interior dos folículos, a altos níveis de uréia ou amônia comprometia sua capacidade de desenvolvimento a blastocistos durante o cultivo *in vitro*, o que acreditamos não ter ocorrido em nossos experimentos.

Outra forma de monitorar a ingestão de alimentos protéicos é através da avaliação plasmática de albumina, que não apresentou diferenças entre os diferentes tratamentos de energia e gordura.

GRUMMER E CARROLL (1991) revisaram diversos estudos nos quais lipídeos foram acrescentados à dieta de vacas de leite. Eles observaram que, em todos eles, as concentrações de colesterol no plasma foram consistentemente elevadas nas dietas com suplementação com gordura, em relação às dietas controle, como também observamos em nosso trabalho no Exp 2, onde as diferentes fontes de gordura (óleo de soja e AGCL) promoveram aumento do colesterol plasmático. No Exp 1 houve um aumento apenas numérico do colesterol, sem diferença estatística ao nível de 5%, no grupo suplementado com gordura.

Os dados encontrados demonstram que o aumento da energia na dieta, aumenta o número de folículos pequenos no início do ciclo estral em novilhas Nelore, apresentando maiores incrementos no número de folículos menores que 4 mm com a adição de uma fonte de gordura- óleo de soja ou AGCL. Este aumento foi verificado também em relação aos folículos médios (5-8 mm), mas não em grandes (>8 mm), que aumentaram com o decorrer do ciclo estral, enquanto o número de folículos pequenos decresceu. Tais dados indicam conforme observado por GUTIERREZ *et al.* (1997) e ARMSTRONG *et al.* (2002) em animais *Bos taurus taurus*,

que o aumento da ingestão de energia afeta o recrutamento dos folículos pequenos, mas não alteram a dominância de animais *Bos taurus indicus*, independente da fonte de gordura adicionada.

Alguns trabalhos têm demonstrado este efeito do aumento de folículos pequenos em animais *Bos taurus taurus*, como resposta a um aumento da quantidade de energia ingerida (flushing) ou da aplicação de GH (GONG et al., 1991) porém poucos dados foram demonstrados em animais *Bos taurus indicus*. Em estudo anterior, MAURASSE et al. (1985) demonstraram que a alteração no plano nutricional produziu alterações no aparecimento de folículos de vários tamanhos e um acentuado aumento dos folículos em bovinos, como parcialmente observado em nosso experimento. Em ovelhas, são bem conhecidos os efeitos do aumento de suplementação energética provocando aumento do número de folículos no ovário e melhoras na taxa de ovulação. O aumento no número de folículos menores pode refletir em uma seleção maior de estruturas disponíveis para desenvolvimento posterior. Um número maior de folículos pode indicar um processo de seleção folicular alterado e maior disponibilidade de estruturas disponíveis para aspiração folicular (OPU), o que é de interesse para a PIV de embriões, fato este confirmado pela maior produção de oócitos nos grupos suplementados com energia e gordura.

O maior número de folículos pequenos encontrados nos primeiros dias do ciclo estral, em relação a animais *Bos taurus taurus*, já havia sido reportado por SEGERSON et al. (1994), que encontraram uma maior quantidade destes folículos em vacas Brahman, em relação a vacas Angus. Em trabalho recente, ADAMIAK et al. (2005) encontraram uma média de 11,5 folículos no início do ciclo estral em ovários de novilhas *Bos taurus taurus* de corte, e recuperaram através da OPU, uma média de 5,8 oócitos por animal. Também ARMSTRONG et al. (2002) encontraram 17,1 folículos por ovário, inferior, portanto ao encontrado neste experimento. Tal fato pode ser explicado pelas evidências que os sistemas ovarianos de insulina e de fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) de animais *Bos taurus indicus* diferem dos animais *Bos taurus taurus*, como observado por BURATINI et al. (2000), onde o tratamento com somatotropina recombinante bovina

(bST) aumentou as concentrações plasmáticas de IGF-1 e o número de pequenos folículos (<5 mm). Fato similar foi observado em *Bos taurus taurus* (GONG *et al.*, 1991), porém com uma taxa de incremento do número de folículos menor que o observado em *Bos taurus indicus*, sugerindo que o sistema ovariano de IGF-1 pode diferir entre animais *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*. Também foi observado que vacas Brahman apresentam maiores concentrações plasmáticas de IGF-1 (SIMPSON *et al.*, 1994, ALVAREZ *et al.*, 2000) e menores concentrações plasmáticas de FSH que vacas Angus (ALVAREZ *et al.*, 2000), sugerindo que o maior número de folículos em vacas Brahman, mesmo com menores concentrações de FSH, possa ser devido às altas concentrações de IGF-1.

Em relação à adição de gorduras, alguns trabalhos têm demonstrado o aumento do número de folículos e do tamanho dos folículos dominantes quando da adição de gorduras altamente insaturadas ou saturadas (THOMAS *et al.*, 1997), tal como observado em nosso trabalho em relação à população de folículos pequenos e médios, que aumentaram como resultado da adição de energia e gorduras. Dietas contendo grandes quantidades de ácidos graxos de cadeia longa, como os tratamentos com Megalac, aumentam a gliconeogênese hepática, devido ao aumento na secreção de propionato no rúmen (SELNER E SCHULTZ, 1980; CHALUPA *et al.*, 1986; KEELE *et al.*, 1989). Este aumento na gliconeogênese tem sido associado com aumentos nas concentrações plasmáticas de insulina e IGF-1, que são conhecidas por influenciar a população de folículos médios (THOMAS E WILLIAMS, 1996). Também o ácido linoléico, o maior constituinte do óleo de soja é conhecido por aumentar a produção ruminal de propionato, levando ao mesmo efeito nas concentrações de Insulina e IGF-1 (CHALUPA, 1986), o que pode explicar tais aumentos na quantidade de folículos encontrados em nosso trabalho.

Conjuntamente, os nossos dados sugerem que a tendência de aumento no tamanho dos folículos dominantes e pré-ovulatórios, em novilhas Nelore tratadas com maior quantidade de energia e gordura deva-se às ações endócrinas dos hormônios e metabólitos.

As concentrações de FSH plasmático, como observado em outros estudos (ADAMS *et al.*, 1994; GONG *et al.*, 1995), variaram com o dia do ciclo, mas não foi encontrada diferença resultante dos tratamentos nutricionais. O aumento do número de folículos pequenos nos dois (exp 1) e três (exp 2) primeiros dias do ciclo estral, ocorrido nos tratamentos com aumento de energia, independente da fonte, parecem ser independentes das concentrações de FSH, bem como a maior quantidade de folículos pequenos encontrados nos tratamentos com fontes de gordura.

Como o colesterol circulante é o substrato primário para a síntese de P4 em mamíferos, a adição de gordura pode propiciar um aumento na síntese de P4, e elevar a progesterona plasmática. Este efeito é observado tanto para vacas de leite como de corte. A concentração de progesterona no fluido folicular e no tecido luteal aumentou, conforme demonstrado em alguns estudos (RYAN *et al.*, 1995; RYAN *et al.*, 1992), mas não em todos (LAMMOGLIA *et al.*, 1997) quando gordura foi adicionada à dieta. Em nossos trabalhos verificamos o aumento da P4 no tratamento com adição de gordura, que também apresentou aumento do colesterol sanguíneo. Tal aumento, entretanto não foi acompanhado pelo aumento do corpo lúteo, sugerindo, a alteração do clearance de P4 pela adição de fonte de gordura na dieta.

Em relação aos efeitos da suplementação sobre a qualidade oocitária e na produção de embriões, os dados da literatura são controversos, enquanto boa parte dos trabalhos indica que o aumento da quantidade de energia nas dietas para vacas e novilhas de corte e leite tem um efeito deletério sobre a competência oocitária e qualidade embrionária (ARMSTRONG *et al.*, 2001, MCCAFFERY *et al.*, 2000, NOLAN *et al.*, 1998, FRERET *et al.*, 2006), outros têm demonstrado efeitos benéficos da suplementação energética e com gorduras (FOULADI-NASHTA *et al.* (2007). Entretanto, a maioria dos trabalhos desconsidera os efeitos da condição corporal inicial dos animais, ou o sobre condicionamento dos mesmos sobre a resposta de produção e qualidade de oócitos e embriões. Nesse sentido ADAMIAK *et al.* (2005) relatam que aumento do fornecimento de energia foi benéfico para a

qualidade oocitária apenas nos animais com moderado ECC, e deletério para os animais com elevado ECC. Em nosso trabalho, o ECC das novilhas foi moderado (4,2, em escala de 1-9) ao início dos tratamentos, o que não interferiu negativamente na qualidade oocitária e produção *in vitro* dos embriões. Nos dois experimentos, os animais que receberam dietas com aumento de energia, tiveram tendência de melhores taxas de desenvolvimento embrionário *in vitro*, quando comparados aos tratamentos controle (exp 2) e com adição de gorduras (exp 1 e 2), mostrando o efeito benéfico do flushing por curto período de tempo em novilhas *Bos taurus indicus* com moderado ECC no início da suplementação.

O sistema ovariano do IGF-1 pode ser influenciado pela dieta, e tem o potencial de interagir diretamente com o oócito através do receptor Tipo I (ARMSTRONG *et al.*, 2001, 2002). Os folículos pequenos de novilhas alimentadas com grandes quantidades de energia tem menores níveis de mRNA para IGFBP-2 e 4 (ARMSTRONG *et al.*, 2001), o que regula a biodisponibilidade de IGF. Provavelmente este é o fator crítico que controla a capacidade de desenvolvimento do oócito (ARMSTRONG *et al.*, 2002).

A adição de gorduras de diferentes fontes nos dois experimentos, não apresentou efeitos benéficos na qualidade oocitária, tampouco na produção de embriões *in vitro*, apresentando menores valores de desenvolvimento embrionário *in vitro*, em relação aos tratamentos com aumento de energia. Tais dados estão em desacordo com alguns autores (SANTOS *et al.*, 2007; FOULADI-NASHTA *et al.* 2007) que indicam que a suplementação com gorduras insaturadas ou Megalac promove melhora na qualidade e produção embrionária em vacas de leite. Entretanto ADAMIAK *et al.* (2006) trabalhando com novilhas cruzadas indicaram que a adição de Megalac piorou o desenvolvimento embrionário *in vitro* de embriões em novilhas com baixo ECC, sem apresentar, entretanto alterações nas quantidades de Ac. Graxos nos oócitos.

6.CONCLUSÕES

As dietas avaliadas com aumento de energia e gordura elevam o número de folículos pequenos disponíveis ao início da onda folicular, bem como a quantidade total de folículos pequenos e médios, e o número de oócitos aspirados, sem alteração nas concentrações de gonadotrofinas (FSH e LH).

A adição de energia por curto período de tempo para novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*) com moderado ECC melhorou o desenvolvimento embrionário *in vitro*.

A adição de gordura alterou as concentrações de colesterol plasmático, e Progesterona, sem ação no tamanho do corpo lúteo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMIAK, S.J. MACKIE, K., WATT, R.G., WEBB, R. , SINCLAIR, K.D. Impact of nutrition on oocyte quality: cumulative effects of body composition and diet leading to hiperinsulinemia in cattle. **Biol. Reprod.** v.73, p.918-26, 2005.

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

ADAMS GP, EVANS AC, RAWLINGS N.C. Follicular waves and circulating gonadotrophins in 8-month-old prepubertal heifers. **J. Reprod. Fertil.** v.100, p.27-33, 1994.

ALVAREZ, P., SPICER, L.J., CHASE JR., C.C., PAYTON, M.E., HAMILTON, T.D., STEWART, R.E., HAMMOND, A.C., OLSON, T.A., WETTEMAN, R.P. Ovarian and endocrine characteristics during the estrous cycle in Angus, Brahman and Senepol cows in a subtropical environment. **J. Anim. Sci.** v.78, p.1291–1302, 2000.

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

ARMSTRONG D.G., MCEVOY T.G., BAXTER G., ROBINSON J.J., HOGG C.O., WOAD K.J., WEBB R. Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production *in vitro*: associations with the ovarian insulin-like growth factor system. **Biol. Reprod.** v. 64, p.1624–1632, 2001.

BARROS, C.M., NOGUEIRA, M.F.G. Embryo transfer in *Bos taurus indicus* cattle. **Theriogenology**. v.56, p.1483–1496, 2001.

BARTON, B.A., ROSARIO, H.A., ANDERSON, G.W. et al. Effect of dietary crude protein, breed, parity, and health status on the fertility of dairy cows. **J. Dairy Sci.** v.79(12), p.2225-2236, 1996.

BASSETT, J.M., WESTON, R.H., HOGAN, J.P. Dietary regulation of plasma insulin and growth hormone concentration in sheep. **Aust. J. Biol. Sci.** v.24, p.321–330, 1971.

BASTOS, M.R.; MARTINS, A.C.; MELO, L.F.; CARRIJO, L.H.D.; RUMPF, R.; SARTORI, R. Efeito da condição corporal e da ingestão alimentar sobre a resposta superovulatória e produção embrionária em novilhas Nelore. Abstract. **Acta Scientiae Veterinariae** v.35(Supl. 3) b, 2007.

BASTOS, M.R.; RAMOS, A.F.; DRIESSEN, K.; MARTINS, A.C.; RUMPF, R.; SARTORI, R. Efeito do Flushing Nutricional sobre a resposta superovulatória em vacas mestiças. Abstract. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.35(Supl. 3) a, 2007.

BAVISTER BD. A consistently successful procedure for in vitro fertilization of golden hamster eggs. **Gamete Res.** v.23(2), p.139-58, 1989.

BEAM SW, BUTLER WR. Energy balance effects on follicular development and first ovulation in postpartum cows. **J Reprod Fertil Suppl.** v.54, p.411–424, 1999.

BEAM, S.W. E W.R. BUTLER. Energy balance, metabolic hormones, and early postpartum follicular development in dairy cows fed prilled lipid. **J. Dairy Sci.** v.81, p.121-131, 1998.

BEAM, S.W., BUTLER, W.R. Energy balance and ovarian follicle development prior to the first ovulation post-partum in dairy cows receiving three levels of dietary fat. **Biol. Reprod.** 56, 133–142, 1997.

BLOWEY, R.W.; WOOD, D.W.; DAVIS, J.R. A nutritional monitoring system for dairy herds based on the blood glucose, urea and albumin levels. **Vet. Rec.** v.92, p. 691-696, 1973.

BO, G.A, BARUSELLI, P.S., MARTÍNEZ , M.F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos taurus indicus* cattle. **Anim. Reprod. Sci.** v.78, p.307–326, 2003.

BO, G.A., ADAMS, G.P., NASSER, L.F., PIERSON, R.A., MAPLETOFT, R.J. Effect of estradiol valerate on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating gonadotropins in heifers. **Theriogenology.** v.40, p.225–239, 1993.

BO, G.A., MARTYNEZ, M., NASSER, L.F., CACCIA, M., TRIBULO, H., MAPLETOFT, R.J., 1993b. Follicular dynamics in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* beef cattle under pasture conditions in Argentina. In: **Proceedings** of the 10th Congresso Brasileiro de Reproducao Animal, vol. 2. Campo Grande, p. 221 (abstract).

BOLAND MP, LONERGAN P, O'CALLAGHAN D. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. **Theriogenology.** v.55, p.1323–1240, 2001.

BOLT, D.J.; SCOTT, V.; KIRACOFÉ, G.H. Plasma LH e FSH after estradiol, norgestomet and GnRH treatment in ovariectomized beef heifers. **Ani. Reprod. Sci.** v. 23, p. 263-271, 1990.

BRACKET B, ZUELKE K. Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos. **Theriogenology.** v.39, p.43–64, 1993.

BRITT, J.H., D.W. SHAW, S.P. WASHBURN E V.S. HEDGPETH. 1996. Endogenous progesterone during luteal phase before insemination influences embryo recovery in lactating dairy cows. **J. Anim. Sci.** v.74(1), p.225, 1996.

BURATINI J JR, PRICE CA, VISINTIN JA, BO GA. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (BST) on ovarian follicular development in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Theriogenology**. v.54(3), p.421-431, 2000.

BUTLER, W.R., CALAMAN, J.J., BEAM, S.W. Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in lactating dairy cattle. **J. Anim. Sci.** v.74(4), p.858-865, 1996.

CARROLL, D.J.; BARTON, B.A.; ANDERSON, G.W.; SMITH, R.D. Influence of protein intake and feeding strategy on reproductive performance of dairy cows. **J. Dairy Sci.** v.71, p.3470-348, 1988.

CHALUPA, W., B. VECCHIARELLI, A. ELSER, D. S. KRONFELD, D. SKLAN, AND D. L. PALMQUIST. Ruminal fermentation in vivo as influenced by long-chain fatty acids. **J. Dairy Sci.** v.69, p.1293-1301, 1986.

DODE, M.A.N., RODOVALHO, N.C., UENO, V.G., ALVES, R.G.O. 2000. Efeito do tamanho do folículo na maturação nuclear e citoplasmática de fêmeas zebuínas. **Pesq. Agropec. Bras.** v.35, p.207-214, 2000.

DRIANCOURT MA. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals: implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**. v.55, p.1211–1239, 2001.

ELROD, C.C., BUTLER, W.R. Reduction of fertility and alteration of uterine pH in heifers fed excess ruminally degradable protein. **J. Anim. Sci.** v.71(3), p.694-701, 1993.

FARIN PW, CROSIER AE, FARIN CE. Influence of in vitro systems on embryo survival and fetal development in cattle. **Theriogenology.** v.55, p.151–170, 2001.

FARNINGHAM, D.A.H., WHYTE, C.C. The role of propionate and acetate in the control of food intake in sheep. **Br. J. Nutr.** v.70, p.37–46, 1993.

FIGUEIREDO, R.A., BARROS, C.M., PINHEIRO, O.L., SOLER, J.M.P. Ovarian follicular dynamics in Nelore Breed (*Bos taurus indicus*). **Theriogenology.** v.47, p.1489–1505, 1997.

FOULADI-NASHTA, A.A., GUTIERREZ, C.G., RUSSELL, H.F., GARNSWORTHY, P.C., WEBB, R. Effects of dietary fatty acids on oocyte quality and development in lactating dairy cows. **Biol. Reprod.** v. 7, p.9–17, 2007.

FRERET, S., GRIMARD, B., PONTER, A.A. Reduction of body-weight gain enhances *in vitro* embryo production in overfed superovulated dairy heifers. **Reproduction.** v.131, p.783-794, 2006.

FUNSTON, R.N. Fat supplementation and reproduction in beef females. **J. Anim. Sci.** v.83, p.154-161, 2004

GARCIA-BOJALIL, C.M., C.R. STAPLES, C.A. RISCO, J.D. SAVIO E W.W. THATCHER. Protein degradability and calcium salts of long chain fatty acids in the

diets of lactating dairy cows: Reproductive responses. **J. Dairy Sci.** v.81, p.1384-1395, 1998.

GINTHER, O.J., KASTELIC, J.P., KNOPF, L. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine oestrous cycle. **Anim. Reprod. Sci.** v.20, p.187–200, 1989.

GLISTER C, TANNETTA DS, GROOME NP AND KNIGHT P. Interactions between follicle-stimulating hormone and growth factors in modulating secretion of steroids and inhibin-related peptides by nonluteinized bovine granulosa cells **Biol. Reprod.** v.65, p.1020–1028, 2001.

GONG JG, BRAMLEY TA, GUTIERREZ CG, PETERS AR, WEBB R. Effects of chronic treatment with a gonadotrophin-releasing hormone agonist on peripheral concentrations of FSH and LH, and ovarian function in heifers. **J. Reprod. Fertil.** v.105(2), p.263-70, 1995.

GONG, J.G., BRAMLEY, T.A., WEBB, R. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: follicular populations and peripheral hormones. **Biol. Reprod.** v.45, p.941–949, 1991.

GRUMMER, R.R. E D.J. CARROLL. A review of lipoprotein cholesterol metabolism: Importance to ovarian function. **J. Anim. Sci.** v.66, p.3160-3173, 1988.

GRUMMER, R.R. E D.J. CARROLL. Effects of dietary fat on metabolic disorders and reproductive performance of dairy cattle. **J. Anim. Sci.** v.69, p.3838-3852, 1991.

GUTIERREZ C.G., OLDHAM J., BRAMLEY T.A., GONG J.G., CAMPBELL B.K.,WEBB R. The recruitment of ovarian follicles is enhanced by increased dietary intake in heifers. **J. Anim. Sci.** v.75, p.1876–84, 1997.

HAWKINS, D.E., K.D. NISWENDER, G.M. OSS, C.L. MOELLER, K.G. ODDE, H.R. SAWYER E G.D. NISWENDER. An increase in serum lipids increases 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., STEENWEG W.N.M., HARKEMA J.C., MERTON J.S., BEVERS M.M., VOS P.L.A.M., DIELEMAN S.J. Effect of different stages of the follicular wave on in vitro developmental competence of bovine oocytes. **Theriogenology**. v.61, p.909-920, 2004.

HINCKLEY, T. CLARK, R.M., BUSHMICH,S.L., MILVAE, R.R. 1996. Long chain polyunsaturated fatty acids and bovine luteal cell function. **Biol. Reprod.** v.55, p.445-449, 1996.

HOLTORF A.P., FURUYA K., IVELL R. AND MCANDLE C.A. Oxytocin production and oxytocin messenger ribonucleic acid levels in bovine granulosa cells are regulated by insulin and insulin-like growth factor-I: dependence on developmental status of the ovarian follicle **Endocrinology**. v.125, p.2612–2620, 1989.

HOMA, S.T., BROWN, C.A. Changes in linoleic acid during follicular development and inhibition of spontaneous breakdown of germinal vesicles in cumulus-free bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.94, p.153-160, 1992.

KAPPEL, L.C.; INGRAHAM, R.H., MORGAM, E.B. *et al.* Relationship between fertility and blood glucose and cholesterol concentrations in Holstein cows. **Am. J. Vet. Res.** v.45, p.2607-2612, 1984.

KASTELIC, J.P., BERGFELT, D.R., GINTHER, O.J. Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. **Theriogenology**. v.33, p.1269–1278, 1990.

KEELE, J. W., R. E. ROFFLER, AND K. Z. BEYERS. Ruminant metabolism in nonlactating cows fed whole cottonseed or extruded soybeans. **J. Anim. Sci.** v.67, p.1612-1619, 1989.

KNOPF L, KASTELIC JP, SCHALLENBERGER E, GINTHER OJ. Ovarian follicular dynamics in heifers: test of two-wave hypothesis by ultrasonically monitoring individual follicles. **Domest Anim Endocrinol.** v.6(2), p.111-119, 1989.

LAMMOGLIA, M.A., S.T. WILLIARD, D.M. HALLFORD E R.D. RANDEL. Effects of dietary fat on follicular development and circulating concentrations of lipids, insulin, progesterone, estradiol-17 β , 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F2 α and growth hormone in estrous cyclic Brahman cows. **J. Anim. Sci.** v.75, p.1591-1600, 1997.

LANDAU, S., HOUGHTON, J.A.S., MAWHINNEY, J.R., INSKEEP, E.K. Protein sources affect follicular dynamics in ewes near the onset of the breeding season. **Reprod. Fertil. Dev.** v.8, p.1021–1028, 1996.

LOZANO, J.M., LONERGAN, P., BOLAND, M.P., O'CALLAGHAN, D. Influence of nutrition on the effectiveness of superovulation programmes in ewes: effects on

oocyte quality and post-fertilization development. **Reproduction**. v.125, p.543-53, 2003.

LUCY, M.C., R.C. STAPLES, F.M. MICHEL E W.W. THATCHER. Effect of feeding calcium soaps to early postpartum dairy cows on plasma prostaglandin $F_{2\alpha}$, luteinizing hormone, and follicular growth. **J. Dairy Sci**. v.74, p.483-492, 1991.

M'CEVOY, T.G., ROBINSON, J.J., AITKEN, R.P., FINDLAY, P.A., PALMER, R.M., ROBERTSON, I.R. Dietary induced suppression of pre-ovulatory progesterone concentrations in superovulated ewes impairs the subsequent *in vivo* and *in vitro* development of their ova. **Anim. Reprod. Sci**. v.39, p.89-107, 1995.

MACHATKOVA M., KRAUSOVA K., JOKESOVA E., TOMANEK M. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on *in vitro* Embryo production. **Theriogenology**. v.61, p.329-35, 2004.

MAMLUK, R., GREBER, Y., MEIDAN, R., Hormonal regulation of and cytochrome P450 side-chain cleavage in bovine luteal cells. **Biol. Reprod**. v.60, p.628–634, 1999.

MANN, G.E., GREEN , M.P., SINCLAIR, K.D. , DEMMERS, K.J., FRAY, M.D. , GUTIERREZ, C.G., GARNSWORTHY, P.C. , WEBB, R. Effects of circulating progesterone and insulin on early embryo development in beef heifers **Ani. Reprod. Sci**. v.79, p. 71–79, 2003.

MAURASSE, C, MARTON P, DUFOUR JJ. Ovarian follicular populations at two stages of an oestrus cycle in heifers given high energy diets. **J Anim Sci**. v.61, p.1194–200, 1985.

MCCAFFERY, F.H., LEASK, R., RILEY, S.C., TELFER, E.E. Culture of bovine preantral follicles in a serum-free system: markers for assessment of growth and development. **Biol. Reprod.** v.63, p.267-73, 200.

NATIONAL Research Council. **Nutrients Requirements of Beef Cattle**. Seventh Rev. Ed. Washington, D.C.: National Academic Press, 1997.

NOLAN, R., O'CALLAGHAN, D., DUBY, R.T., LONERGAN, P., BOLAND, M.P. The influence of short-term nutrient changes on follicle growth and embryo production following superovulation in beef heifers. **Theriogenology**. v.50, p.1263-1274, 1998.

PAVLOK A., LUCAS-HAHN A, NIEMANN H. 1992. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. **Mol Reprod Dev**. v.31, p.63–67,1992.

RHODES FM, ENTWISTLE KW, KINDER JE. Changes in ovarian function and gonadotropin secretion preceding the onset of nutritionally induced anestrus in *Bos taurus indicus* heifers. **Biol Reprod**. v.55, p.1437–43, 1996.

RHODES, F.M., DE'ATH, G., ENTWISTLE, K.W. Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. **Anim. Reprod. Sci.** v.38, p.265–277, 1995

RICHARDS, M.W.; WETTEMANN, R.P.; SCHOENEMANN, H.M. Nutritional anestrus in beef cows: Concentrations of glucose and nonesterified fatty acids in plasma and insulin in serum. **J. Anim. Sci.** v. 67, p. 2354-2362, 1989.

ROBINSON, R.S. PUSHPAKUMARA, PG.G, et al. Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on ovarian and uterine fuction in lacting dairy cows. **Reproduction**. v.124, p.119-131, 2002.

ROWLANDS, G.J.; MANSTON, R.; STARK, A.J. Changes in albumin, globulin, glucose and cholesterol concentrations in the blood of dairy cows in late pregnancy and early lactation and relationship with subsequent fertility. **Journal of Agricultural Science**. V.94, p. 517-527, 1980.

RUAS, J.R.M., TORRES, C.A.A., BORGES, L.E., MARCATTI NETO, A., SILVA FILHO, J.M., SANTOS, M.D., CARVALHO, G.R. 2000. Concentrações Plasmáticas de Colesterol, Glicose e Uréia em Vacas Zebuínas, em Relação à Condição Corporal e ao *Status* Reprodutivo. **Rev. bras. zootec.** V.29(6), p.2036-2042, 2001.

RUTTER, L.M., MANS, J.G. Hypoglycemia alters pulsatile and luteinizing hormone secretion in the postpartum beef cow. **J. Anim. Sci.** v.64, p. 479-488, 1987.

RYAN, D.P., B. BAO, M.K. GRIFFITH E G.L. WILLIAMS. Metabolic and luteal squealed to heightened dietary fat intake in undernourished, anestrous beef cows induced to ovulate. **J. Anim Sci.** v.73, p.2086-2093, 1995.

RYAN, D.P., R.A. SPOON E G.L. WILLIAMS. Ovarian follicular characteristics, embryo recovery, and embryo viability in heifers fed high fat diets and treated with follicle-stimulating hormone. **J. Anim. Sci.** v.70, p.3505-3513, 1992.

SANTOS , J.E.P. , CERRI, R.L.A., SARTORI, R. Nutritional management of the donor cow. **Theriogenology**. v. 69, p. 88-97, 2007.

SANTOS, J.E.P. E M. AMSTALDEN. Effects of nutrition on bovine reproduction. XIII Reunião Anual SBTE. Atibaia, SP. *In* **Arq. Fac. Vet.** UFRGS. Porto Alegre, RS. v.26(1), p.19-89, 1998.

SAS. **Statistical analyses system User's guide** SAS Inst. Inc., Cary, N.C., 1996, 192 p.

SEGERSON, E.C., HANSEN, T.R., LIBBY, D.W., RANDEL, R.D., GETZ, W.R. Ovarian and uterine morphology and function in Angus and Brahman cows. **J. Anim. Sci.** v.59, p.1026–1046, 1994.

SELNER, D. R., AND L.H. SCHULTZ. Effects of feeding oleic acid or hydrogenated vegetable oils to lactating cows. **J. Dairy Sci.** v.63, p.1235-1241, 1980.

SIMPSON, R.B., CHASE JR., C.C., SPICER, L.J., VERNON, R.K., HAMOND, A.C., RAE, D.O. Effect of exogenous insulin on plasma and follicular insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor binding protein activity, follicular estradiol and progesterone, and follicular growth in superovulated Angus and Brahman cows. **J. Reprod. Fertil.** v.102, p.483–492, 1994.

SINCLAIR KD, KURAN M, GEBBIE FE, WEBB R, MCEVOY TG. Nitrogen metabolism and fertility in cattle: II. Development of oocytes recovered from heifers offered diets differing in their rate of nitrogen release in the rumen. **J. Anim. Sci.** v.78, p.2670–2680, 2001.

SIROIS J, FORTUNE JE. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. **Biol. Reprod.** v.39(2), p.308-317, 1988.

SPICER LJ, CROWE MA, PRENDIVILLE DJ, GOULDING D, ENRIGHT WJ. Systemic but not intraovarian concentrations of insulin-like growth factor-I are affected by short-term fasting. **Biol. Reprod.** v.46(5), p.920-925, 1992.

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

STAPLES, C.R., BRUKE, J.M., THATCHER, W.W. Influence of supplemental fats on reproductive tissues and performance of lacting cows. **J. Dairy Sci.** v.81, p.856-871, 1998.

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

THOMAS, M.G., BAO, B., WILLIAMS, G.L. Dietary fats varying in their fatty acid composition differentially influence follicular growth in cows fed isoenergetic diets. **J. Anim. Sci.** v.75, p.2512–2519, 1997.

VASSENA, R., MAPLETOFT, R.J., ALLODI, S., SINGH, J., ADAMS, G.P. Morphology and developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status. **Theriogenology.** v.60, p.923–932, 2003.

VIANA, J.H.M., FERREIRA, A.M., SÁ, W.F., CAMARGO, L.S.A., FREITAS, C., SANTOS, J.C. Follicular Dynamics in Gyr Cattle. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, Porto Alegre, Brazil, 26 (Suppl.), 379 (abstract), 1998.

VIZCARRA, J.A., WETTEMANN, R.P., SPITZER, J.C., MORRISON, D.G. Body condition at parturition and postpartum weight gain influence luteal activity and concentrations of glucose, insulin, and noesterified fatty acids in plasma of primiparous beef cows. **J. Anim. Sci.** v.76, p.927-936, 1998.

WEEKES, T.E.C. Hormonal control of glucose metabolism. In: Tsuda, t., Sasaki, Y., Kawashima, R. Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants: INTERNATIONAL SYPOMSIUM ON RUMINANT PHYSIOLOGY, 7, Sendai, Japan. *Proceedings...* San Diego: Academic Press. p.183-200, 1991.

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

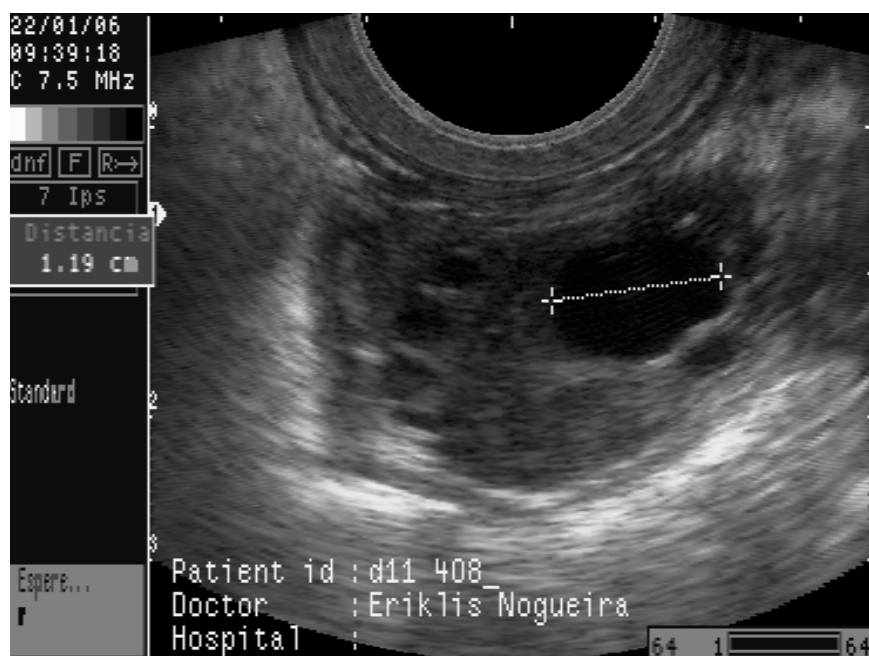
YAAKUB, H., O'CALLAGHAN, D., BOLAND, M.P. Effect of type of concentrates on superovulation and embryo yeld in beef heifers. **Theriogenology**, v.51, p.1259-1266, 1999.

ZEITOUN, M.M., RODRIGUEZ, H.F., RANDEL, R.D. Effect of season on ovarian follicular dynamics in Brahman cows. **Theriogenology**. v.45, p.1577–1581, 1996.

ANEXOS



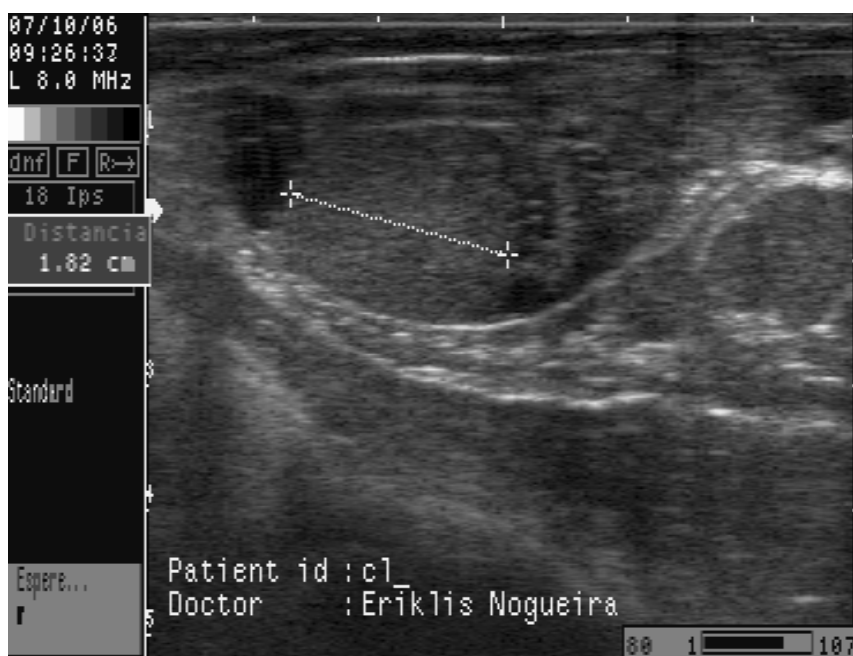
Animais Exp 1.



Avaliação folículo dominante



Avaliação desenvolvimento folicular



Avaliação Corpo Lúteo