

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 15/01/2017.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE ARAÇATUBA

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM SEMENTE DE
GIRASSOL EM FÊMEAS BOVINAS NA PRODUÇÃO DE
OÓCITOS E EMBRIÕES *IN VITRO***

Angélica Leão Baltazar

Bióloga

ARAÇATUBA- SP
2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE ARAÇATUBA**

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM SEMENTE DE
GIRASSOL EM FÊMEAS BOVINAS NA PRODUÇÃO DE
OÓCITOS E EMBRIÕES *IN VITRO***

**Angélica Leão Baltazar
Orientadora: Profa. Pesq. III Flávia Lombardi Lopes**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP, Câmpus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

**ARAÇATUBA - SP
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da FMVA / UNESP

B197e Baltazar, Angélica Leão
Efeitos da suplementação com semente de girassol em
fêmeas bovinas na produção de oócitos e embriões in vitro /
Angélica Leão Baltazar. – Araçatuba, 2016.
109f. : il. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba.
Orientadora: Profa. Flávia Lombardi Lopes

1. Ácido linoleico. 2. Bovinos. 3. Estruturas embrionárias.
4 Sementes. 5. Girassol. I. Título.

CDD 664.726



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba
Seção Técnica de Graduação e Pós-Graduação



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Efeitos da suplementação com semente de girassol em fêmeas bovinas na produção de óocitos e embriões in vitro

AUTORA: ANGÉLICA LEÃO BALTAZAR

COORIENTADORA: Dra. CLAUDIA MARIA BERTAN MEMBRIVE

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRA em CIÊNCIA ANIMAL (MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA E PRODUÇÃO ANIMAL) pela Comissão Examinadora.


Dra. CALIE CASTILHO SILVESTRE


Dr. GUILHERME DE PAULA NOGUEIRA


Dra. CLAUDIA MARIA BERTAN MEMBRIVE

DATA DA REALIZAÇÃO: 15 de janeiro de 2016.


Presidente da Comissão Examinadora
Dra. CLAUDIA MARIA BERTAN MEMBRIVE
- Coorientadora -

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ANGÉLICA LEÃO BALTAZAR – Nascida em 10 de abril de 1990, na cidade de Birigui/SP. Em 2009, ingressou no curso de Graduação em Ciências Biológicas na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS, Campus de Três Lagoas/MS, tendo concluído a graduação em março de 2013. Durante a graduação, desenvolveu atividades de pesquisa no Laboratório de Reprodução Animal, na área de Biotecnologia da Reprodução Animal, com ênfase no cultivo de oócitos bovinos em um sistema sem controle da atmosfera gasosa. No período de 01/08/2010 a 31/07/2011, foi bolsista de Iniciação Científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, Processo nº 145220/2010-9, com o projeto intitulado “Cultivo de oócitos bovinos em um sistema sem controle da atmosfera gasosa com uso da gonadotrofina sérica equina (PMSG)”. No período de 01/08/2011 a 31/07/2012 foi novamente bolsista de Iniciação Científica do CNPq, Processo nº 144285/2011-8, com o projeto intitulado “Citogenética de oócitos bovinos maturados em sistema sem controle da atmosfera gasosa”. Ambas as iniciações foram realizadas sob orientação do Prof. Dr. Hélder Silva e Luna. Em agosto de 2013, ingressou no curso de Mestrado em Ciência Animal na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP, Faculdade de Medicina Veterinária, Campus de Araçatuba/SP, na área de Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal, sob orientação da Profa. Pesquisadora III Flávia Lombardi Lopes. Durante o mestrado, permaneceu no Laboratório de Investigação da Fisiologia do Endométrio e do Embrião - LIFEE, sediado na UNESP, Campus de Dracena/SP, sob coorientação da Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive. Foi bolsista de Mestrado da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, no período de outubro de 2013 a fevereiro de 2015.

“Não percas a tua fé entre as sombras do mundo. Ainda que os teus pés estejam sangrando, segue para frente, erguendo-a por luz celeste, acima de ti mesmo. Crê e trabalha. Esforça-te no bem e espera com paciência. Tudo passa e tudo se renova na terra, mas o que vem do céu permanecerá. De todos os infelizes os mais desditosos são os que perderam a confiança em Deus e em si mesmo, porque o maior infortúnio é sofrer a privação da fé e prosseguir vivendo. Eleva, pois, o teu olhar e caminha. Luta e serve. Aprende e adianta-te. Brilha a alvorada além da noite. Hoje, é possível que a tempestade te amarfanhe o coração e te atormente o ideal, aguilhoando-te com a aflição ou ameaçando-te com a morte. Não te esqueças, porém, de que amanhã será outro dia”.

Chico Xavier

DEDICATÓRIA

A minha família, bem mais precioso que possuo, em especial a minha grandiosa mãe, MARIA LÚCIA LEÃO BALTAZAR, que é meu exemplo de bondade, dedicação e amor. “Tudo aquilo que sou, ou pretendo ser, devo a um anjo, minha mãe” (Abraham Lincoln).

Ao meu querido e amado noivo, ARTUR GUISSI ZAVANELLA, por todo carinho, compreensão, companheirismo e apoio as minhas escolhas.

AGRADECIMENTOS

Á Deus, por sempre me dar a força necessária para seguir em frente todos os dias, e me ensinar que os percalços da vida são necessários ao nosso aprendizado e evolução.

Aos meus pais, André Baltazar Filho e Maria Lúcia Leão Baltazar, e minha irmã, Andressa Leão Baltazar, e todos meus familiares e amigos, por sempre me darem o suporte necessário, amor e compreensão, estando ao meu lado nas lutas, derrotas e conquistas da vida.

Ao meu amado noivo, Artur Guissi Zavanella, que ao longo de nove anos de namoro e companheirismo, sempre esteve ao meu lado em todos os momentos, me apoiando e incentivando. Obrigada por sempre sorrir e por me mostrar o lado positivo de todas as coisas. Com você ao meu lado esta caminhada se tornou mais suave.

A Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP, Campus de Araçatuba/SP, em especial a Profa. Dra. Juliana Regina Peiró, pela oportunidade concedida.

A minha querida co-orientadora, Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive, por sempre persistir, incentivar e se esforçar para que esse trabalho fosse realizado, além de ser um exemplo de dedicação e comprometimento.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de mestrado concedida.

A Fundação para o Desenvolvimento da UNESP (FUNDFUNESP), pelo auxílio financeiro concedido para o desenvolvimento do presente trabalho.

A Fazenda Experimental da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), por disponibilizar os animais utilizados no presente estudo, e fornecer o local apropriado para o experimento. Agradeço também aos funcionários da fazenda, pelo apoio, paciência, orientação, e ajuda na execução do experimento e no manejo dos animais, em especial: Edson, Rosa, Jefferson e Paulo.

Ao Dr. José Otávio Folino Silva, médico veterinário responsável e proprietário do laboratório Quali's in vitro, por ter disponibilizado a estrutura física do laboratório para os processos de PIV de embriões bovinos, e pela realização do processo de aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU) nas novilhas utilizadas no experimento.

A Profa. Dra. Caliê Castilho Silvestre, da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente/SP, pela valiosa contribuição científica e por acompanhar de perto todas as etapas deste experimento.

A Profa. Ms. Sheila Merlo Garcia, da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), pela disponibilidade e auxílio na realização dos procedimentos de PIV de embriões.

A PROGEST Biotecnologia em Reprodução Animal, em especial á Dra. Raquel Puelker, pela doação de parte dos meios de cultivo utilizados neste estudo.

Ao Prof. Dr. Gelci Carlos Lupatini, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), e a sua orientada, Mayara Mayumi dos Santos Shiguematsu, graduanda de Zootecnia pela UNESP de Dracena, pela grandiosa ajuda na coleta, processamento e análise das amostras de forragens e suplementos utilizados no experimento.

Ao Prof. Dr. Paulo Meireles, responsável pelo Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal, Laboratório de Bromatologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, pela realização das análises bromatológicas das forragens e suplementos.

A Mariângela Bueno Cordeiro, doutoranda do programa de Pós-graduação da UNESP do Campus de Araçatuba/SP, pela ajuda na utilização do “software” Graph Pad Prism®, Version 5.01, aplicado para a confecção dos gráficos referentes aos resultados do presente estudo.

A Profa. Dra. Gisele Zocal Mingoti, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba/SP, pela oportunidade de realizar um estágio de treinamento e capacitação em seu Laboratório de Fisiologia da Reprodução, e também por todo auxílio, suporte e atenção que suas orientadas Priscila, Beatriz e Natália dispenderam á mim.

Ao Dr. Guilherme Pugliesi, Pós Doutorando do Departamento de Reprodução Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo – USP, pelo auxílio na realização da análise estatística dos dados.

Ao Dr. Milton Maturana Filho, Pós Doutorando do Departamento de Reprodução Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo – USP, pela realização das mensurações plasmáticas de colesterol total, triglicérides, HDL e LDL.

Ao Prof. Dr. Guilherme de Paula Nogueira, da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP de Araçatuba/SP, e ao Dr. Daniel de Jesus Cardoso de Oliveira, pesquisador da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), pelas grandes contribuições e valiosas sugestões durante a participação na banca do Exame Geral de Qualificação.

Aos queridos amigos Gabriel Molinari de Mattos, Mestrando do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal pela Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE); Beatriz de Moraes Ropelli, Alan Brunholi Giroto e Renato Aranda Fernandes, graduandos em Medicina Veterinária pela UNOESTE, pela grandiosa contribuição experimental, auxiliando na execução dos procedimentos técnicos de manejo com os animais. Agradeço pela oportunidade de ter conhecido vocês e pelos momentos de grande alegria e aprendizado que pudemos compartilhar.

Aos técnicos de laboratório da UNESP, Campus de Dracena/SP, pelo auxílio concedido, em especial a técnica Ariane Carrascossi da Silva, pela disponibilidade em ajudar, paciência, dedicação e comprometimento com tudo o que faz. Encontrei uma amiga para a vida inteira e que com certeza tornou os dias de dificuldade mais amenos.

Ao Prof. Dr. Guilherme de Paula Nogueira e a Profa. Dra. Caliê Castilho Silvestre, componentes da banca examinadora, pela disponibilidade e colaboração nesta dissertação.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho...o meu muito obrigada!

SUMÁRIO

	Página
I. INTRODUÇÃO.....	29
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	33
2.1 Características lipídicas da semente de girassol.....	33
2.2 Produção nacional de embriões bovinos <i>in vitro</i>	36
2.3 Efeitos dos AGPI na performance reprodutiva de fêmeas bovinas.....	38
2.4 Efeitos da suplementação lipídica em oócitos e embriões.....	40
2.5 Aplicação prática da suplementação lipídica em programas de produção de embriões bovinos.....	43
III. OBJETIVOS.....	48
IV. HIPÓTESE.....	49
V. MATERIAL E MÉTODOS.....	50
5.1 Local do experimento.....	50
5.2 Animais.....	50
5.3 Sincronização da onda de crescimento folicular.....	51
5.4 Tratamentos <i>in vivo</i>	52
5.5 Aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU).....	54
5.6 Identificação dos COCs.....	55
5.7 Maturação <i>in vitro</i> dos oócitos.....	56
5.8 Fertilização <i>in vitro</i>	56
5.9 Cultivo de embriões <i>in vitro</i>	56
5.10 Coleta de sangue.....	57
5.11 Mensuração das concentrações plasmáticas de colesterol total, triglicérides, HDL e LDL.....	58
5.12 Coleta das amostras de forragem e suplementos.....	58
5.13 Análises bromatológicas.....	59
5.14 Análise estatística.....	59
VI. RESULTADOS.....	61
6.1 Ganho de peso.....	61
6.2 Escore de condição corporal.....	64
6.3 Número de folículos visualizados, número de oócitos aspirados e taxa de recuperação oocitária.....	66
6.4 Taxa de clivagem.....	69
6.5 Número de embriões produzidos <i>in vitro</i>	70

6.6 Número de blastocistos produzidos <i>in vitro</i>	71
6.7 Número de embriões GI e GII produzidos <i>in vitro</i>	72
6.8 Taxa de blastocistos.....	73
6.9 Taxa de embriões graus I e II.....	74
6.10 Avaliação das concentrações plasmáticas de colesterol total, triglicérides, HDL e LDL	75
6.11 Análises bromatológicas das forragens e suplementos.....	80
VII. DISCUSSÃO.....	82
VIII. CONCLUSÃO.....	90
IX. IMPLICAÇÃO.....	91
REFERÊNCIAS.....	92
APÊNDICE.....	107

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidônico
AGE	Ácidos graxos essenciais
AG	Ácidos graxos
AGPI	Ácidos graxos poliinsaturados
ALA	Ácido Linolênico
AL	Ácido linoleico
BE	Benzoato de estradiol
BSA	Albumina sérica bovina
C	Controle
C16:0	Ácido palmítico
C18:0	Ácido esteárico
C18:1	Ácido oleico
°C	Graus Celsius
CL	Corpo lúteo
CLA	Ácido linoleico conjugado
cm	Centímetro
CO₂	Dióxido de carbono
COCs	Complexos <i>cumulus</i> -oócito
DHA	Ácido docosahexanóico
DPBS	Solução salina em tampão fosfato
ECC	Escore de condição corporal
EE	Extrato etéreo
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético de sódio
EPA	Ácido eicosapentaenoico
EPM	Erro padrão da média
FDA	Fibra em detergente ácido
FDN	Fibra em detergente neutro
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante
g	Gramas
G	Girassol
h	Hora
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HEPES	N- (2-hydroxyethyl) piperazine-N'- (2-ethanesulfonic acid); 4-(2 Hydroxyethyl) piperazine- 1-ethanesulfonic acid
hpi	Horas pós-inseminação

IA	Inseminação artificial
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
IFNT	Interferon- tau
IGF-1	Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1
IM	Intramuscular
kg	Kilograma
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LH	Hormônio luteinizante
Log	Logarítmo
m	Metro
MCI	Massa celular interna
mg	Miligrama
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mmHg	Milímetros de mercúrio
MM	Matéria mineral
MOET	Ovulação múltipla e transferência de embriões
MS	Matéria seca
n	Número
n-3	Ômega-3
n-6	Ômega-6
NaHCO₃	Bicarbonato de sódio
NDT	Nutrientes digestíveis totais
OPU	<i>“Ovum pick up”</i>
P4	Progesterona
PB	Proteína bruta
PGF2α	Prostaglandina F2 α
PHE	Penicilina, Hipotaurina e Epinefrina
PIV	Produção <i>in vitro</i> de embriões
Rank	Ranqueamento
SAS	Sistema de análise estatística
SFB	Soro fetal bovino
SOF	<i>“Synthetic oviduct fluid”</i>
TALP	Tyrode’s” albumina lactato piruvato
TE	Transferência de embriões
TCM-199	“Tissue culture medium” 199
TETF	Transferência de embriões em tempo fixo
UI	Unidades internacionais

µg	Micrograma
µl	Microlitro
µm	Micrômetro
%	Porcentagem

LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1 –** Representação esquemática do delineamento experimental ilustrando os respectivos dias de OPU, aplicação de PGF2 α e BE, coletas de sangue e o período de suplementação..... 53
- Figura 2 –** Peso Vivo (kg) nos diferentes dias de suplementação, em fêmeas bovinas Nelore (n=30) suplementadas durante 57 dias com 1,7 kg de suplemento contendo ou não semente de girassol..... 61
- Figura 3 –** Peso Vivo (kg) dos animais em relação ao tempo, em cada dia de suplementação para fêmeas bovinas Nelore (n=30) suplementadas durante 57 dias com 1,7 kg de suplemento contendo ou não semente de girassol..... 62
- Figura 4 –** Escore de condição corporal (escala de 1 a 5) em fêmeas bovinas Nelore (n = 30) suplementadas durante 57 dias com 1,7 kg de suplemento contendo ou não semente de girassol..... 65
- Figura 5 –** Escore de condição corporal (escala de 1 a 5) em relação ao tempo, de cada grupo em cada dia de suplementação, para fêmeas bovinas Nelore (n = 30) suplementadas durante 57 dias com 1,7 kg de suplemento contendo ou não semente de girassol..... 66

Figura 6 –	Número de folículos visualizados em fêmeas bovinas Nelore (n = 30) suplementadas durante 57 dias com 1,7 kg de suplemento contendo ou não semente de girassol.....	67
Figura 7 –	Número de oócitos aspirados em fêmeas bovinas Nelore (n = 30) suplementadas durante 57 dias com 1,7 kg de suplemento contendo ou não semente de girassol.....	68
Figura 8 –	Taxa de recuperação dos oócitos cultivados em relação aos folículos aspirados em fêmeas bovinas Nelore (n = 30) suplementadas durante 57 dias com 1,7 kg de suplemento contendo ou não semente de girassol.....	69
Figura 9 –	Taxa de clivagem (porcentagem dos embriões clivados / total de oócitos cultivados) em fêmeas bovinas Nelore (n = 30) suplementadas durante 57 dias com 1,7 kg de suplemento contendo ou não semente de girassol.....	70
Figura 10 –	Número de embriões produzidos <i>in vitro</i> em fêmeas bovinas Nelore (n = 30) suplementadas durante 57 dias com 1,7 kg de suplemento contendo ou não semente de girassol.....	71
Figura 11 –	Número de blastocistos em fêmeas bovinas Nelore (n = 30) suplementadas durante 57 dias com 1,7 kg de suplemento contendo ou não semente de girassol.....	72

Figura 12 –	Número de embriões GI e GII produzidos <i>in vitro</i> , em fêmeas bovinas Nelore (n = 30) suplementadas durante 57 dias com 1,7 kg de suplemento contendo ou não semente de girassol.....	73
Figura 13 –	Taxa de blastocistos (porcentagem de blastocisto geral (grau I + grau II) / total de oócitos cultivados) em fêmeas bovinas Nelore (n = 30) suplementadas durante 57 dias com 1,7 kg de suplemento contendo ou não semente de girassol.....	74
Figura 14 –	Taxa de embriões GI e GII (porcentagem de embriões Grau I e Grau II (mórula a blastocisto eclodido) no D7 / total de oócitos cultivados) em fêmeas bovinas Nelore (n = 30) suplementadas durante 57 dias com 1,7 kg de suplemento contendo ou não semente de girassol.....	75
Figura 15 –	Concentrações plasmáticas de colesterol total (mg/dL) de fêmeas bovinas Nelore (n = 30) tratadas com 1,7 kg de suplemento contendo ou não semente de girassol durante 57 dias.....	76
Figura 16 –	Concentrações plasmáticas de triglicerídeos (mg/dL) de fêmeas bovinas Nelore (n = 30) tratadas com 1,7 kg de suplemento contendo ou não semente de girassol, durante 57 dias.....	77
Figura 17 –	Concentrações plasmáticas de HDL (mg/dL) de fêmeas bovinas Nelore (n = 30) tratadas durante 57 dias com 1,7 kg de suplemento contendo ou não semente de girassol.....	78

Figura 18 – Concentrações plasmáticas de LDL (mg/dL) em fêmeas bovinas Nelore (n = 30) tratadas durante 57 dias com 1,7 kg de suplemento contendo ou não semente de girassol (n = 30)..... 79

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Principais fontes de gordura empregadas na alimentação animal e suas respectivas composições de ácidos graxos.....	34
Tabela 2 – Variação da composição em ácidos graxos do óleo em função de seis genótipos de girassol.....	35
Tabela 3 – Médias \pm EPM para as diferentes variáveis analisadas no experimento em relação aos diferentes dias em que foram realizadas aspirações foliculares (OPU), para fêmeas bovinas Nelore (n = 30) suplementadas durante 57 dias com 1,7kg de suplemento contendo ou não semente de girassol.....	63
Tabela 4 – Médias \pm EPM das variáveis observadas durante o experimento em relação ao peso, ECC, nº de folículos visualizados, nº de oócitos aspirados, taxa de clivagem, nº de embriões, nº de blastocistos, nº de embriões GI e GII, taxa de blastocistos e taxa de embriões GI e GII para fêmeas Nelore suplementadas ou não, e os valores de P considerando grupo, tempo e a interação entre grupo x tempo.....	64
Tabela 5 – Composição bromatológica das amostras de forragens para simulação de pré-pastejo de capim estrela-africana (<i>Cynodon nlemfüensis</i>) para os grupos experimentais e dos suplementos contendo ou não semente de girassol utilizados no experimento.....	80

Tabela 6 -	Médias das alturas e da massa de forragem de capim estrela-africana (<i>Cynodon nlemfüensis</i>), coletadas no período pré e pós-pastejo, para o Grupo Controle e Girassol.....	81
-------------------	---	----

APÊNDICE A

Página

Figura 1A – Consumo dos suplementos/animal/dia em relação aos dias de ingestão do suplemento, demonstrando a ingestão estipulada e a ingestão alcançada para o Grupo Controle.....	108
Figura 2A – Consumo dos suplementos/animal/dia em relação aos dias de ingestão do suplemento, demonstrando a ingestão estipulada e a ingestão alcançada para o Grupo Girassol.....	109

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM SEMENTE DE GIRASSOL EM FÊMEAS BOVINAS NA PRODUÇÃO DE OÓCITOS E EMBRIÕES *IN VITRO*

RESUMO- A suplementação com compostos ricos em ácido linoleico, dentre os quais inclui-se a semente de girassol, promove aumento na taxa de concepção em fêmeas bovinas. Hipotetizou-se que a suplementação com semente de girassol em doadoras de oócitos aumenta o número e a qualidade de oócitos, incrementa as taxas de clivagem e determina um aumento no número e qualidade dos blastocistos produzidos *in vitro*. Assim, objetivou-se investigar o efeito de tal suplementação, no número e qualidade de oócitos cultivados *in vitro*, na taxa de clivagem e no número e qualidade de blastocistos produzidos *in vitro*. Para tanto, cinco vacas e vinte e cinco novilhas (n=30) Nelore foram divididas em dois grupos para receberem um dos seguintes tratamentos: 1,7 kg/dia de suplemento contendo 53% de farelo de soja com 44% de PB e 47% de milho (Grupo Controle - Grupo C; n= 15) ou 1,7 kg/dia de suplemento contendo 40% de farelo de soja com 44% de proteína bruta (PB) e 60% de semente de girassol (Grupo Girassol - Grupo G; n= 15), durante 57 dias. As fêmeas foram submetidas à aspiração folicular nos dias D0, D13, D29, D43, D56 e D77 (D0= início da suplementação; D56= término da suplementação). Os oócitos foram submetidos ao processo de produção de embriões *in vitro*. Os dados foram analisados pelo programa Mixed procedure (SAS) versão 9.2, pelo teste ANOVA modelo misto. Não se observou diferença entre os Grupos C e G no número de folículos visualizados ($16,85 \pm 1,32$ vs. $16,12 \pm 1,48$); número de oócitos aspirados ($13,80 \pm 1,27$ vs. $13,05 \pm 1,25$); taxa de recuperação ($82 \pm 1\%$ vs. $80 \pm 2\%$); taxa de clivagem ($76,32 \pm 1,58\%$ vs. $76,78 \pm 2,11\%$); número de embriões ($10,79 \pm 0,94$ vs. $10,08 \pm 1,01$); número de blastocistos ($5,89 \pm 0,66$ vs. $4,48 \pm 0,6$); número de embriões Grau I e II ($5,49 \pm 0,64$ vs. $4,17 \pm 0,57$); concentrações plasmáticas de colesterol total ($85,76 \pm 1,20$ vs. $87,11 \pm 1,18$ mg/dL), triglicerídeos

(14,98 ± 0,29 vs. 14,26 ± 0,27 mg/dL); HDL (35,12 ± 1,10 vs. 35,40 ± 1,0 mg/dL) e LDL (47,92 ± 1,58 vs. 48,85 ± 1,51 mg/dL), para os respectivos grupos. Conclui-se que a suplementação com semente de girassol em doadoras de oócitos não incrementou o número e a qualidade de oócitos, as taxas de clivagem e o número e qualidade dos blastocistos produzidos *in vitro*.

Palavras-chave: ácido linoleico, bovinos, estruturas embrionárias, girassol, oócitos, sementes

EFFECTS OF SUPPLEMENT WITH SUNFLOWER SEED IN THE FEMALE BOVINE OOCYTES PRODUCTION AND EMBRYOS *IN* *VITRO*

SUMMARY- Supplementation with compounds rich in linoleic acid, among which is included sunflower seed, promotes increase in conception rates in cows. It was hypothesized that sunflower seed supplementation in oocyte donors increases the number and quality of oocytes, increases the cleavage rates and determines an increase in the number and quality of blastocysts produced *in vitro*. Therefore the objective was to investigate the effect of such supplementation, in the number and quality of oocytes cultured *in vitro* on cleavage rate and in the number and quality of *in vitro* produced blastocysts. Therefore, cows five and twenty-five heifers (n = 30) Nellore were divided into two groups to receive one of the following treatments: 1.7 kg / day supplement containing 53% soybean meal 44% and 47% PB corn (Control Group - Group C, n = 15) or 1.7 kg / containing 40% add-on of soybean meal with 44% crude protein (CP) and 60% sunflower seed (Sunflower group - Group G; n = 15) for 57 days. Females underwent follicular aspiration on days D0, D13, D29, D43, D56 and D77 (D0 = start of supplementation; D56 = end of supplementation). The oocytes were subjected to *in vitro* embryo production process. Data were analyzed by the Mixed procedure (SAS) version 9.2, by ANOVA mixed model. There was no difference between Groups C and G on the number of displayed follicles (16.85 ± 1.32 vs. 16.12 ± 1.48); number of aspirated oocytes (13.80 ± 1.27 vs. 13.05 ± 1.25); recovery rate ($82 \pm 1\%$ vs. $80 \pm 2\%$); cleavage rate ($76.32 \pm 1.58\%$ vs. $76.78 \pm 2.11\%$); number of embryos (10.79 ± 0.94 vs. 10.08 ± 1.01); number of blastocysts (5.89 ± 0.66 vs. 4.48 ± 0.6); embryos number of Grade I and II (5.49 ± 0.64 vs. 4.17 ± 0.57); plasma concentrations of total cholesterol (85.76 ± 1.20 vs. 87.11 ± 1.18 mg / dl),

triglycerides (14.98 ± 0.29 vs. 14.26 ± 0.27 mg / dL); HDL (35.12 ± 1.10 vs. 35.40 ± 1.0 mg / dL) and LDL (47.92 ± 1.58 vs. 48.85 ± 1.51 mg / dL), for the respective groups. It was concluded that sunflower seed supplementation in oocyte donors did not increase the number and quality of oocytes, cleavage rates and the number and quality of blastocysts produced *in vitro*.

Keywords: linoleic acid, cattle, embryonic structures, sunflower, oocytes, seed

I- INTRODUÇÃO

A demanda mundial por alimentos cresce de forma desproporcional ao aumento da população (FEDOROFF et al., 2010). O Brasil possui o segundo maior rebanho bovino do mundo, estimado em 217.550.000 animais, sendo 80% destes destinados à produção de carne. Estima-se que a produção nacional de carne bovina em 2015 tenha sido de 8.192.920 toneladas de equivalente carcaça, proveniente do abate de 43.070.000 cabeças (ANUALPEC, 2015). Atualmente, o Brasil apresenta uma taxa de desfrute (número de animais abatidos divididos pelo número total de animais x 100) de 20% e abate carcaças com um peso médio de 15 arrobas (ANUALPEC, 2015). Em comparação, os norte-americanos desfrutam de 30% do seu rebanho e abatem carcaças pesando 24 arrobas (ANUALPEC, 2015). Assim, o rebanho nacional apresenta uma produção de carne/animal abatido aquém da almejada.

Na bovinocultura de corte, a produtividade está diretamente relacionada à eficiência reprodutiva das fêmeas, que devem apresentar um intervalo entre partos de 12 meses, gerando a produção de um bezerro/matriz/ano. Em 2014, o rebanho nacional era composto por 80.632.741 matrizes, destas 65.548.639 eram vacas e 15.084.102 novilhas com mais de 24 meses. Em 2015, estimou-se uma produção nacional de 47.984.262 bezerros (ANUALPEC, 2015), caracterizando uma média nacional de 0,6 bezerro/vaca/ano, um intervalo entre partos de aproximadamente 18 meses e uma baixa eficiência reprodutiva.

Para que a bovinocultura brasileira supere os índices atuais de produtividade, além da eficiência reprodutiva, o melhoramento genético necessita ser priorizado (BARUSELLI et al., 2006). O emprego de biotécnicas que possibilitam que fêmeas bovinas geneticamente superiores se multipliquem em maior escala favorece o incremento genético do rebanho. Neste contexto, o Brasil se tornou líder mundial no emprego da técnica de transferência de embriões em tempo fixo (TETF). A TETF, aliada à produção *in vitro* (PIV) de

embriões, constituem biotécnicas poderosas para aumentar os produtos nascidos oriundos de matrizes geneticamente superiores.

O número total de embriões produzidos no mundo (coletados *in vivo* e produzidos *in vitro*), entre 2008 e 2012, apresentou um aumento de 5,8%. Entre 2012 e 2013, o aumento foi de 11,6%, chegando ao total de 1.275.874 embriões produzidos (Sociedade brasileira de tecnologia de embriões, 2015). Atualmente, o Brasil consagrou-se como líder mundial na PIV de embriões bovinos, responsável por 70% do total de embriões gerados no mundo (Federação da agricultura e pecuária do estado de Minas Gerais, 2013).

As matrizes zebuínas apresentam maior produção de oócitos quando comparadas as fêmeas taurinas. Com o emprego da aspiração folicular guiada por ultrassonografia pelo método de “*ovum pick up*” (OPU) associado à produção *in vitro* (PIV), fêmeas da raça Nelore se tornaram as principais representantes do rebanho nacional de matrizes, pois rendem em média 30 oócitos por sessão de OPU, podendo chegar até mais que 128 oócitos viáveis coletados em um único animal (PONTES et al., 2011). Com o emprego destas biotécnicas, torna-se possível obter entre 50 a 100 embriões/fêmeas/ano. Considerando uma taxa de concepção de 50% após a TETF, torna-se possível obter de 25 a 50 bezerros/vaca/ano (RHEINGANTZ, 2005), índice que supera a eficiência dos métodos convencionais que associam a superovulação a transferência de embriões (MOET), resultando em um menor custo por prenhez. No comparativo entre as técnicas de OPU associada à PIV com o método convencional MOET (ovulações múltiplas e transferência de embriões), a OPU/PIV oferece a vantagem de reduzir o intervalo entre as coletas no mínimo em 15 dias, além de possibilitar a produção em média de oito embriões viáveis por sessão de aspiração. Pela técnica de MOET, a média seria de três a quatro embriões viáveis por coleta (PONTES et al., 2009).

A OPU/PIV permite empregar sêmen de touros de alto valor genético, reduzindo o custo do sêmen e do embrião produzido, uma vez que mais de 100 embriões podem ser originados com uma única palheta de sêmen. A PIV

permite a escolha do sexo dos bezerros gerados pela possibilidade de emprego do sêmen sexado e permite ainda o uso em maior escala das fêmeas receptoras de embriões, reduzindo o custo desta categoria (RHEINGANTZ, 2005). Entretanto, deve-se salientar que o principal obstáculo para a expansão comercial da PIV no Brasil é a obtenção de taxas de concepção insatisfatórias quando se transfere embriões criopreservados (NOGUEIRA, 2008a).

A maior produção de embriões por OPU/PIV reduz o custo por bezerro nascido. Desta forma, estratégias que possam incrementar a produção de oócitos aspirados, de embriões produzidos *in vitro* e/ou as taxas de concepção tornam-se relevantes para aumentar a eficiência destas biotécnicas associadas.

Dentre os fatores que exercem influência na reprodução de fêmeas bovinas, a nutrição tem um papel reconhecidamente importante por modificar a performance reprodutiva (SARTORI; GUARDIEIRO, 2010). Observou-se em estudos prévios, que os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) promovem benefícios às funções reprodutivas de fêmeas bovinas através de mecanismos não relacionados à suplementação energética (FUNSTON, 2004; RAES et al., 2004; STAPLES et al., 1998). Para bovinos, os AGPI da família do ômega 3 (n-3) e 6 (n-6), são os mais importantes envolvidos na reprodução. O ácido linoleico (AL) é abundante nos óleos vegetais e é um dos representantes da família do ômega 6 (WATHES et al., 2007). Dentre as sementes oleaginosas, uma das fontes mais ricas em AL é a semente de girassol (*Helianthus annuus L.*). O teor de óleo do girassol varia de 20 a 45% de acordo com o cultivar (DAGHIR et al., 1980; KARUNOJEEWA et al., 1989; SILVA, 1990), caracterizando-se por ter alta relação de AGPI/saturados (65,3%/11,6%). Em tal semente, os AGPI são constituídos por 65% de AL e 20% de ácido graxo insaturado oléico (CHEVA- ISARAKUL; TANGTWEWIPAT, 1991).

Em estudos prévios realizados por este grupo (CORDEIRO et al., 2015), observou-se que a taxa de concepção foi aumentada em vacas Nelore suplementadas com semente de girassol durante 22 dias a partir da

Inseminação artificial em tempo fixo- IATF (47,8% vs. 66,7%), onde verificou-se um incremento de 18,9% nas taxas de concepção quando tal suplementação foi aliada a IATF. O entendimento dos mecanismos pelos quais tal incremento é ocasionado torna-se de grande interesse.

O efeito dos AGPI fornecidos na dieta sobre a reprodução pode ser parcialmente mediado por alterações na composição destes no fluído folicular e no microambiente que cerca o complexo *cumulus*-oócitos durante o desenvolvimento e maturação do folículo (CHILDS et al., 2008a; FOULADI-NASHTA et al., 2009). Além disso, relata-se que a suplementação com AGPI (FERGUSON, 1991), altera o número e o tamanho de folículos ovarianos (BILBY et al., 2006; LUCY et al., 1991; ROBINSON et al., 2002), além de incrementar a qualidade oocitária (CERRI et al., 2009b; CHILDS et al., 2008a; KIM et al., 2001; KOJIMA et al., 1997; ZERON et al., 2002). Em relação aos efeitos que os AGPI podem promover no microambiente uterino, estratégias nutricionais podem ser empregadas com a finalidade de reduzir a mortalidade embrionária entre os dias 15 e 19 da gestação. Tais estratégias objetivam minimizar a capacidade de síntese de $PGF2\alpha$ no endométrio materno e/ou maximizar o estímulo anti-luteolítico induzido pelo concepto. A utilização de determinados componentes na dieta poderia promover alterações na composição lipídica endometrial, tornando-o menos luteolítico (MATTOS et al., 2000). Dentre os componentes citados, encontra-se o ácido linoleico.

A hipótese do presente estudo é que a suplementação com semente de girassol em doadoras de oócitos aumenta o número e a qualidade de oócitos, incrementa as taxas de clivagem e determina um aumento no número e qualidade dos blastocistos produzidos *in vitro*.

No presente estudo, objetivou-se investigar o efeito da suplementação com semente de girassol no número e qualidade de oócitos cultivados *in vitro*, na taxa de clivagem e no número e qualidade de blastocistos produzidos *in vitro* provenientes de fêmeas Nelore.

VIII. CONCLUSÃO

Conclui-se que a suplementação com semente de girassol em doadoras de oócitos não incrementou o número e a qualidade de oócitos, as taxas de clivagem e o número e qualidade dos blastocistos produzidos *in vitro* em fêmeas Nelore (*Bos taurus taurus*).

REFERÊNCIAS

ADAMIAK, S. J. et al. Inclusion of bovine serum from different dietary backgrounds influences embryo viability in vitro. **Reproduction Abstract Series**, v. 31, p. 19, 2004.

ALLAIN, C.C. et al. Enzymatic determination of total serum cholesterol. **Clinical Chemistry**, v. 20, n.4, p. 470-475, 1974.

ALVIM, M.J. et al. Avaliação sob pastejo do potencial forrageiro de gramíneas do gênero *Cynodon*, sob dois níveis de nitrogênio e potássio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.1, p.47-54, 2003.

ANDRADE, F. M. E. **Produção de forragem e valor alimentício do capim-marandu submetido a regimes de lotação contínua por bovinos de corte**. 2003. 125 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Ciência Animal e Pastagens) - *Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, ESALQ/USP*, Piracicaba, 2003. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11139/tde-25032004-164248/>>. Acesso em: 17 out. 2015.

ANUALPEC. **Anuário da pecuária brasileira**, 2015. São Paulo: FNP, 2015.

ARM & HAMMER. Animal Nutrition Group. Megalac®- E: gordura protegida ruminal. **QGN Química Geral do Nordeste S. A.**, p.10, 2008.

ARMSTRONG, D.G. et al. Steroidogenesis in bovine granulosa cells: the effect of short-term changes in dietary intake. **Reproduction**, v.123, n. 3, p. 371-378, 2002.

BADER, J. F. et al. Effects of prepartum lipid supplementation on FSH superstimulation and transferable embryo recovery in multiparous beef cows. **Animal Reproduction Science**, v. 85, n. 1-2, p. 61-70, 2005.

BARUSELLI, P. S. et al. Impacto da IATF na eficiência reprodutiva em bovinos de corte. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2., Londrina, 2006. Anais eletrônicos. Disponível em: http://www.cemtralbelavista.com.br/adm/Filemanager/ckeditor/arquivos/Baruselli_e_col._IATF.pdf. Acesso em: 18 out. 2015.

BILBY, T. R. et al. Effects of dietary unsaturated fatty acids on oocyte quality and follicular development in lactating dairy cows in summer. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n.10, p. 3891–3903, 2006.

BINELLI, M. et al. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. **Theriogenology**, v. 56, n.9, p. 1451-1463, 2001.

CERRI, R. L. A. et al. Effect of fat source differing in fatty acid profile on metabolic parameters, fertilization, and embryo quality in high-producing dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n.4, p. 1520-1531, 2009b.

CERRI, R. L. A. et al. Effect of fat sources differing in fatty acid profile on fertilization rate and embryo quality in lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 297, 2004.

CERRI, R. L. A. et al. Period of dominance of the ovulatory follicle influences embryo quality in lactating dairy cows. **Reproduction**, v. 137, n.5, p. 813–823, 2009a.

CHEVA-ISARAKUL, B.; TANGATAWEEWIPAT, S. Effect of different levels of sunflower seed in broiler rations. **Poultry Science**, v. 70, n.11, p. 2284-2294, 1991.

CHILDS, S. et al. Effect of dietary enrichment with either n-3 or n-6 fatty acids on systemic metabolite and hormone concentration and ovarian function in heifers. **Animal**, v. 2, n.6, p. 883-893, 2008b.

CHILDS, S. et al. Embryo yield and quality following dietary supplementation of beef heifers with n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA). **Theriogenology**, v. 70, n.6, p. 992-1003, 2008a.

COPPOCK, C.E.; WILKS, D.L. Supplemental fat in high-energy rations for lactating cows: effects on intake, digestion, milk yield, and composition. **Journal of Animal Science**, v. 69, n.9, p. 3826-3837, 1991.

CORDEIRO, M. B. et al. Supplementation with sunflower seed increases circulating cholesterol concentrations and potentially impacts on the pregnancy rates in *Bos indicus* beef cattle. **Theriogenology**, v. 83, n.9, p.1461-1468, 2015.

COYNE, G.S.; KENNY, D.A.; WATERS, S.M. Effect of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids supplementation on bovine uteroendometrial and hepatic gene expression of the insulin-like growth factor system. **Theriogenology**, v. 75, n.3, p.500-512, 2011.

DAGHIR, N. J.; RAZ, M. A; UWAYJAN, M. Studies the utilization of full fat sunflower seed in broiler rations. **Poultry Science**, v. 59, N.10, p. 2273-2278, 1980.

DOBSON, H. et al. Is stress really all that important? **Theriogenology**, v.55, n.1, p.65-73, 2001.

DOBSON, H.; SMITH, R.F. What is stress, and how does it affect reproduction? *Animal Reproduction Science*, v. 60–61, p. 743–752, 2000.

DUCKETT, S.K. **Effect of nutrition and management practices on marbling deposition and composition**, 2003. Disponível em: <<http://www.cabprogram.com/cabprogram/sd/articles/duckett.html>>. Acesso em: 24 out. 2015.

EZEQUIEL J. M. B. Uso de caroço de algodão na alimentação animal. In: SIMPÓSIO GOIANO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE BOVINOS, 3., 2001, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2001. p. 307-328.

FEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PUCUÁRIA DO ESTADO DE MINAS GERAIS. **Porteiras abertas para o futuro**. 2013. Disponível em: <<http://www.sistemafaemg.org.br/Noticia.aspx?Code=1765&Portal=1&PortalNews=1&ParentCode=139&ParentPath=None&ContentVersion=R>>. Acesso em: 16 out. 2013.

FEDOROFF, N.V. et al. Radically rethinking agriculture for the 21st century. **Science**, v. 327, n.5967, p. 833-834, 2010.

FERGUSON, E.M.; LEESE, H.J. A potencial role for triglyceride as an energy source during bovine oocyte maturation and early embryo development. **Molecular Reproduction and Development**, v.73, n.9, p.1195-1201, 2006.

FERGUSON, J.D. Nutrition and reproduction in dairy cows. **Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, v.7, n.2, p.483-507, 1991.

FOSSATI, P.; PRENCIPE, L. Serum triglycerides determined colorimetrically with a enzyme that produces hydrogen peroxide. **Clinical Chemistry**, v. 28, n.10, p. 2077-2080, 1982.

FOULADI-NASHTA, A. A. et al. Impact of dietary fatty acids on oocyte quality and development in lactating dairy cows. **Biology of Reproduction**, v. 77, n.1, p. 9–17, 2007.

FOULADI-NASHTA, A. A. et al. Oocyte quality in lactating dairy cows fed on high levels of n-3 and n-6 fatty acids. **Reproduction**, v. 138, n.5, p. 771–781, 2009.

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

GRUMMER, R.R.; CARROLL, D.J. Effects of dietary fat on metabolic disorders and reproductive performance of dairy cattle. **Journal of Animal Science**., v. 69, n.9, p. 3838-3852, 1991.

GUARDIEIRO, M. M. et al. A diet enriched in linoleic acid compromises the cryotolerance of embryos from superovulated beef heifers. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 26, n.4, p. 511–520, 2014.

HAGGARTY, P. et al. Fatty acid metabolism in human preimplantation embryos. **Human Reproduction**, v. 21, n. 3, p. 766-773, 2006.

HAWKINS, D.E. et al. An increase in serum lipids increases luteal lipid content and alters the disappearance rate of progesterone in cows. **Journal of Animal Science**, v.73, n.2, p. 541-545, 1995.

HENDERSON, C.R. Sire evaluation and genetic trends. **Journal of Animal Science**, p. 10-41, 1973.

HIGHTSHOE, R.B. et al. Effects of calcium soaps of fatty acids on postpartum reproductive function in beef cows. **Journal of Animal Science**, v.69, n.10, p.4097-4103, 1991.

HOUGHTON, P. L. et al. Prediction of postpartum beef cow body composition using weight to height ratio and visual body condition score. **Journal of Animal Science**, v. 68, n.5, p. 1428-1437, 1990.

JUCHEM, S.O. et al. Supplementation with calcium salts of linoleic and trans-octadecenoic acids improves fertility of lactating dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n.1, p. 55–62, 2010.

KARUNOJEEWA, H.; THAM, S.H.; ABU - SEREWA, S. Sunflower seed meal, sunflower oil and full-fat sunflower seeds, hulls and kernels for laying hens. **Animal Feed Science Technology**, v. 26, n. 1/2, p. 45-54, 1989.

KENNEDY, L. G.; BOLAND, M.P.; GORDON, I. The effect of embryo quality at freezing on subsequent development of thawed cow embryos. **Theriogenology**, v. 19, n.6, p. 823-832, 1983.

KIM, J. Y. et al. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen–thawed immature and in vitro matured bovine oocytes. **Reproduction**, v. 122, n.1, p. 131–138, 2001.

KOJIMA, T. et al. Dietary administration of fatty acids-enriched mold dried cell containing α -linolenic acid to female pigs improves ovulation rate and embryo quality in summer. **Journal of Reproduction and Development**, v. 43, p. 121-127, 1997.

LAMMOGLIA, M. A. et al. Effects of dietary fat and season on steroid hormonal profiles before parturition and and hormonal, cholesterol, triglycerides, follicular pattern pattern, and postpartum reproduction in Brahman cows. **Journal of Animal Science**, v. 74, n.9, p. 2253-2262, 1996.

LAPA, M. et al. Effect of trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid on bovine oocyte competence and fatty acid composition. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n.5, p. 904-910, 2011.

LEÃO B. C. S. **Efeitos da suplementação lipídica sobre o desenvolvimento embrionário e criotolerância de embriões bovinos produzidos in vitro**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, 2012. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/98171>>. Acesso em: 03 nov. 2015.

LEITE, R. M. V. B. C.; BRIGHENTI, A. M.; CASTRO, C. (Ed.). **Girassol no Brasil**. Londrina: Embrapa Soja, 2005. 641p.

LEROY, J.L.M.R. et al. The effect of nutritionally induced hyperlipidaemia on *in vitro* bovine embryo quality. **Human Reproduction**, v. 25, p. 768-778, 2010.

LIM, J.M. et al. Development of in vitro-derived bovine embryos cultured in 5% de CO₂ in air or in 5% O₂, 5% de CO₂ and 90% N₂. **Human Reproduction**, v. 14, n. 2, p. 458-464, 1999.

LINDNER, G. M.; WRIGHT JUNIOR., R. W. Bovine embryo morphology and evaluation. **Theriogenology**, v. 20, n.4, p. 407-416, 1983.

LONERGAN, P. **Studies in the in vitro maturation, fertilization and cultive of bovine follicular oocytes**. 1992, 157f. Thesis (PhD) - National University of Ireland, Dublin, 1992.

LOPES, C. N. et al. Effects of rumen-protected polyunsaturated fatty acid supplementation on reproductive performance of Bos indicus beef cows. **Journal of Animal Science**, v. 87, n.12, p. 3935-3943, 2009.

LOPES, C. N. **Suplementação de gordura protegida na produção de progesterona, momento da luteólise e prenhez em vacas Nelore**. 2009. 61f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009.

LUCY, M. C. et al. Effect of feeding calcium soaps to early postpartum dairy cows on plasma prostaglandin F_{2α}, luteinizing hormone, and follicular growth. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n.2, p. 483-489, 1991.

MANDARINO, J. M. G. **Características bioquímicas e nutricionais do óleo e do farelo de girassol**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1992. 25p.

MAREI, W. F.; WATHES, D.C.; FOULADI-NASHTA, A.A. Impact of linoleic acid on bovine oocyte maturation and embryo development. **Reproduction Research**, v. 139, n.6, p. 979– 988, 2010.

MAREI, W.F.; WATHES, D.C.; FOULADI-NASHTA, A.A. The effect of linolenic acid on bovine oocyte maturation and development. **Biology of Reproduction**, v. 81, n.6, p.1064-1072, 2009.

MARQUES, L. T. et al. Fornecimento de suplementos com diferentes níveis de energia e proteína para vacas Jersey e seus efeitos sobre a instabilidade do leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n.12, n.12, p. 2724- 2730, 2010.

MATTOS, R. et al. The effects of feeding fish oil on uterine secretion of PGF 2α , milk composition, and metabolic status os periparturient Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n.8, p. 921-932, 2004.

MATTOS, R. et al. Uterine, ovarian, and production responses of lactating dairy cows to increasing dietary concentrations of Menhaden fish meal. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n.4, p. 755-764, 2002.

MATTOS, R.; STAPLES, C.R.; THATCHER, W.W. Effects of dietary fatty acids on reproduction in ruminants. **Reviews of Reproduction**, v. 5, n.1, p. 38-45, 2000.

NOGUEIRA, E. **Efeitos da suplementação energética e lipídica no perfil metabólico, desenvolvimento folicular e produção in vitro de embriões em novilhas da raça nelore (*Bos taurus indicus*)**. 2008. 87 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008a.

NOGUEIRA, M. Globalização na XXII Reunião Anual da SBTE. **Jornal O Embrião**, 2008b. Espaço Aberto, p.17-18. Disponível em:
<<http://www.sbte.org.br/?op=paginas&tipo=secao&secao=19&pagina=103>>
Acesso em: 06 mar. 2015.

PEREIRA, R.M. et al. Biopsied and vitrified bovine embryos viability is improved by trans10, cis12 conjugated linoleic acid supplementation during in vitro embryo culture. **Animal Reproduction Science**, v. 106, n.3/4, p. 322-332, 2008.

PETIT, H. V. Digestion, milk production, milk composition, and blood composition of dairy cows fed formaldehyde treated flaxseed or sunflower seed. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n.8, p. 2637-2646, 2003.

PETIT, H. V. et al. Quality of embryos produced from dairy cows fed whole flaxseed and the sucesso f embryo transfer. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n.12, p. 1786-1790, 2008.

PETIT, H. V., TWAGIRAMUNGU, H. Conception rate and reproductive function of dairy cows fed diferente fat sources. **Theriogenology**, v. 66, n.5, p. 1316-1324, 2006.

PETIT, H. V.; GERMIQUET, C.; LEBEL, D. Effect of feeding whole, unprocessed sunflower seed and flaxseed on milk production, milk composition, and prostaglandin secretion in dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v. 87, n.11, p. 3889-3898, 2004.

PONTES, J. et al. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, v. 71, n.4, p. 690-697, 2009.

PONTES, J. H. F. et al. Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donos. **Theriogenology**, v. 75, n.9, p. 1640-1646, 2011.

QUEIROGA, V. P.; DURÁN, J. M. Determinação da composição química em sementes e em ácidos graxos do óleo de seis genótipos de girassol. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 4.; SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE OLEAGINOSAS ENERGÉTICAS, 1., 2010, João Pessoa. **Inclusão Social e Energia: Anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2010. p. 2021-2024.

RAES, K.; DE SMET, S.; DEMEYER, D. Effect of dietary fatty acids on incorporation of long chain polyunsaturated fatty acids and conjugated linoleic acid in lamb, beef and pork meat: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 113, n.1-4, p. 199-221, 2004.

REDDY, P.V.; MORRILL, I.L.; NAGARAJA, T.G. Release of free fatty acids from raw or processed soybeans and subsequent effects on fiber digestibilities. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n.11, p. 3410-3416, 1994.

RHEINGANTZ, M. G. T. **Utilização da fecundação in vitro para a produção de embriões bovinos**, 2005. Disponível em:<http://minerva.ufpel.tche.br/~mgrheing/art_uso_fiv.hym>. Acesso em: 10 out. 2015.

ROBINSON, R. S. et al. Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on ovarian and uterine function in lactating dairy cows. **Reproduction**, v. 124, n.1, p. 119-131, 2002.

RYAN, D. P.; SPOON, R.A.; WILLIAMS, G.L. Ovarian follicular characteristics, embryo recovery, and embryo viability in heifers fed high fat diets and treated with follicle-stimulating hormone. **Journal of Animal Science**, v. 70, n.11, p. 3505-3513, 1992.

SANTOS J. E. P. et al. Long chain fatty acids of diet as factors influencing reproduction in cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, sup. 2, p. 23–30, 2008a.

SANTOS, J.E.P.; CERRI, R.L.A.; SARTORI, R. Nutritional management of the donor cow. **Theriogenology**, v.69, n.1, p.88-97, 2008b.

SARTORI, R.; GUARDIERO, M. M. Fatores nutricionais associados à reprodução da fêmea bovina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, sup. spec, p. 422-432, 2010.

SENEDA M. M. et al. Effect of follicle size on recovery, quality, and developmental competence of oocytes obtained *in vitro*. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 14., Stockholm, Sweden 2000. **Anais...** 2000, p.62.

SILVA, D. J.; QUEIROZ A. C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3. Ed. Viçosa: UFV, 2002. 166p.

SILVA, M. N. **A cultura do girassol**. Jaboticabal: FUNEP, 1990. 67p.

SIMAS, J. M. C. Como utilizar gordura em dieta de vacas leiteiras. **Revista Balde Branco**, v. 401, p. 26-30, 1998.

SOARES, S. R. V. **Metabolismo e digestão de lipídios em vacas leiteiras**. 2009. 43 f. Monografia (Especialização) - REHAGRO/NEWTON PAIVA, Belo Horizonte-MG, 2009.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES. **Jornal O Embrião**, 2015. Disponível em: <<http://itarget.com.br/newclients/sbte.org.br/2015/extras/embriao55.pdf>>. Acesso em: 7 nov. 2015.

SOLLENBERGER, L. E.; CHERNEY D. J. R. Evaluating forage production and quality. In: THE SCIENCE of grassland agriculture. Ames: Iowa State University Press, 1995. P. 97-110.

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

STAPLES, C.R. Aumento da taxa de prenhez em vacas leiteiras através da suplementação com gordura. **Anais**. Uberlândia, MG, p.91-103, 2009.

STUBINGS, R. B.; WALTON J. S. Effect of ultrasonically-guided follicle aspiration on estrous cycle and follicular dynamics in holstein cows. **Theriogenology**, v. 43, n.4, p. 705-712, 1995.

STURMEY, R. G. et al. Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, sup. 3, p. 50–58, 2009.

TELLES, M. M. **Caracterização dos grãos, torta e óleo de três variedades de girassol (*Helianthus annuus L.*) e estabilidade do óleo bruto**. 2006. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias- UFSC, Florianópolis- SC, 2006.

THANGAVELU, G. M. et al. Diets enriched in unsaturated fatty acids enhance early embryonic development in lactating Holstein cows. **Theriogenology**, v. 68, n.7, p. 949-957, 2007.

THATCHER, W. W. et al. Antiluteolytic signals between the conceptus and endometrium. **Theriogenology**, v. 47, n.1, p. 131-140, 1997.

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. **Journal of Animal Science**, v.75, n.9, p.2512-2519, 1997.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminants**. Ithaca: Cornell University, 1994. 476 p.

WATHES, D. C.; ABAYASEKARA, D.R.; AITKEN, R.J. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. **Biology of Reproduction**, v. 77, n.2, p. 190-201, 2007.

WEBB, R. et. al. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. **Journal Animal Science**, v.82, p.E63-E74, 2004.

WILKINS, J. F. et al. Protected lipid/protein supplement improves synchrony of oestrus and conception rate in beef cows. In: INTERNATIONAL CONGRESS IN ANIMAL REPRODUCTION, 13,1996, Sydney, Australia. **Anais...** 1996. p.19-29.

WILLIAMS, G. L. Modulation of luteal activity in postpartum beef cows through changes in dietary lipid. **Journal of Animal Science**, v. 67, n. 3, p. 785-793, 1989.

WILLIAMS, G. L.; STANKO R. L. Dietary fats as reproductive nutraceuticals in beef cattle. **Proceedings of the American Society of Animal Science**, 1999.

WILLIAMS, G.L. Suckling as a regulator of postpartum rebreeding in cattle: a review. **Journal of Animal Science**, v.68, n.3, p.831-852, 1990.

ZERON, Y. et al. Effect of polyunsaturated fatty acid supplementation on biophysical parameters and chilling sensitivity of ewe oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, n.2, p. 271–278, 2002.

ZERON, Y.A. et al. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. **Reproduction**, v. 121, n.3, p. 447-454, 2001.