

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM FONTES DE ÁCIDOS
GRAXOS EM DOADORAS DAS RAÇAS HOLANDESA E
NELORE DURANTE O PRÉ E PÓS-PARTO, SOBRE O
RETORNO À CICLICIDADE E PRODUÇÃO *in vitro* DE
EMBRIÕES**

Guilherme Fazan Rossi

Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

2013

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM FONTES DE ÁCIDOS
GRAXOS EM DOADORAS DAS RAÇAS HOLANDESA E
NELORE DURANTE O PRÉ E PÓS-PARTO, SOBRE O
RETORNO À CICLICIDADE E PRODUÇÃO *in vitro* DE
EMBRIÕES**

GUILHERME FAZAN ROSSI

ORIENTADOR: PROF. DR. JOAQUIM MANSANO GARCIA

CO-ORIENTADOR: DR. FÁBIO MORATO MONTEIRO

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

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

2013

Ross, Guilherme Fazan
R832e Efeitos da suplementação com fontes de ácidos graxos em
doadoras das raças holandesa e nelore durante o pré e pós-
parto, sobre o retorno à ciclicidade e produção *in vitro* de
embriões / Guilherme Fazan Rossi. -- Jaboticabal, 2013
x, 84 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013
Orientador: Joaquim Mansano Garcia
Co-orientador: Fabio Morato Monteiro
Banca examinadora: Gisele Zoccal Mingoti, Ricarda Maria
dos Santos
Bibliografia

1. Ácidos graxos poliinsaturados. 2. Embriões. 3. Oócitos.
4. Pós-parto. 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: guilhermemedvet@yahoo.com.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM FONTES DE ÁCIDOS GRAXOS EM DOADORAS DAS RAÇAS HOLANDESA E NELORE DURANTE O PRÉ E PÓS-PARTO, SOBRE O RETORNO A CICLICIDADE E PRODUÇÃO *in vitro* DE EMBRIÕES

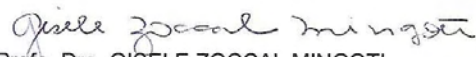
AUTOR: GUILHERME FAZAN ROSSI

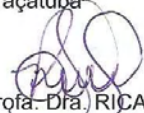
ORIENTADOR: Prof. Dr. JOAQUIM MANSANO GARCIA

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. FABIO MORATO MONTEIRO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: REPRODUÇÃO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. FABIO MORATO MONTEIRO
Instituto de Zootecnia / Sertãozinho/SP


Profa. Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba


Profa. Dra. RICARDA MARIA DOS SANTOS
Universidade Federal de Uberlândia / Uberlândia/MG

Data da realização: 27 de fevereiro de 2013.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

GUILHERME FAZAN ROSSI – nascido em Jaboticabal-SP, aos 08 dias do mês de novembro de 1985. Ingressou no curso de Graduação em Medicina Veterinária, na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia – UFU, em agosto de 2005. Concluiu o ensino superior em Medicina Veterinária em julho de 2010. Durante a graduação realizou Iniciação Científica durante três anos, sob orientação da Prof^a. Dagmar Diniz Cabral, junto ao Departamento de Parasitologia, com bolsa do CNPq/UFU, referentes aos projetos nº B-001/2006, B-001/2007 e B-003/2008. Ingressou no curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, nível de mestrado, área de Reprodução Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Câmpus de Jaboticabal-SP, em março de 2011, sob a orientação do Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia, com bolsa da CAPES. Aprovado no exame de seleção para o curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária (Reprodução Animal), nível de Doutorado na mesma instituição, em novembro de 2012, com início previsto para março de 2013.

Dedico este trabalho:

Em primeiro lugar a Deus, por simplesmente TUDO.

Aos meus pais, Oswaldo Durival Rossi Junior e Maria Angélica F. Fazan Rossi, pelo amor e incentivo a cada etapa da minha vida.

Á minha irmã Marita Fazan Rossi por me apoiar sempre.

Vocês são muito importantes

Amo muito todos vocês

AGRADECIMENTOS

À minha família: pela dedicação, amor, paciência e carinho.

Aos meus pais, Oswaldo Durival Rossi Junior e Maria Angélica Ferrarini Fazan Rossi pelo amor incondicional e total confiança nas minhas escolhas e no meu trabalho, sem a ajuda de vocês nada disso teria sido realizado.

à minha Irma, Marita Fazan Rossi pelo amor e carinho.

Ao orientador Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia, pelas oportunidades, apoio, confiança, paciência, amizade e pelos inúmeros e valiosos ensinamentos.

Ao co-orientador Dr. Fábio Morato Monteiro, pela ajuda, apoio, confiança e amizade.

Às Veterinárias e colegas de pós-graduação Marina Ragagnin de Lima, Maite del Collado e Naiara Zoccal Saraiva pelo enorme apoio nos trabalhos de campo e laboratoriais.

À funcionária Roberta Vantini pela enorme ajuda nos trabalhos de campo e laboratoriais.

Aos Veterinários e colegas de pós-graduação Aderson Ifran, Marcus Feliciano e Roberta Gaspar pela ajuda nos trabalhos.

Aos Professores Alex Sandro Campos Maia, Gener Tadeu Pereira e João Ademir de Oliveira pela orientação e colaboração nas análises estatísticas.

Aos pesquisadores do Instituto de Zootecnia de Sertãozinho – SP, Enilson, Renata e Maria Eugênia, pela confiança e apoio no experimento.

Aos proprietários e amigos do Sítio Boa Esperança em Irapuã – SP, Denis e Antonio Perozin, pelo ajuda e confiança no experimento.

Aos funcionários e amigos do Instituto de Zootecnia de Sertãozinho – SP e do Sítio Boa Esperança em Irapuã – SP sem vocês a execução destes experimentos não seria possível.

Aos amigos e colegas de Pós-Graduação pela colaboração, ajuda durante o experimento e companheirismo em todos os momentos.

À todos os estagiários pela colaboração durante o experimento e companheirismo.

Aos professores e funcionários do Departamento de Reprodução Animal e da UNESP de Jaboticabal.

À todos os meus amigos pelo apoio e companheirismo nos bons e maus momentos.

À CAPES pela bolsa de estudo.

Ao Laboratório de Biotecnologia em Reprodução Animal – Bioklone e seus funcionários pelo apoio na realização do experimento.

À UNESP – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal – SP, em especial, ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal e a Pós-Graduação pela oportunidade de me permitir cursar o Mestrado. Serei sempre grato.

À Profa. Dra. Lindsay Unno Gimenes e a Dra. Naiara Zoccal Saraiva componentes da banca examinadora de qualificação pela colaboração.

Às Profa. Dra. Gisele Zoccal Mingoti e Ricarda Maria dos Santos componentes da banca examinadora pela disponibilidade e colaboração.

Às pessoas que colaboraram de alguma forma no decorrer desse estudo, e que por ventura eu tenha esquecido...

A todos meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....	1
1. Introdução.....	1
2. Revisão de literatura.....	3
2.1. Técnica da aspiração folicular transvaginal (OPU)	3
2.2. Produção <i>in vitro</i> de embriões (PIVE).....	5
2.3. Fisiologia entre fêmeas zebuínas e taurinas.....	7
2.4. Fisiologia do puerpério.....	7
2.5. Interação entre reprodução e nutrição.....	9
2.6. Influência da suplementação com ácidos graxos na reprodução dos ruminantes.....	10
3. Referências.....	13
CAPÍTULO 2.....	23
EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM FONTES DE ÁCIDOS GRAXOS EM DOADORAS PRIMÍPARAS DA RAÇA NELORE DURANTE O PRÉ E PÓS-PARTO SOBRE O RETORNO À CICLICIDADE, PRODUÇÃO <i>in vitro</i> DE EMBRIÕES E TAXA DE GESTAÇÃO	
RESUMO.....	23
1. Introdução.....	24
2. Hipóteses.....	26
3. Objetivos.....	26
3.1. Geral.....	26
3.2. Específicos.....	27
4. Material e Métodos.....	27
4.1. Local.....	27
4.2. Doadoras de oócitos.....	27
4.3. Tratamento e Delineamento experimental	28
4.4. Quantificação do número de folículos, presença de CL e concentração de progesterona (P ₄) plasmática.....	30
4.5. Técnica de Aspiração Folicular	31
4.6. Lavagem, seleção e transporte dos oócitos.....	32
4.7. Produção <i>in vitro</i> de embriões (PIVE).....	33
4.8. Taxa de gestação das doadoras.....	34

4.9. Análise estatística.....	34
5. Resultados.....	36
6. Discussão.....	42
7. Conclusões.....	45
8. Referências.....	46
CAPÍTULO 3.....	51
EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM FONTES DE ÁCIDOS GRAXOS EM DOADORAS DA RAÇA HOLANDESA DURANTE O PRÉ E PÓS-PARTO SOBRE O RETORNO À CICLICIDADE, PRODUÇÃO <i>in vitro</i> DE EMBRIÕES E TAXA DE GESTAÇÃO	
RESUMO.....	51
1. Introdução.....	52
2. Hipóteses.....	54
3. Objetivos.....	54
3.1. Geral.....	54
3.2. Específicos.....	54
4. Material e Métodos.....	55
4.1. Local.....	55
4.2. Doadoras de oócitos.....	55
4.3. Tratamento e Delineamento experimental	56
4.4. Quantificação do número de folículos, presença de CL e concentração de progesterona (P ₄) plasmática.....	58
4.5. Técnica de Aspiração Folicular	59
4.6. Lavagem, seleção e transporte dos oócitos.....	60
4.7. Produção <i>in vitro</i> de embriões (PIVE).....	61
4.8. Taxa de gestação das doadoras.....	62
4.9. Transferência dos embriões.....	62
4.10. Análise estatística.....	63
5. Resultados.....	64
6. Discussão.....	71
7. Conclusões.....	74
8. Referências.....	75
APÊNDICES.....	81
Apêndice 1: Quantidade de Megalac-E [®] na dieta para fêmeas da raça Nelore no pós-parto.....	81
Apêndice 2: Quantidade de Megalac-E [®] na dieta para fêmeas da raça Holandesa no pós-parto.....	81
Apêndice 3: PBS Completo.....	82
Apêndice 4: Meio maturação dos oócitos.....	82
Apêndice 5: Meio TL-Sêmen.....	82
Apêndice 6: Meio FIV gotas.....	82
Apêndice 7: Solução de Percoll 90%.....	83
Apêndice 8: Meio SOFaa.....	83
Apêndice 9: Meio HSOF.....	84

LISTA DE TABELAS

TABELAS	página
<u>CAPÍTULO 2</u>	
1. Composição nutricional e análise bromatológica das dietas utilizadas no experimento para doadoras primíparas da raça Nelore.....	29
2. Análise cromatográfica das dietas utilizadas no experimento para doadoras primíparas da raça Nelore.....	29
3. Valores de P para efeitos principais de tratamento alimentar, dias de aspirações e interação entre esses fatores.....	36
4. Efeito da suplementação com Megalac-E [®] e linhaça na quantidade de oócitos aspirados e na PIVE de doadoras primíparas da raça Nelore (Média de todas as aspirações ± erro padrão).....	39
<u>CAPÍTULO 3</u>	
1. Composição nutricional e análise bromatológica das rações utilizadas no experimento para doadoras da raça Holandesa.....	57
2. Análise cromatográfica das rações utilizadas no experimento para doadoras da raça Holandesa.....	57
3. Valores de P para efeitos principais de tratamento alimentar, dias de aspirações e interação entre esses fatores.....	64
4. Efeito da suplementação com Megalac-E [®] e linhaça na quantidade de oócitos aspirados e na PIVE de doadoras da raça Holandesa (Média de todas as aspirações ± erro padrão).....	67

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS	Página
<u>CAPÍTULO 2</u>	
1. Composição de ácido linoleico (n-6) e ácido linolênico (n-3) nas dietas dos grupos experimentais para doadoras primíparas da raça Nelore.....	30
2. Representação esquemática do protocolo experimental de alimentação e aspiração para doadoras primíparas da raça Nelore	31
3. Efeitos da interação da suplementação com Megalac-E [®] e linhaça com os dias de aspiração pós-parto no número de folículos visualizados (A), quantidade de oócitos totais (B), de oócitos viáveis (C) e taxa de oócitos viáveis (D; quantidade de oócitos viáveis/total de oócitos) em doadoras primíparas da raça Nelore (média; P > 0,05).....	37
4. Efeitos da interação da suplementação com Megalac-E [®] e linhaça com os dias de aspiração pós-parto na quantidade de estruturas clivadas (A), na PIVE (B) e taxa de produção de embriões (C) de doadoras primíparas da raça Nelore (média; P > 0,05).....	38
5. Efeito dos dias pós-parto no momento da aspiração de doadoras primíparas da raça Nelore sobre as variáveis: A - número de folículos, quantidade de oócitos totais, de oócitos viáveis e na PIVE. B - taxa de oócitos viáveis (viáveis/total de oócitos) e taxa de produção de embriões (nº de embriões produzidos/oócitos viáveis; Média; P>0,05).....	40
6. A - Número de doadoras primíparas da raça Nelore que apresentaram CL na interação entre os dias pós-parto no momento das aspiração e os tratamentos de suplementação. B - Taxa de doadoras que apresentaram CL (taxa de doadoras com CL/número total de doadoras) por tratamento alimentar durante todas as aspirações. C - Média de concentração de P ₄ na terceira aspiração (60 dias pós-parto) por grupos de suplementação (P>0,05).....	41
7. Taxa de gestação (número de doadoras gestantes/total de animais/tratamento) das doadoras primíparas da raça Nelore após a estação de monta (P>0,05).	42
<u>CAPÍTULO 3</u>	
1. Composição de ácido linoleico (n-6) e ácido linolênico (n-3) nas dietas dos grupos experimentais para doadoras da raça Holandesa.....	58
2. Representação esquemática do protocolo experimental de alimentação	

e aspiração para doadoras da raça Holandesa.....	59
3. Representação esquemática do protocolo hormonal para sincronização das receptoras	62
4. Efeitos da interação da suplementação com Megalac-E® e linhaça com os dias de aspiração pós-parto no número de folículos visualizados (A), quantidade de oócitos totais (B), de oócitos viáveis (C) e taxa de oócitos viáveis (D; quantidade de oócitos viáveis/total de oócitos) em doadoras da raça Holandesa (média; P > 0,05).....	65
5. Efeitos da interação da suplementação com Megalac-E® e linhaça com os dias de aspiração pós-parto na quantidade de estruturas clivadas (A), na PIVE (B; P>0,05) e taxa de produção de embriões (C; P=0,0018) de doadoras da raça Holandesa.....	66
6. Efeito dos dias pós-parto no momento da aspiração de doadoras da raça Holandesa sobre as variáveis: A - número de folículos, quantidade de oócitos totais, de oócitos viáveis, de clivagem e na PIVE. B - taxa de oócitos viáveis (viáveis/total de oócitos) e taxa de produção de embriões (nº de embriões produzidos/oócitos viáveis; Média; P>0,05).....	68
7. A - Taxa de doadoras que apresentaram CL (taxa de doadoras com CL/número total de doadoras) por tratamento de suplementação por dias pós-parto. B - Média de concentração de P₄ da interação entre os grupos de suplementação e os dias pós-parto. C – Média geral de concentração de P₄ por grupos de suplementação. D - Média geral de concentração de P₄ por dias pós-parto de doadoras da raça Holandesa (P>0,05).....	69
8. Taxa de gestação (número de doadoras gestantes/total de animais/tratamento) das doadoras da raça Holandesa (P>0,05).	70
9. Taxa de gestação das receptoras (número de receptoras gestantes/total de embriões transferidos/tratamento; P>0,05).....	70

LISTA DE ABREVIATURAS

µg = Micrograma
µL = Microlitro
µM = Micromol
AGPs = Ácidos graxos poliinsaturados
AGs = Ácidos graxos
BE = Benzoato de estradiol
BEN = Balanço energético negativo
BSA = Albumina Sérica Bovina
CIV = Cultivo *in vitro*
CL = Corpo lúteo
CO₂ = Dióxido de carbono
COCs = Complexo *cumulus*-oócitos
dp = desvio padrão
E₂ = Estradiol
ECC = Escore da condição corporal
EM = Estação de Monta
FCAV = Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária
FIV = Fecundação *in vitro*
fol = Folículo
FSH = Hormônio folículo estimulante
g = Grama
hCG = Gonadotrofina coriônica humana
HDL = Lipoproteína de alta densidade
HSOF = meio "*Sintetic oviduct fluid*" com tampão Hepes
IA = Inseminação Artificial
IATF = Inseminação Artificial em Tempo Fixo
IGF-I = Insulin-like growth factor 1
IVPE = *in vitro* production of embryos
IZ = Instituto de Zootecnia
kg = kilogramas
L = Litro
LDL = Lipoproteína de baixa densidade
LH = Hormônio luteinizante
Log = logaritmo
m = metro
M = mol
mg = Miligramas
MHz = Mega hertz
MIV = Maturação *in vitro*

mL = Mililitros
mm = Milímetros
mM = Miliomol
mmHg = Milímetros de mercúrio
n-3 = Ácido linolênico - ômega 3
n-6 = Ácido linoleico – ômega 6
ng/mL = Nanograma/Mililitro
N^o = Número
O₂ = Oxigênio
OPU =(ovum pick-up) – Aspiração Folicular
P₄ = Progesterona
PBS = Tampão fosfato salina
PGF_{2α} = Prostaglandina F_{2α}
PGF_{3α} = Prostaglandina F_{3α}
PGs = Prostaglandinas
pH = Potencial Hidrogeniônico
PIVE =Produção *in vitro* de embriões
PUFA = polyunsaturated fatty acids
SFB = Soro fetal bovino
SOF = “*Sintetic oviduct fluid*”
SOV = Superovulação
TCM 199 = “*Tissue culture medium 199*”
TE = Transferência de embrião
UI = Unidade internacional
UI/L = Unidade Internacional/Litro

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM FONTES DE ÁCIDOS GRAXOS EM DOADORAS DAS RAÇAS HOLANDESA E NELORE DURANTE O PRÉ E PÓS-PARTO SOBRE O RETORNO À CICLICIDADE E PRODUÇÃO *in vitro* DE EMBRIÕES

RESUMO – As suplementações de bovinos com fontes de ácidos graxos poliinsaturados (AGPs) são formas de aumentar o nível energético das dietas, além de possuir efeito na reprodução dos ruminantes. Tendo em vista o exposto idealizou-se o presente trabalho com o objetivo de avaliar as condições reprodutivas do pós-parto, número de folículos, quantidade de oócitos totais, de viáveis e a PIVE de doadoras primíparas da raça Nelore (Experimento 1) e múltíparas da raça Holandesa (Experimento 2) suplementadas com dieta rica em AGPs protegido (Megalac-E[®], principalmente de n-6) e não protegido (Linhaça, principalmente de n-3) durante o pré e pós-parto. No experimento 1 as doadoras Nelore foram divididas aleatoriamente em 3 grupos, sendo que o grupo controle apresentou 7 fêmeas, o segundo grupo, com 8 animais que foram suplementados com uma fonte de gordura protegida contendo 100g/doadora/dia de Megalac-E[®] e o terceiro grupo com 7 fêmeas suplementadas com uma fonte de gordura não protegida contendo 1kg/doadora/dia de torta de linhaça. As dietas foram fornecidas por 30 dias pré-parto e 75 dias pós-parto. Estes animais foram submetidos à OPU nos dias 30, 45, 60 e 75 pós-parto. No experimento 2 as doadoras Holandesa foram divididas aleatoriamente em 3 grupos, sendo que o grupo controle apresentava 6 fêmeas, o segundo grupo, com 5 animais que foram suplementados com uma fonte de gordura protegida contendo 100g/doadora/dia de Megalac-E[®] no pré-parto e 300g/doadora/dia no pós-parto e o terceiro grupo com 5 fêmeas suplementadas com uma fonte de gordura não protegida contendo 1kg/doadora/dia de torta de linhaça no pré-parto e 1,5kg/doadora/dia no pós-parto. As dietas foram fornecidas por 30 dias pré-parto e 60 dias pós-parto. Estes animais foram submetidos à OPU nos dias 30, 45 e 60 pós-parto. Os oócitos recuperados dos dois experimento foram selecionados e os viáveis submetidos aos procedimentos da PIVE. Os dados foram analisados pelo método dos quadrados mínimos utilizando Análise de Variância pelo proc GLM. As diferenças entre médias foram comparadas pelo teste de Tukey com significância de 5%. Experimento 1) Não foi detectado efeito de tratamento de suplementação, de dias de aspirações pós-parto e das interações sobre as variáveis: número de folículos, quantidade de oócitos totais, de oócitos viáveis, taxa de oócitos viáveis, número clivagem, PIVE, taxa de embriões produzidos, presença de CL, concentração de P₄ e taxa de doadoras gestantes. Experimento 2) Não foi detectado efeito de tratamento de suplementação, de dias de aspirações pós-parto e das interações sobre as variáveis: quantidade de oócitos viáveis, taxa de oócitos viáveis, número de clivagem, de PIVE, taxa de doadoras com CL, concentração de P₄ e taxa de doadoras gestantes. No entanto, foi observado maior número de folículos e de oócitos totais no grupo suplementado com linhaça em relação ao grupo Megalac-E[®]. Este resultado pode ser explicado pelo efeito individual nos animais. A taxa de produção de embriões no dia 45 pós-parto do grupo controle foi maior em relação ao dia 30 do controle e ao dia 45 do grupo alimentado com Megalac-E[®]. Uma razão para esse resultado é as diferentes fases do ciclo estral que estes animais se encontravam nesses dias pós-parto. Assim, é necessário mais estudos com maior

número de doadoras e diferentes fontes de gordura para testar a real influência dos AGPs na reprodução de fêmeas.

Palavra chave: Ácidos graxos poliinsaturados, embriões, Holandesa, Nelore, oócitos e pós-parto.

EFFECTS OF FATTY ACID SUPPLEMENTATION IN HOLSTEIN AND NELORE COWS DURING THE PRE AND POSTPARTUM PERIOD, ON CYCLICALITY RETURN AND *in vitro* PRODUCTION OF EMBRYOS

ABSTRACT – The supplementation of cattle with sources of polyunsaturated fatty acids (PUFA) are ways to increase the energy level of the diet, in addition to having effect on reproduction. The aim of this study were to evaluate the reproductive conditions of the postpartum, number of follicles, aspirates oocytes, amount of viable oocytes and the IVPE of the Nelore primiparous donors (Experiment 1) and Holstein multiparous donors (Experiment 2) supplemented with rich diet in protected PUFA (Megalac-E[®]) and non-protected (Linseed) during pre and postpartum. In experiment 1 Nelore donors were divided into three groups, the control group with 7 animals, the second group, with 8 animals were supplemented with a source of protected fat contains 100g/donor/day of Megalac-E[®] and the third group with 7 animals supplemented with a source of unprotected fat contains 1kg/donor/day linseed. The diets were fed for antepartum thirty days and postpartum seventy-five days. These animals were submitted to OPU on days 30, 45, 60 and 75 postpartum. In Experiment 2 Holstein donors were divided into three groups, the control group with 6 animals the second group, with 5 animals were supplemented with a source of protected fat contains 100g/donor/day of Megalac-E[®] in pre-partum and 300g/donor/day in postpartum and the third group with 5 animals supplemented with a source of fat unprotected contains 1kg/donor/day linseed pre-partum and 1.5 kg/donor/day in postpartum. The diets were fed for antepartum thirty days and postpartum sixty days. These animals were submitted to OPU on days 30, 45 and 60 postpartum. The recovered oocytes from both experiments were selected and the viable oocytes were submitted to procedures of the IVPE. The data from both experiments were analyzed by the method of least squares using variance analysis of proc GLM. The differences between means were compared by Tukey test with 5% significance. Experiment 1) There was no detectable effect of treatment, aspirations of postpartum days and interactions on variables: for number of follicles and Corpus Luteum presence and amount of total and viable oocytes and IVPE ($P>0.05$). Experimento 2) There was no detectable effect of treatment, aspirations of postpartum days and interactions on variables: CL presence, amount of viable oocytes and IVPE ($P>0.05$). However, The group supplemented with linseed was observed more follicles and total oocytes than group Megalac-E[®] ($P<0.05$). This result can be explained by the effect of animals individual. The production of embryos rate at day 45 postpartum in the control group was higher to the day 30 of the control and to day 45 of the group fed Megalac-E[®]. The results of this study demonstrate that aspiration performed in postpartum the donors supplemented with Megalac-E and linseed didn't increase the number of follicles and CL presence and amount of total and viable oocytes and IVPE. Thus, more studies are needed with higher numbers of donors and different fat sources to test the real influence of PUFA in females' reproduction.

Keyword: Polyunsaturated fatty acids, embryo, Holstein, Nelore, oocytes and postpartum.

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM FONTES DE ÁCIDOS GRAXOS EM DOADORAS DAS RAÇAS HOLANDESA E NELORE DURANTE O PRÉ E PÓS-PARTO, SOBRE O RETORNO A CICLICIDADE E PRODUÇÃO *in vitro* DE EMBRIÕES

1. Introdução

A bovinocultura brasileira é um dos principais destaques do agronegócio mundial. O Brasil possui o segundo maior rebanho de bovinos do mundo, com mais de 185 milhões de cabeças em 2012, um acréscimo de 2,9% em relação a 2011, estando atrás apenas da Índia que possui 327 milhões. Porém, é o primeiro país em rebanho comercial. Além disso, é o segundo maior produtor de carne bovina, estando atrás dos Estados Unidos, e o maior exportador mundial deste produto. Na produção de leite, o Brasil ocupa a 6ª colocação, com produção de cerca de 30 bilhões de litros, atrás da União Européia, Índia, EUA, China e Rússia (ANUALPEC, 2012).

Para acelerar o crescimento da pecuária brasileira, é necessário o desenvolvimento e aprimoramento das biotécnicas ligadas à reprodução animal, com o intuito de incrementar a exploração dos animais geneticamente superiores, destinados tanto para a produção de carne quanto para a produção de leite. O incremento desta produção visa refletir na geração de maior número de descendentes em menor tempo (LEEMPUT et al., 1999).

Assim, a biotécnica de produção *in vitro* de embriões (PIVE) associada à recuperação de oócitos por aspiração folicular transvaginal guiada por ultra-som (OPU) (LEEMPUT et al., 1999) surgiu como uma excelente alternativa para maximizar a produção de embriões com alto mérito genético (GARCIA et al, 2003; CAMARGO et al., 2006). A PIVE é considerada a terceira geração das biotécnicas aplicadas ao melhoramento genético, após a inseminação artificial (IA) ou inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e a transferência de embriões (TE). Comparando as três biotécnicas, tem-se para a IA o resultado de apenas um

bezerro por vaca/ano; no caso da TE, pode-se obter de 20 a 25 bezerros por vaca/ano; entretanto com a PIVE, este número aumenta para 80 a 100 bezerros por vaca/ano (LEEJW, 2006). Portanto, conclui-se que a PIVE apresenta grande vantagem para a pecuária em relação ao número de bezerros nascidos por vaca/ano.

Além disso, a PIVE pode ser aplicada em fêmeas portadoras de patologias reprodutivas adquiridas, além de fêmeas a partir dos seis meses de idade, gestantes (até o 3º mês), no período pós-parto (2 a 3 semanas) (GARCIA et al., 2003) e em fêmeas abatidas. No entanto, mesmo com os progressos obtidos nos processos de maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) para o desenvolvimento embrionário, esta técnica ainda apresenta alguns obstáculos que precisam ser melhorados. Como exemplo, podemos citar resultados ainda não satisfatórios de produção de estruturas viáveis para transferência, dificuldade na criopreservação dos embriões, aumento na incidência de abortos, gestação prolongada, anormalidades congênitas e maior mortalidade perinatal (GARCIA et al., 2003).

As taxas de sucesso na produção de blastocistos são de aproximadamente 30 a 45% a partir de oócitos maturados *in vitro*, e as taxas de gestação, ao redor de 40 a 60% após a inovulação (KANE, 2003). Neste contexto, o manejo nutricional das doadoras representa importante ferramenta para adiantar a ciclicidade no período pós-parto, melhorar a qualidade dos oócitos e a quantidade de embriões produzidos *in vitro*. Rizo et al. (2002) observaram que a taxa de blastocistos produzidos *in vitro* está diretamente relacionada com a qualidade dos oócitos utilizados.

Incrementos nutricionais nas dietas das fêmeas bovinas podem afetar positivamente o desenvolvimento e a função dos órgãos reprodutivos, além de promoverem alterações no funcionamento do sistema endócrino envolvido com a reprodução (MAGGIONI et al., 2008). Os ácidos graxos poliinsaturados (AGPs), principalmente o ácido linolênico (n-3) e linoleico (n-6) têm importante efeito sobre os processos reprodutivos, como crescimento folicular ovariano, função do corpo lúteo (CL), produção de progesterona, ovulação, e manutenção da gravidez e do parto (ABAYASEKARA; WATHES, 1999).

A suplementação da dieta com gorduras (n-3 e n-6) ajuda a repor os ácidos graxos essenciais perdidos, importantes no desempenho reprodutivo por terem diversas ações, tais como serem precursores das prostaglandinas (PGs) (PETIT et al., 2002) e atuarem no CL, oócitos, embriões e na secreção de LH e dos hormônios esteróides (WATHES et al., 2007). A estratégia de suplementação com AGPs para vacas de leite e corte no período pré-parto é uma dieta rica em n-6, que aumenta a síntese de $PGF_{2\alpha}$ e atua no crescimento folicular, além de melhorar a involução uterina e restabelecer a ciclicidade precocemente. E no pós-parto, com n-3, que reduz a síntese de $PGF_{2\alpha}$ uterina, aumentando a fertilidade e diminuindo as perdas embrionárias precoces (SARTORI; MOLLO, 2007; SANTOS et al., 2008).

Vacas de alta produção de leite e primíparas de corte são as categorias animais com maior dificuldade reprodutiva no período pós-parto. Assim, a proposta desse estudo foi avaliar o adiantamento do retorno da ciclicidade, a quantidade de oócitos obtidos e a taxa de produção *in vitro* de embriões no período pós-parto de doadoras da raça Holandesa e primíparas Nelore suplementadas com dieta rica em gordura protegida n-6 e n-3, feito a partir de óleo de soja saponificado (sais de cálcio) para proteção dos AGPs de cadeia longa (NRC, 2007), e da alimentadas com dieta rica em gordura não protegida (torta de linhaça rica principalmente em n-3) no pré e pós-parto.

2. Revisão de Literatura

2.1. Técnica da aspiração folicular transvaginal (OPU)

A técnica de aspiração folicular transvaginal de oócitos bovinos (OPU - *ovum pick-up*) guiada por ultra-som (PIETERSE et al., 1988) é uma ferramenta para aumentar o número de descendentes de uma doadora (LEEMPUT et al., 1999). A OPU-PIVE possibilita a obtenção de até 18 gestações em três meses, enquanto com a SOV-TE no mesmo período, apenas 5 gestações. Desta forma, pela OPU-PIV é possível produzir 2 a 3 vezes mais embriões por unidade de tempo quando comparado à TE convencional (NIBART et al., 1995).

Outras vantagens da aspiração folicular são a obtenção de oócitos em qualquer fase do ciclo estral sem tratamento gonadotrófico (MERTON et al., 2003), possibilitando realizar repetidas recuperações de oócitos de animais vivos sem trauma aparente do trato reprodutivo permitindo, desta forma, a produção de embriões oriundos de vacas recém paridas (GARCIA et al., 2003), de vacas senis, com patologias reprodutivas adquiridas (GARCIA et al., 1999), prenhes com até 3 meses de gestação (BUNGARTZ et al., 1995) e em novilhas pré-púberes (BROGLIATTI, 1996). Outra vantagem particular da OPU-FIV em relação às outras biotecnologias é a utilização de oócitos de animais recém abatidos (HOSHI, 2003) e a maximização do uso do sêmen, permitindo maior produção de embriões com doses de alto valor genético e inclusive sêmen sexado (DELL'AQUA et al., 2006; HAYAKAWA et al., 2009).

O sucesso da OPU é avaliado parcialmente pela taxa de recuperação de oócitos. Esta, por sua vez, é influenciada pela visualização dos folículos pelo ultrassom, pelo diâmetro, bisel e corte da agulha, vácuo exercido pela bomba de aspiração (BOLS et al., 2005) e experiência do operador (LANSBERGEN et al., 1995). Além dos fatores técnicos, existem os fatores biológicos como a frequência e momento da aspiração folicular, fisiologia, condição corporal, raça e idade da doadora (BOLS et al., 2005). De fato, estes fatores são reflexos do estágio do ciclo estral, da qualidade reprodutiva, do estado nutricional e dos efeitos do ambiente.

Buscando obter maior número de embriões em curto espaço de tempo, os protocolos têm geralmente consistido de uma ou duas aspirações semanais usando animais superovulados ou não (ROOVER et al., 2005; SENEDA et al., 2005). Embora a aspiração realizada 2 vezes por semana aumente o número de folículos, oócitos recuperados e embriões produzidos (GIBBONS, et al., 1994), a alta frequência e o curto intervalo entre as aspirações afeta negativamente o número de oócitos a longo prazo (BOUSQUET et al., 1999).

Os oócitos aspirados são selecionados através do número de camadas do cumulus que são células da granulosa que circundam os oócitos no interior dos folículos. A proximidade entre as células do cumulus com o oócito aumenta o potencial de maturação, fecundação e da capacidade de desenvolvimento embrionário (GONÇALVES et al., 2008). Estes são classificados com escala de I a

V, segundo De Loss et al. (1991), sendo os de graus I, II e III utilizados para o processo de PIVE.

Entretanto, os índices de produção *in vitro* de embriões bovinos são baixos. Isto se deve pela qualidade ruim dos oócitos aspirados, pela baixa qualidade biológica dos embriões, dificuldades na criopreservação dos embriões e dos oócitos e custo elevado em relação ao embrião produzido pela TE convencional (PEIXER et al., 1995).

2.2. Produção *in vitro* de embriões (PIVE)

Atualmente, o processo de PIVE na espécie bovina é o que apresenta maior sucesso dentre todas as espécies, sendo que em média 40% dos oócitos maturados e fecundados *in vitro* podem se desenvolver até o estágio de blastocisto (HASLER, 1998; BAVISTER, 2002).

A PIVE é um instrumento auxiliar no melhoramento animal e uma ferramenta com potencial para a formação de bancos de germoplasma na preservação de animais ameaçados de extinção (FOOTE, 1996). Entretanto, existem limitações relacionadas à baixa eficiência na produção de blastocistos a partir dos oócitos que são submetidos à maturação *in vitro* e à variabilidade do processo (CAROLAN et al., 1995; LIU; FOOTE, 1995). Além disso, os embriões PIV possuem menor viabilidade e menor resistência à vitrificação em relação a TE convencional (GALLI; LAZZARI, 1996; HASLER, 1996).

A maturação oocitária é definida como a retomada da meiose, formação do primeiro corpúsculo polar e de várias outras alterações nucleares e citoplasmáticas. O desenvolvimento oocitário é bloqueado em metáfase II. O tempo da maturação é de 24 horas na maioria dos processos (GORDON, 1994; CHA; CHIAN, 1998).

As células da granulosa e do cúmulo têm papel importante durante a aquisição da competência oocitária na maturação *in vitro* (MIV; STAIGMILLER; MOOR, 1984). Oócitos com múltiplas células do cumulus claras e transparentes apresentam maiores taxas de clivagem após a fecundação *in vitro* comparada àqueles desnudos ou com menor quantidade de camadas do cumulus (SIRARD; LAMBERT, 1985; HYTTEL et al., 1986).

Somente após a conclusão dos processos de MIV é que os oócitos se tornam competentes para permitir o sucesso da fecundação e do desenvolvimento embrionário inicial. A maturação inadequada inviabiliza a fecundação e aumenta a ocorrência de polispermia, de partenogênese e de bloqueio do desenvolvimento embrionário (MINGOTI, 2005).

A fecundação *in vitro* (FIV) é ilustrada pela capacidade dos espermatozoides de ligarem a zona pelúcida dos oócitos e de fecundá-los. A capacitação espermática ocorre pela remoção de proteínas e outras substâncias decapacitantes presentes no plasma seminal. Assim, os espermatozoides ficam hiperativados e se unem as proteínas específicas da zona pelúcida dos oócitos de maneira a induzir a reação acrossômica (FLORMAM; FIRST, 1988).

Na maioria dos procedimentos de FIV em bovinos usa-se sêmen congelado. No entanto, após o descongelamento, requer a seleção e recuperação de espermatozoides móveis, de formas normais e livres de contaminantes do plasma seminal. Existem diversos métodos de eliminação do plasma seminal e separação da fração móvel do sêmen diluído, sendo as mais usadas o gradiente de Percoll (GALLI; LAZZARI, 1996) e a técnica do sedimento - “*swim up*” (PARRISH et al., 1984).

O cultivo *in vitro* (CIV) de embriões é o desenvolvimento do estágio inicial embrionário até a fase de blastocisto (SREENAN; SCANLON, 1968). O CIV leva em média 7 dias após a FIV, depois é realizada a seleção e a avaliação dos embriões para a transferência ou criopreservação (GONÇALVES et al., 2008; MINGOTI, 2005).

Após a MIV, aproximadamente 90% dos oócitos submetidos à maturação atingem o estágio de metáfase II com expulsão do primeiro corpúsculo polar. Entretanto, 80% são fecundados e começam a se dividir, pelo menos até o estágio de duas a quatro células. Desses, apenas 25 a 40% alcançam o estágio de blastocisto ou blastocisto expandido (LONERGAN et al., 2001).

2.3. Fisiologia entre fêmeas zebuínas e taurinas

A dinâmica folicular ovariana de vacas e novilhas é caracterizada por ondas de crescimento e regressão folicular durante o ciclo estral. Nas fêmeas *Bos indicus* (Zebuínas) foi caracterizada a presença de duas ou três ondas de crescimento folicular na maioria dos ciclos estrais, de forma bastante semelhante da dinâmica folicular apresentada pelas fêmeas *Bos taurus* (Taurinas; FIGUEIREDO et al., 1997).

No entanto, algumas diferenças foram observadas entre raças zebuínas e taurinas. Em *Bos indicus*, averiguou-se que os diâmetros dos folículos dominantes e dos corpos lúteos (CLs) são menores em relação ao *Bos taurus* (FIGUEIREDO et al., 1997 e PINHEIRO et al., 1998). Em relação às populações foliculares, demonstrou-se que os ovários de novilhas *Bos indicus* apresentam maior número de folículos < 5 mm e menor número de folículos \geq 5 mm do que novilhas *Bos taurus* (BURATINI, 1999). Segundo D'Occhio et al. (1990) as raças zebuínas apresentam menor capacidade de secreção de LH em relação às raças européias. Quanto aos hormônios esteróides, os níveis circulantes destes em fêmeas zebuínas mostram-se inferiores aos observados nas raças européias (SEGERSON et al., 1984).

2.4. Fisiologia do puerpério

Após o parto os animais entram em anestro principalmente por apresentarem balanço energético negativo (BEN), além de exibirem menores concentrações plasmáticas de glicose, insulina, IGF-1 (ROBERTS et al., 1997), progesterona, baixa pulsatilidade de LH e alterações no ciclo estral (PALHANO, 2008). O anestro pós-parto é o período que vai do parto até o estro ou ovulação (YAVAS; WALTON, 2000), tendo a sua duração influenciada por diversos fatores como o estado nutricional pré e pós-parto (HOLNESS et al., 1978), a involução uterina (YAVAS; WALTON, 2000), presença do bezerro (LAMB et al., 1997), a produção de leite (BARTLETT et al., 1987), o número de partições e a exposição a touros após o parto (YAVAS; WALTON, 2000).

No pós-parto, as concentrações de FSH aumentam rapidamente após 5 dias (RHODES et al., 2003), levando ao surgimento da primeira onda folicular. Um

folículo dominante começa a crescer em torno de 10 a 14 dias pós-parto (MURPHY et al., 1990). A ovulação de um folículo dominante ocorre somente quando a produção de estradiol pelo folículo é suficiente para promover o pico pré-ovulatório de LH, na presença de baixas concentrações circulantes de progesterona. Porém, isto apenas irá ocorrer quando o estoque de LH estiver completamente recuperado, dentro de 15 a 30 dias após o parto (YAVAS; WALTON, 2000).

As vacas leiteiras frequentemente ovulam dentro de 21 dias após o parto. Já o período puerperal de vacas de corte é mais prolongado, em torno de 60 dias. Além disso, pode ser mais longo em vacas primíparas (TANAKA et al., 2008), pois as vacas de primeira cria apresentam-se em fase de desenvolvimento após o parto. Esse período pode se prolongar devido a algumas doenças metabólicas (cetose, hipocalcemia e outras) e reprodutivas (ovários cístico, distocias, metrite e retenção de placenta) (EL et al., 1995; DUKES, 2006). A nutrição influencia significativamente a duração desta fase, e os animais com nutrição inapropriada no pré-parto exibem intervalo de retorno a ciclicidade mais prolongado (DUKES, 2006).

A suplementação energética no pós-parto induz a ciclicidade mais precoce (STAGG et al., 1995; ROBERTS et al., 1997). No entanto, segundo Stagg et al. (1995) não há diferença no tempo para emergência da primeira onda folicular após o parto entre vacas com altos e baixos níveis de energia na dieta. Ainda de acordo com os mesmos autores, vacas recebendo baixos níveis de energia possuem maior número de ondas foliculares antes da primeira ovulação. Isto se deve provavelmente pelas concentrações insuficientes de LH para estimular a maturação final do folículo pré-ovulatório.

Deve-se, portanto, levar em consideração que o processo de dinâmica folicular e ciclicidade pós-parto pode ser afetado pela raça (FIGUEIREDO et al., 1997), fase reprodutiva (ROCHE; BOLAND, 1991), estresse térmico (WILSON et al., 1998) e níveis nutricionais, onde a deficiência energética impactam negativamente na ciclicidade (BURKE et al., 1998).

2.5. Interação entre reprodução e nutrição

O estado nutricional das fêmeas mamíferas é um importante fator que determina o sucesso da reprodução e tem influencia no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal sobre o controle da função ovariana e do desenvolvimento folicular (ARMSTRONG et al., 2003, GARNSWORTHY et al., 2008). Segundo Gong et al. (2002), a nutrição tem importante efeito sobre a retomada dos ciclos estrais pós-parto e na taxa de concepção. Assim, ela influencia as concentrações circulantes de metabólitos e hormônios (WEBB et al., 2007).

As principais causas de queda na fertilidade pós-parto estão relacionadas BEN, evidenciado pela queda no escore de condição corporal (ECC; MOREIRA et al., 2000; LOPEZ-GATIUS et al., 2002). O BEN acontece porque a energia adquirida pela alimentação é insuficiente para a manutenção do animal, saúde, produção de leite e a função reprodutiva (MONTIEL; AHUJA, 2005).

A ingestão insuficiente de energia no período pré e pós-parto pode determinar um baixo desempenho reprodutivo, atraso do retorno da ciclicidade e redução nas taxas de concepção e de gestação em vacas de corte e de leite (SANTOS et al., 2004). Segundo Adamiak et al. (2005), o fornecimento de altos níveis alimentares associado a um alto ECC foi prejudicial à qualidade oocitária e a produção de embriões. Entretanto, alta ingestão alimentar em animais com ECC baixo teve efeito positivo no desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto. Isto se deve ao fato do animal estar ganhando peso e se recuperando do parto.

O desempenho reprodutivo em vacas de corte está associado ao ECC (BOSSIS et al., 2000), o qual é um dos fatores que pode afetar o crescimento e persistência do folículo dominante no período pós-parto (RHODES et al., 1995). Fêmeas de corte, na maioria das vezes têm anestro pós-parto mais prolongado do que as de leite, devido, principalmente a interação entre baixo ECC, BEN, nutrição inadequada e presença do bezerro. As vacas primíparas são as mais afetadas por esses fatores por se encontrarem em fase de crescimento. Esse atraso da ovulação pós-parto está associado a uma baixa pulsatilidade de LH (WILLIAMS, 1990; WILTBANK et al., 2002).

Para reduzir o anestro pós-parto, várias estratégias de manejo são indicadas como realizar suplementação alimentar energética nos períodos pré e pós-parto, promover remoções temporárias estratégicas dos bezerros, esquemas de amamentação interrompida e também a utilização de tratamentos hormonais para indução de estro ou de ovulação (IATF) (WILLIAMS, 1990; BARUSELLI et al., 2004; SÁ FILHO et al., 2009).

2.6. Influência da suplementação com ácidos graxos na reprodução dos ruminantes

A suplementação com ácidos graxos (AGs) é uma forma de aumentar o nível energético das dietas, além de possuir efeito na reprodução dos ruminantes (FUNSTON, 2004; RAES et al., 2004). Os AGs são divididos em saturados, que são encontrados na maioria das vezes em gordura animal, e os insaturados, que são mais comumente encontrados em gordura vegetal (GÓMEZ, 2003). Na nutrição dos ruminantes, os mais utilizados são os ácidos graxos poliinsaturados (AGPs) que são AGs insaturados com mais de uma ligação dupla na sua molécula. Sendo os mais estudados com efeitos na reprodução o ácido linolênico (n-3) e ácido linoleico (n-6). O n-3 é encontrado em peixes de água fria, frutos do mar, óleo de canola e de linhaça. Já o n-6 é mais comumente encontrado em óleo de soja, de girassol e outras sementes oleaginosas. Esse tipo de gordura ajuda a aumentar as taxas de lipoproteína de alta densidade (HDL “colesterol bom”) e manter baixas as taxas de lipoproteína de baixa densidade (LDL “colesterol ruim”; MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2002).

Estas dietas ricas em AGPs afetam a composição de AG das células do cumulus, da granulosa e dos oócitos (KIM et al., 2001). Segundo Martins (2007) os AGs são os maiores precursores de energia disponível para função celular em ruminantes. Estes são usados como fonte de energia durante o processo de maturação (SORBERA et al., 2001), competência oocitária (KIM et al., 2001) e no período de desenvolvimento embrionário até implantação (WATHES et al., 2007; THANGAVELU et al., 2007), quando há intensa dessaturação dos AGs (YAO et al., 1980). Embriões acima de quatro células possuem concentrações maiores de AGPs,

em relação aos saturados, pois os AGPs são componentes da membrana lipídica e aumentam rapidamente com a divisão celular embrionária (HAGGARTY et al., 2006).

Deste modo, a suplementação lipídica para vacas de corte e leite durante o período pós-parto pode influenciar o número e qualidade dos embriões (THOMAS; WILLIAMS, 1996). As gorduras protegidas a bio-hidrogenação do rúmen melhoram a absorção dos AGPs pelas vacas leiteiras de alta produtividade, com isso aumenta o potencial de desenvolvimento dos oócitos e a produção de blastocistos *in vitro* (FOULADI-NASHTA et al. , 2007).

Estas gorduras protegidas são obtidas a partir de AGPs de cadeia longa que ficam livres no processo de cisão dos triglicerídeos de óleos vegetais. Estes reagem com sais de cálcio, unidos na forma de um sal (R-COO-Ca), popularmente conhecidos como sabões de cálcio (NRC, 2007). Este tipo de gordura, por ser um produto altamente estável em água e alta temperatura, somente é digerido no organismo do animal, em meio ácido. Como no rúmen o pH = 6,2 elas permanecem inalteradas. Chegando ao abomaso, cujo meio é extremamente ácido (pH = 2 e 3), ocorre à liberação dos AGs e íons de cálcio para o intestino, que serão absorvidos e levados pela corrente sangüínea (JENKINS; PALMQUIST, 1984; SARTORI; MOLLO, 2007).

A alimentação com AGPs influenciam a foliculogênese aumentando o número de folículos e o tamanho do folículo dominante ou pré-ovulatório. Estas diferenças no número de folículos foram observadas por Wathes et al. (2007) após 3 a 4 semanas de suplementação, sendo a máxima diferença após 6 e 7 semanas. Zeron et al. (2002) relataram maiores números e melhor qualidade de oócitos em ovelhas suplementadas com óleo de peixe (rico em n-3) protegido por 13 semanas em relação ao grupo controle.

Em estudos com suplementação de gordura para vacas no pós-parto foi observado retorno à atividade cíclica mais rápido (STAPLES et al., 1998), aumento na concentração de progesterona, no tamanho dos folículos (ZACHUT et al., 2008), na taxa de concepção e diminuição da mortalidade embrionária (RAES et al., 2004; PETIT; TWAGIRAMUNGU, 2006). Assim, uma das finalidades seria melhorar a condição corporal no pré-parto das doadoras com uma dieta rica em n-3 e n-6 para adiantar a ciclicidade dessas fêmeas no pós-parto.

Segundo Wathes et al. (2007) os ácidos linoleicos (n-6) e linolênicos (n-3) são os principais ácidos que influenciam na reprodução. O n-6 é convertido em ácido aracdônico, precursor das prostaglandinas dienoicas, como a $PGF_{2\alpha}$. E o n-3 é convertido a ácido eicosapentaenoico precursor das prostaglandinas trienoicas, como $PGF_{3\alpha}$. Deste modo, a produção das prostaglandinas pode ser manipulada de acordo com a proporção de AGs presentes na dieta.

De acordo com Sartori e Mollo (2007) e Santos et al. (2008) a estratégia de suplementação com AGPs para vacas de leite e corte no período pré-parto é uma dieta rica em n-6, que aumenta a síntese de $PGF_{2\alpha}$ e atua no crescimento folicular, além de melhorar a involução uterina e restabelecer a ciclicidade precocemente. E no pós-parto, com n-3, que reduz a síntese de $PGF_{2\alpha}$ uterina, aumentando a fertilidade e diminuindo as perdas embrionárias precoces.

Vacas de leite alimentadas com AGP n-6 protegido apresentaram maiores porcentagens de embriões de alta qualidade (73,5% vs 51,5%, $p = 0,06$) em relação aos animais que receberam óleo de palma protegido (50% AGs saturados e 50% AGs insaturados; CERRI et al., 2009). Do mesmo modo, em novilhas de corte, o número de embriões degenerados foi menor para os animais que receberam dieta rica em AGP n-3 em relação à dieta com AGs saturados (CHILDS et al., 2008).

Fouladi-Nashta et al. (2007) realizaram experimento com vacas de alta produção leiteira para determinar o efeito de dietas compostas de AGPs nos oócitos, durante curto período de alimentação. Observaram que vacas alimentadas com dieta rica em gordura poliinsaturadas (800 g de Megalac/dia, predominantemente ácido graxo palmítico) no pós-parto apresentaram maiores taxas de clivagem e produção de blastocisto *in vitro*. Isso pode ser explicado pela menor concentração plasmática de AGs não esterificados, pelo efeito positivo dos AGPs na competência dos oócitos e nas membranas celulares e citoplasma, resultando em benefícios para qualidade e desenvolvimento embrionário. Entretanto, mais estudos devem ser executados com o intuito de avaliar a real influência dos AGPs sobre o retorno a ciclicidade pós-parto e o desenvolvimento oocitário e embrionário.

3. Referências

- ABAYASEKARA, D. R.; WATHES, D. C. Effects of altering dietary fatty acid composition on prostaglandin synthesis and fertility. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids**, London, v. 61, n. 5, p. 275-287, 1999.
- 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. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 73, n. 5, p. 918-926, 2005.
- ANUALPEC 2012. **Anuário da pecuária brasileira**. São Paulo: Instituto FNP, Consultoria e Comércio, 2012. p. 378.
- ARMSTRONG, D. G.; GONG, J. G.; WEBB, R. Interactions between nutrition and ovarian activity in cattle: physiological, cellular and molecular mechanisms. **Reproduction Supplement**, Cambridge, v. 61, p. 403-414, 2003.
- BARTLETT, O. P. C.; KIRK, J.; COE, P.; MARTENIUK, J.; MATHER, B. C. Descriptive epidemiology of anestrus in michigan holstein-friesian cattle. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 27, n. 1, p. 31, 1987.
- BARUSELLI, P. S.; REIS, E. L.; MARQUES, M. O. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 82-83, p. 479-486, 2004 doi:10.1016/j.anireprosci.2004.04.025.
- BAVISTER, B. D. Early history of *in vitro* fertilization. **Reproduction**, Cambridge, v. 124, n. 2, p. 181-196, 2002.
- BOLS, P. E. J.; LEROY, J. L. M. R.; VIANA, J. H. M. Aspectos técnicos e biológicos na recuperação de oócitos via trans-vaginal guiada por ultra-som em vacas. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 33, p. 1-4, 2005.
- BOSSIS, I.; WETTEMANN, R. P.; WELTY, S. D. Nutritionally induced anovulation in beef heifers: ovarian and endocrine function during realimentation and resumption of ovulation. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 62, n. 6, p. 1436-1444, 2000.
- BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUNGU, H.; MORIN, N.; BRISSON, C.; CRBONNEAU, G. C.; DUROCHER, J. *In Vitro* Production in Cow: An Effective Alternative to the Conventional Embryo Production Approach. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 51, n. 1, p. 59-70, 1999.
- BROGLIATTI, G. M.; ADAMS, G. P. Ultrasound-guided transvaginal oocyte collection in prepubertal calves. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 45, n. 6, p. 1163-1176, 1996.
- BUNGARTZ, L.; LUCAS-HAHN, A.; RATH, D.; NIEMANN, H. Collection of oocytes from cattle via follicular aspiration aided by ultrasound with or without gonadotropin

pretreatment and in different reproductive stages. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 43, n. 3, p. 667-675, 1995.

BURATINI, J. **Efeitos da aspiração do folículo dominante e do tratamento com somatotrofina recombinante bovina (BST) sobre o desenvolvimento folicular em novilhas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*)**. 1999. p.77. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

BURKE, J. M.; HAMPTON, J. H.; STAPLES, C. R.; THATCHER, W. W. Body condition influences maintenance of a persistent first wave dominant follicle in dairy cattle. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 49, n. 4, p. 751-760, 1998.

CAMARGO, L. S. A.; VIANA, J. H. M.; SÁ, W. F. Factors influencing *in vitro* embryo production. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 3, n. 1, p. 19-28, 2006.

CAROLAN, C.; LONERGAN, P.; VAN LANGENDONCKT, A. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization *in vitro*. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 43, n. 6, p. 1115-1128, 1995.

CERRI, R. L. A.; JUCHEM, S. O.; CHEBEL, R. C.; RUTIGLIANO, H. M.; BRUNO, R. G. S.; GALVÃO, K. N.; THATCHER, W. W.; SANTOS, J. E. P. 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**, New York, n. 4, v. 92, p. 1520-1531, 2009.

CHA, K. Y.; CHIAN, R. C. Maturation *in vitro* of immature human oocyte for clinical use. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 4, n. 2, p. 103-120, 1998.

CHILDS, S.; CARTER, F.; LYNCH, C. O. Embryo yield and quality following dietary supplementation of beef heifers with n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA). **Theriogenology**, Philadelphia, v. 70, n. 8, p. 992-1003, 2008.

D'OCCHIO, M. J.; NEISH, A.; BROADHURST, L. Differences in gonadotrophin secretion post-partum between zebu and European breed cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 22, n. 4, p. 311-317, 1990.

DE LOSS, F.; KASTROP, P.; VAN MAURYK, P.; VANBENEDEN T. H.; KRUIP, T. A. Heterologous cell contacts and metabolics coupling in bovine cumulus oocyte complexes. **Molecular Reproduction and Development**, Hoboken, v. 28, n. 3, p. 255-259, 1991.

DELL'AQUA JUNIOR., J. A.; PAPA, F. O.; ARAÚJO JUNIOR, J. P.; FREITAS, C. P.; PONCHIROLLI, C. B.; ORLANDI, C. Aplicação do sêmen sexado na produção de embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 34, p. 205-212, 2006. Suplemento.

DUKES, H. H. Reprodução em mamíferos do sexo feminino. In: THOMPSON, F. N. **Fisiologia dos animais domésticos**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. Cap. 39, p. 644-669.

EL, A.; ZAIN, D.; NAKAO, T.; RAOUF, M. A.; MORIYOSH, M.; KAWATA, K.; MORITSU, Y. Factors in the resumption of ovarian activity and uterine involution in postpartum dairy cows. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 38, n. 3, p. 203-214, 1995.

FIGUEIREDO, R. A.; BARROS, C. M.; PINHEIRO, O. L.; SOLER, J. M. P. Ovarian follicular dynamics in Nelore Breed (*Bos indicus*). **Theriogenology**, Philadelphia, v. 47, n. 8, p. 1489-505, 1997.

FLORMAN, H. M.; FIRST, N. L. The regulation of acrosomal exocytosis 1: Sperm capacitationis required for the induction of acrosome reaction by the bovine zona pellucida *in vitro*. **Developmental Biology**, Maryland Heights, v. 128, n. 2, p. 453-463, 1988.

FOOTE, R. H. Review: dairy cattle reproductive physiology research and management - past progress and future prospects. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 79, n. 6, p. 980-990, 1996.

FOULADI-NASHTA, A. A.; GUTIERREZ, C. G.; GONG, J. G.; GARNSWORTHY, P. C.; WEBB, R. Impact of dietary fatty acids on oocyte quality and development in lactating dairy cows. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 77, n. 1, p. 9-17, 2007.

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

GALLI, C.; LAZZARI, G. Practical aspects of IVM/IVF in cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 42, n. 1, p. 371-379, 1996.

GARCIA, J. M.; ESPER, C. R.; AVELINO, K. B.; PUELKER, R. Z.; VANTINI, R.; ALMEIDA JR., I.; RODRIGUES, C. F. M. Desempenho e limitações na produção *in vitro* de embriões bovino de vacas com infertilidade adquirida. **Arquivos da Faculdade de Veterinária-UFRGS**, Porto Alegre, v. 27, n. 1, p. 237, 1999. Abstract.

GARCIA, J. M.; YAMAZAKI, W.; AVELINO, K. B.; VANTINI, R.; SENEDA, M. M.; ESPER, C. R. Produção *in vitro* de embriões bovinos: aspectos técnicos e comerciais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 27, n. 2, p. 60-67, 2003.

GARNSWORTHY, P. C.; SINCLAIR, K. D.; WEBB, R. Integration of physiological mechanisms that influence fertility in dairy cows. **Animal**, Cambridge, v. 2, n. 8, p. 1144-1152, 2008.

GIBBONS, J. R.; BEAL, W. F.; KRISHER, R. J.; FABER, F. G.; PEARSON, R. F.; GWAZDAUSKAS, F. C. Effect of once versus twice-weekly transvaginal follicular

aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 42, n. 2, p. 405-419, 1994.

GÓMEZ, M. E.; DE LOS, D. B. **Modulação da composição de ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 de ovos e tecidos de galinhas poedeiras, através da dieta. I. Estabilidade oxidativa.** 2003. p. 149. Tese (Doutorado) em Ciência dos Alimentos/Bromatologia. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2003.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R. de; FREITAS, V. J. de F. Produção *in vitro* de embriões. In: GONÇALVES, P. B. D.; OLIVEIRA, M. A. L. de; MEZZALIRA, A.; MONTAGNER, M. M.; VISINTIN, J. A.; DA COSTA, L. F. S. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal.** 2. ed. São Paulo: Roca, 2008. Cap. 14, p. 261-291.

GONG, J. G.; LEE, W. J.; GARNSWORTHY, P. C.; WEBB, R. Effect of dietary-induced increases in circulating insulin concentrations during the early postpartum period on reproductive function in dairy cows. **Reproduction**, Cambridge, v. 123, n. 3, p. 419-427, 2002.

GORDON, I. Oocyte recovery and maturation. In: GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryos.** Wallingford, UK: CAB International, 1994. p. 30-65.

HAGGARTY, P.; WOOD, M.; FERGUSON, E.; HOAD, G.; SRIKANTHARAJAH, A.; MILNE, E.; HAMILTON, M.; BHATTACHARYA, S. Fatty acid metabolism in human preimplantation embryos. **Human Reproduction**, Oxford, v. 21, n. 3, p. 766-773, 2006.

HASLER, J. F. Commercial production of *in vitro*-derived bovine embryos. **Arquivos da Faculdade de Veterinária-UFRGS**, Porto Alegre, v. 24, n. 1, p. 117-134, 1996.

HASLER, J. F. The current status of oocyte recovery, *in vitro* embryo production, and embryo transfer in domestic animals, with an emphasis on the bovine. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 76, n. 1, p. 52-74, 1998.

HAYAKAWA, H.; HIRAI, T.; TAKIMOTO, A.; IDETA, A.; AOYAGI, Y. Superovulation and embryo transfer in Holstein cattle using sexed sperm. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 71, n. 1, p. 68-73, 2009.

HOLNESS, D. H.; HOPLEY, J. D. H.; HALE, D. H. The effects of plane of nutrition, live weight, temporary weaning and breed on the occurrence of oestrus in beef cows during the postpartum period. **Animal Production**, Cambridge, v. 26, n. 1, p. 47-54, 1978.

HOSHI, H. *In vitro* production of bovine embryos and their application for embryo transfer. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 59, n. 2, p. 675-685, 2003.

HYTTEL, P.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Ultrastructural features of preovulatory oocytes maturation in superovulated cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 76, n. 2, p. 645-656, 1986.

JENKINS, T. C.; PALMQUIST, D. L. Effect of fatty acids or calcium soaps on rumen and total nutrient digestibility of dairy rations. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 67, n. 5, p. 978, 1984.

KANE, M. T. A review of *in vitro* gamete maturation and embryo culture and potential impact on future animal biotechnology. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 79, n. 3-4, p. 171-90, 2003.

KIM, J. Y.; KINOSHITA, M.; OHNISHI, M.; FUKUI, Y. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and *in vitro* matured bovine oocytes. **Reproduction**, Cambridge, v. 122, n. 1, p. 131-138, 2001.

LAMB, G. C.; LYNCH, J. M.; GRIEGER, D. M.; MINTON, J. E.; STEVENSON, J. S. Ad libitum suckling by an unrelated calf in the presence or absence of a cow's own calf prolongs postpartum anovulation. **Journal Animal Science**, Savoy, v. 75, n. 10, p. 2762-2769, 1997.

LANSBERGEN, L. M. T. E.; VAN W.; LEEUW A. M.; DAAS, J. H. G.; RUIG, L.; VAN DER STREEK, G.; REINDERS, J. M. C.; AARTS, M.; RODEWIJK, J. Factors affecting ovum pick-up in cattle. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 43 n. 1, p. 259, 1995.

LEEMPUT, E. E. van de; VOS, P. L. A. M.; ZEINSTRAS, E. C.; BEVERS, M. M.; WEIJDEN, G. C. van der; DIELEMAN, S. J. Improved *in vitro* embryo development using *in vivo* matured oocytes from heifers superovulated with a controlled preovulatory LH surge. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 52, n. 2, p. 335-349, 1999.

LEEUW, V. W. de. Ovum pick up and *in vitro* production in the bovine after use in several generations. A 2005 status. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 65, n. 5, p. 914-925, 2006.

LIU, Z.; FOOTE, R. H. Development of bovine embryos in KSOM with added superoxide dismutase and taurine and with five and twenty percent O₂. **Biology of Reproduction**, Cambridge, v. 53, n. 4, p. 786-790, 1995.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; WARD, F.; BOLAND, M. P. Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. **Reproduction Nutrition Development**, les Ulis, v. 41, n. 5, p. 427-437, 2001.

LOPEZ-GATIUS, F.; SANTOLARIA, P.; YANIZ, J. Factors affecting pregnancy loss from gestation Day 38 to 90 in lactating dairy cows from a single herd. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 57, n. 4, p. 1251-1261, 2002.

MAGGIONI, D.; ROTTA, P. P.; ITO, R. H. Efeito da nutrição sobre a reprodução de ruminantes: uma revisão. **PUBVET**, Londrina, v. 2, n. 11, Mar 3, 2008.

MAHAN LK, ESCOTT-STUMP S. **Krause: alimentos, nutrição e dietoterapia**. 10 ed. São Paulo: Roca, 2002. 1179p.

MARTINS, C. M. **Influência da alta ou baixa ingestão alimentar na produção *in vitro* de embriões e função ovariana em *Bos indicus***. 2007. 77 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2007.

MERTON, J. S.; ROOS A, P. W.; MULLAART, E.; RUIGH, L.; KAAL, L.; VOS, P. L. A. M.; DIELEMANI. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 59, n. 2, p. 651-674, 2003.

MINGOTI G, Z. Aspectos técnicos da produção *in vitro* de embriões bovinos. In: HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M. **Tópicos avançados em biotecnologia da reprodução**. Jaboticabal: Funep, 2005. 1 CD-ROM.

MONTIEL, F.; AHUJA, C. Body condition and suckling as factors influencing the duration of postpartum anestrus in cattle: A review. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 85, n. 1-2, p. 1-26, 2005.

MOREIRA, F.; RISCO, C.; PIRES, M. F. Effect of body condition on reproductive efficiency of lactating dairy cows receiving a timed insemination. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 53, n. 6, p. 1305-1319, 2000.

MURPHY, M. G.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F. Pattern of follicular growth and resumption of ovarian activity in post-partum beef suckler cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 90, n. 2, p. 523-533, 1990.

NIBART, M.; SILVA PEIXER, M.; THUARD, J. M.; DURANT, M.; GUYADER-JOLY, C.; PONCHON, S.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; HUMBLLOT, P. Embryo production by OPU and IVF in dairy cattle. In: RÉUNION A.E.T.E., 11., 1995, Hannover. **Proceedings**, 1995. p. 216.

NRC (NATIONAL RESEARCH COUNCIL). **Nutrients requirements of sheep**. Washington: National Academies Press, 2007. 362 p.

PALHANO, H. B. **Reprodução em bovinos: fisiopatologia, terapêutica, manejo e biotecnologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: L. F. Livros de Veterinária Ltda, 2008. p. 33-67.

PARRISH, J. J.; PARRISH, J. L.; FIRST, N. L. Effect of swim-up separation and heparin pretreatment of frozen thawed spermatozoa on *in vitro* fertilization of bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 30, n. 1, p. 112, 1984. Abstract.

PEIXER, M. A. S.; SOUZA, R. V.; RUMPF, R.; DE BEM, A. R.; NETO M. A. P. **Nascimento dos primeiros produtos de FIV da raça Nelore no CENARGEM.** Zootecnia, Nova Odessa, v. 32, p. 49, 1995.

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

PETIT, H. V.; TWAGIRAMUNGU, H. Reproduction of dairy cows fed flaxseed, megalac or micronized soybeans. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 85, n. 2, p. 312, 2002. Supplement 1.

PIETERSE, M. C.; KAPPEN, K. A.; KRUIP, T. A. M.; TAVERNE, M. A. M. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 30, n. 4, p. 751-761, 1988.

PINHEIRO, O. L.; BARROS, C. M.; FIGUEREDO, R. A.; VALLE, E. R. do; ENCARNAÇÃO, R. O.; PADOVANI, C. R. Estrous behavior and the estrus to ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F2alpha or norgestomet and estradiol valerate. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 49, n. 3, p. 667-81, 1998.

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**, Amsterdam, v. 113, n. 1-4, p. 199-221, 2004.

RHODES, F. M.; MCDOUGALL, S.; BURKE, C. R.; VERKERK, G. A.; MACMILLAN, K. L. Invited review: Treatment of cows with an extended postpartum anestrous interval. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 86, n. 6, p. 1876-1894, 2003.

RHODES, F. M.; FITZPATRICK, L. A.; ENTWISTLE, K. W.; DEATH, G. Sequential changes in ovarian follicular dynamics in *Bos indicus* heifers before and after nutritional anestrous. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 104, n. 1, p. 41-49, 1995.

RIZOS, D.; LONERGAN, P.; BOLAND, M. P.; ARROYO-GARCIA, R.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J. Analysis of differential mRNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 66, n. 3, p. 589-595, 2002.

ROBERTS, A. J.; NUGENT III, R. A.; KLINDT, J.; JENKINS, T. G. Circulating insulin like growth factor I, insulin-like growth factor binding proteins, growth hormone, and resumption of estrus in postpartum cows subjected to dietary energy restriction. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 75, n. 7, p. 1909-1917, 1997.

ROCHE, J. F.; BOLAND, M. P. Turnover of dominant follicles in cattle of different reproductive states. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 35, n. 1, p. 81-90, 1991.

ROOVER, de R.; GENICOT, G.; LEONARD, S.; BOLS, P.; DESSY, F. Ovum pick up and *in vitro* embryo production in cows superstimulated with an individually adapted superstimulation protocol. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 86, n. 1-2, p. 13-25, 2005.

SÁ FILHO, O. G.; VILELA, E. R.; GEARY, T. W. Strategies to improve fertility in postpartum multiparous *Bos indicus* cows submitted to a fixed-time insemination protocol with gonadotropin-releasing hormone and prostaglandin F2alpha. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 87, n. 9, p. 2806-2814, 2009.

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

SANTOS, J. E. P.; THATCHER, W. W.; CHEBEL, R. C.; CERRI, R. L. A.; GALVÃO, K. N. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 82-83, n. 1, p. 513-535, 2004.

SARTORI, R.; MOLLO, M. R. Influência da ingestão alimentar na fisiologia reprodutiva da fêmea bovina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 2, p. 197-204, 2007.

SENEDA, M. M.; ESPER, C. R.; ANDRADE, E. R.; BINELLI, M.; OLIVEIRA, J. A.; MAX, M. C.; GARCIA, J. M. Relationship between follicle size after FSH treatment and efficiency of oocyte recovery. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 2, n. 3, p. 178-182, 2005.

SERGERSON, E. C.; HANSEN, T. R.; LIBBY, D. W.; RANDEL, R. D.; GETZ, W. R. Ovarian and uterine morphology and function in Angus Brahman cows. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 59, n. 4, p. 1026-46, 1984.

SIRARD M. A.; LAMBERT R. D. *In vitro* fertilization of follicular oocytes obtained by laparoscopy. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 33, n. 2, p. 487-494, 1985.

SORBERA, L. A.; ASTURIANO, J. F.; CARRILLO, M.; ZANUY, S. Effects of polyunsaturated fatty acids and prostaglandins on oocyte maturation in a marine teleost, the European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). **Biology of Reproduction**, Madison, v. 64, n. 1, p. 382-389, 2001.

SREENAN, J. M.; SCANLON, P. F. Continued cleavage of fertilized bovine ova in the rabbit. **Nature**, New york, v. 217, p. 867, 1968.

STAGG, K.; DISKIN, M. G.; SREENAN, J. M.; ROCHE, J. F. Follicular development in long-term anestrous suckler beef cows fed two levels of energy postpartum. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 38, n. 1-2, p. 49-51, 1995.

STAIGMILLER, R. B.; MOOR, R. M. Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outside of the follicle. **Gamete Research**, Hoboken, v. 9, n. 2, p. 221-229, 1984.

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**, New York, v. 81, n. 3, p. 856–871, 1998.

TANAKA, T.; ARAI, M.; OHTANI, S.; UEMURA, S.; KUROIWA, T.; KIM, S.; KAMOMAE, H. Influence of parity on follicular dynamics and resumption of ovarian cycle in postpartum dairy cows. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 108, n. 1-2, p. 134-143, 2008.

THANGAVELU, G. M.; COLAZO, G.; AMBROSE, D. J. Diets enriched in unsaturated fatty acids enhance early embryonic development in lactating Holstein cows. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 68, n. 5, p. 949-957, 2007.

THOMAS, M. G.; WILLIAMS, G. L. Metabolic hormone secretion and FSH induced superovulatory responses of beef heifers fed dietary fat supplements containing predominantly saturated or polyunsaturated fatty acids. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 45, n. 2, p. 451-458, 1996.

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

WEBB, R.; GARNSWORTHY, P. C.; CAMPBELL, B. K.; HUNTER, M. G. Intra-ovarian regulation of follicular development and oocyte competence in farm animals. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 68, n. 1, p. 22–29, 2007.

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

WILSON, S. J.; MARION, R. S.; SPAIN, J. N.; SPIERS, D. E.; KEISLER, D. H.; LUCY, M. C. Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 1. Lactating cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, n. 8, p. 2124-2131, 1998.

WILTBANK, M. C.; GUMEN, A.; SARTORI, R. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 57, n. 1, p. 21-53, 2002.

YAO, J. K.; RYAN, R. J.; DYCK, P. J. The porcine ovarian follicle. VI. Comparison of fatty acid composition of serum and follicular fluid at different developmental stages. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 22, n. 2, p. 141-147, 1980.

YAVAS, Y.; WALTON, J. S. Postpartum acyclicity in suckled beef cows: A review. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 54, n. 1, p. 25-55, 2000.

ZACHUT, M.; ARIELI, A.; LEHRER, H.; ARGOV, N.; MOALLEM, U. Dietary unsaturated fatty acids influence preovulatory follicle characteristics in dairy cows. **Reproduction**, Cambridge, v. 135, n. 5, p. 683-692, 2008.

ZERON, Y.; SKLAN, D.; ARAV, A. Effect of polyunsaturated fatty acid supplementation on biophysical parameters and chilling sensitivity of ewe oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, Hoboken, v. 61, n. 2, p. 271-278, 2002.

CAPÍTULO 2 - EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM FONTES DE ÁCIDOS GRAXOS EM DOADORAS PRIMÍPARAS DA RAÇA NELORE DURANTE O PRÉ E PÓS-PARTO SOBRE O RETORNO À CICLICIDADE, PRODUÇÃO *in vitro* DE EMBRIÕES E TAXA DE GESTAÇÃO

RESUMO – As suplementações de bovinos com fontes de ácidos graxos poliinsaturados (AGPs) são formas de aumentar o nível energético das dietas, além de possuir efeito na reprodução dos ruminantes. Tendo em vista o exposto idealizou-se o presente trabalho com o objetivo de avaliar as condições reprodutivas do pós-parto, número de folículos, presença de CL, concentração de P_4 , quantidade de oócitos totais, de viáveis, a PIVE e a taxa de gestação de doadoras primíparas da raça Nelore suplementadas com dieta rica em AGPs protegido (principalmente de n-6) e não protegido (principalmente de n-3) durante o pré e pós-parto. As doadoras foram divididas aleatoriamente em 3 grupos, sendo que o grupo controle apresentou 7 fêmeas, o segundo grupo, com 8 animais que foram suplementados com uma fonte de gordura protegida contendo 100g/doadora/dia de Megalac-E[®] e o terceiro grupo com 7 fêmeas suplementadas com uma fonte de gordura não protegida contendo 1kg/doadora/dia de torta de linhaça. As dietas foram fornecidas por 30 dias pré-parto e 75 dias pós-parto. Estes animais foram submetidos à OPU nos dias 30, 45, 60 e 75 pós-parto. Os oócitos recuperados foram selecionados e os viáveis submetidos aos procedimentos da PIVE. Os dados foram analisados pelo método dos quadrados mínimos utilizando Análise de Variância pelo proc GLM. As diferenças entre médias foram comparadas pelo teste de Tukey com significância de 5%. Não foi detectado efeito de tratamento de suplementação, de dias de aspirações pós-parto e das interações sobre as variáveis: número de folículos, quantidade de oócitos totais, de oócitos viáveis, taxa de oócitos viáveis, número clivagem, PIVE, taxa de embriões produzidos, presença de CL, concentração de P_4 e taxa de doadoras. Os resultados do presente estudo demonstram que aspiração realizada no pós-parto de doadoras suplementadas com Megalac-E[®] e linhaça não aumentaram o número de folículos, a quantidade dos oócitos totais, de viáveis, de clivados, a PIVE, retorno a ciclicidade e a taxa de gestação. Assim, é necessário mais estudos com maior número de doadoras e diferentes fontes de gordura para testar a real influência dos AGPs na reprodução de fêmeas primíparas.

Palavras chave: Ácidos graxos poliinsaturados, ciclicidade, embriões, Nelore, oócitos e pós-parto.

1. Introdução

A bovinocultura de corte é um dos principais destaques da pecuária brasileira, ocupando o Brasil a posição de líder nas exportações de carne (ANUALPEC, 2012). O rebanho de corte brasileiro é composto por cerca de 80% da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), o equivalente a mais de 114 milhões de cabeças (ACNB, 2011).

As falhas na reprodução estão entre os mais importantes fatores que limitam o desempenho da pecuária de corte brasileira (PESSUTI; MEZZADRI, 2004) e a nutrição está diretamente envolvida nesse processo. Portanto, maximizar o desempenho da pecuária através do aprimoramento e desenvolvimento de biotécnicas ligadas a reprodução e a nutrição animal devem ser metas que norteiam os técnicos e criadores a alcançarem maior produtividade e satisfatório custo-benefício na atividade.

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) tem sido utilizada como ferramenta importante para multiplicação de animais com mérito genético superior. Essa técnica permite a recuperação de oócitos de doadoras por meio da OPU (LEEMPUT et al., 1999), podendo ser realizada sem maiores alterações aparentes no trato reprodutivo, independentemente da fase do ciclo estral (BLONDIN et al., 2002). Em animais da raça Nelore foram observadas grandes variações na PIVE entre doadoras, com média de 42% de embriões produzidos *in vitro* (DAYAN et al., 2000).

Segundo Hawkins et al. (1995) e Maggioni et al. (2008), a nutrição tem papel importante no desenvolvimento dos bovinos por afetar diretamente aspectos da fisiologia e desempenho reprodutivo. De acordo com Rigolon et al. (2009), o balanço energético e a concentração calórica de uma dieta são os principais fatores envolvidos no crescimento folicular, ovulação e desenvolvimento embrionário.

Segundo Funston (2004), a suplementação lipídica tem sido usada para aumentar a densidade energética da dieta, podendo afetar positivamente a reprodução em fêmeas de corte. Gorduras na dieta podem melhorar a condição energética das fêmeas e ter ação no desenvolvimento folicular, secreção de PGs e esteroidogênese (SARTORI; MOLLO, 2007; ZACHUT et al., 2008).

Ácidos graxos poliinsaturados (AGPs) apresentam benefícios significativos para a saúde. Estudos demonstraram que alimentação com dietas ricas em AGPs

melhoram o desempenho reprodutivo em bovinos (BILBY et al., 2006; WATHES et al., 2007). Segundo Fouladi-Nashata et al. (2007), a suplementação com dietas ricas em AGs protegidos à bio-hidrogenação do rúmen melhoram o potencial de desenvolvimento de oócitos até blastocisto assim como a qualidade do blastocisto produzido. Estes efeitos podem ser parcialmente mediados por melhorias na maturação do oócito, o que é essencial para a fertilização bem sucedida e posterior desenvolvimento embrionário (GILCHRIST et al., 2007; THANGAVELU et al., 2007).

As principais famílias de AGPs que influenciam na reprodução dos bovinos são ácido linolênico (n-3) e ácido linoleico (n-6) (WATHES et al., 2007). Onde n-3 é encontrado mais frequentemente em óleo de linhaça, peixes de água fria e frutos do mar e o n-6 pode-se encontrar em óleo de soja, girassol e outras sementes oleaginosas. Estes AGPs podem melhorar a fertilidade em bovinos aumentando o número e tamanho dos folículos ovarianos (ROBINSON et al., 2002; BILBY et al., 2006), tamanho do CL (RAES et al., 2004; BILBY et al., 2006), quantidade e qualidade dos oócitos (KIM et al., 2001; ZERON et al., 2002). Além disso, outros estudos também observaram melhora no número e na qualidade embrionária (CHILDS et al., 2008a; CERRI et al., 2009) e na concentração circulante de PGs e hormônios esteroides (PETIT et al., 2002; CHILDS et al., 2008b).

Um produto rico em gordura protegida n-3 e principalmente n-6 usado na suplementação de fêmeas bovina é o Megalac-E[®], que é feito a partir de óleo de soja saponificado (sais de cálcio) para proteção dos AGPs à bio-hidrogenação do rúmen. Segundo Lopes et al. (2009), vacas Nelore lactantes que receberam Megalac-E[®] durante o início do protocolo de sincronização do estro até 28 dias após IATF obtiveram taxa de gestação superior (51,2%, n = 451), em relação ao grupo não suplementado (39,6%, n = 459; p = 0,04). De acordo com Peres et al. (2008), fêmeas Nelore suplementadas com semente de girassol (rica em n-6) no pós-parto do momento da IA até 22 dias após observaram aumento de 20,4% na taxa de concepção.

Guardieiro et al. (2010b) não observaram efeito positivo na PIVE em novilhas da raça Nelore suplementadas com Megalac-E[®]. Em novilhas mestiças de corte suplementadas com dieta rica em n-3 foi observado menor quantidade de embriões degenerados em relação à dieta com outros AGs (CHILDS et al., 2008a).

No pós-parto, alguns efeitos dos AGPs são observados, como o n-6 que aumenta a síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$, atua no crescimento folicular, melhora a involução uterina e restabelece a ciclicidade precocemente. E o n-3 que reduz a síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ uterina, aumenta a fertilidade e diminui as perdas embrionárias precoces (SARTORI; MOLLO, 2007). Assim, o manejo dessas dietas é importante para reduzir o anestro pós-parto principalmente em primíparas, já que essa categoria animal apresenta dificuldade de recuperação após o parto por estar em fase de desenvolvimento (TANAKA et al., 2008). Tendo em vista o exposto o presente estudo visou avaliar os efeitos das suplementações ricas em ácidos linoleico (n-6) e linolênico (n-3) protegidos ou não, no pré e pós-parto de fêmeas primíparas da raça Nelore sobre o retorno à ciclicidade, obtenção de oócitos, na PIVE e na taxa de gestação.

2. Hipóteses

- A suplementação com dieta rica em n-3 e n-6 adiantará o retorno à ciclicidade após o parto e aumentará a população folicular dos animais e isso se refletirá positivamente na taxa de gestação.
- Animais suplementados com dieta rica AGPs (n-3 e n-6) apresentarão maior número de oócitos aspirados, maiores quantidade de oócitos viáveis, além de aumento na PIVE.
- Animais aspirados com maior número de dias pós-parto suplementados com AGPs apresentarão maior quantidade de oócitos aspirados, maior número de oócitos totais, de oócitos viáveis e aumento na PIVE.

3. Objetivos

3.1 Geral

Avaliar as condições reprodutivas do pós-parto, número de folículos, quantidade de oócitos totais, de oócitos viáveis e a PIVE de doadoras primíparas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) suplementadas com dietas rica em AGPs (n-3 e n-6) protegido ou não durante o pré e pós-parto.

3.2 Específicos

➤ Avaliar a quantidade de oócitos totais, de oócitos viáveis e a PIVE de doadoras primíparas da raça Nelore alimentadas com dietas rica em AGPs (n-3 e n-6) no pré e pós-parto.

➤ Avaliar o retorno da ciclicidade após o parto, a concentração de progesterona plasmática, o número de folículos, presença de CL e a taxa de gestação de fêmeas primíparas da raça Nelore suplementadas com dietas rica em AGPs (n-3 e n-6) no pré e pós-parto.

➤ Avaliar a relação de maior número de dias pós-parto de doadoras primíparas da raça Nelore com o número de folículos, presença de CL, quantidade de oócitos totais, de oócitos viáveis e a PIVE.

4. Material e Métodos

Os produtos químicos foram adquiridos da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EUA). Aqueles de origem diferente estão informados no texto.

4.1. Local

O experimento foi realizado no Instituto de Zootecnia (IZ), Unidade de Pesquisa de Gado de Corte, localizado no município de Sertãozinho, SP. As atividades laboratoriais foram realizadas no Departamento de Reprodução Animal da UNESP - Campus de Jaboticabal, SP no período entre agosto e dezembro de 2011.

4.2. Doadoras de oócitos

Foram utilizadas 22 fêmeas primíparas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) com peso médio de $478,68 \pm 47,04$ kg e ECC médio de $5,3 \pm 0,5$ (numa escala de 0 a 9) (WAGNER et al., 1988). Estas fêmeas estavam em perfeitas condições sanitárias e reprodutivas, sem apresentar enfermidades e/ou patologias que pudessem afetar a produção de embriões. Os animais foram mantidos a pasto de *Brachiaria decumbens* e com acesso *ad libitum* a água e sal proteinado. Não houve pré-seleção das doadoras em relação ao número de folículos presentes nos ovários e/ou recrutamento folicular, e a divisão dos animais entre os tratamentos foi feita aleatoriamente, de acordo com o peso no início do experimento.

4.3. Tratamento e Delineamento experimental

As doadoras foram divididas aleatoriamente em 3 grupos, sendo que o grupo controle apresentou 7 fêmeas, o segundo grupo com 8 animais que foram suplementados com uma fonte de gordura protegida contendo 100g/doadora/dia de Megalac-E[®] (Química Geral do Nordeste, Rio de Janeiro, Brasil; Apêndice 1) e o terceiro grupo com 7 fêmeas suplementadas com uma fonte de gordura não protegida contendo 1kg/doadora/dia de torta de linhaça prensada a frio.

Cada doadora recebeu 1,5 kg da dieta, de acordo com seu grupo experimental, diariamente pela manhã (Tabela 1). Essa suplementação teve início 30 dias antes do parto e término 75 dias pós-parto (Figura 2). As doadoras do grupo linhaça receberam uma dieta mais energética por se tratar de uma fonte de AGPs não protegido à bio-hidrogenação do rúmen, este responsável pela degradação de mais de 80% dos n-3 e n-6 ingeridos na dieta (BERCHIELLI; PIRES; OLIVEIRA, 2011). Já o grupo controle e o Megalac-E[®] apresentaram quantidade semelhante de n-6, mas neste segundo grupo os AGPs são protegidos e sua absorção se dá no intestino delgado. Após a conclusão dos tratamentos foi mantida a mesma alimentação de rotina da fazenda, aquela do grupo controle.

As dietas, oferecidas a cada grupo de doadoras, foram preparadas de acordo com as composições apresentadas nas Tabelas 1 e 2 e Figura 1. As análises bromatológicas foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da FCAV/UNESP e as análises cromatográficas foram realizadas no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas do Departamento de Tecnologia da FCAV/UNESP.

Tabela 1. Composição nutricional e análise bromatológica das dietas utilizadas no experimento para doadoras primíparas da raça Nelore.

Ingredientes	Controle (%)	Megalac-E® (%)	Linhaça (%)
Farelo de Milho	92,45	85,59	30,53
Megalac – E	0	6,67	0
Torta de Linhaça	0	0	65,47
Mineral	4	4	4
Uréia	3,55	3,74	0
Índices			
Matéria Seca	88,42	88,88	91,88
Proteína Bruta	20,01	16,91	20,23
Extrato etéreo	3,92	4,06	13,99

Tabela 2. Análise cromatográfica das dietas utilizadas no experimento para doadoras primíparas da raça Nelore.

Ácidos	Nomenclatura	Controle (%)	Megalac-E® (%)	Linhaça (%)
Mirístico	C14:0	0,05	0,11	0,06
Pentadecanoico	C15:0	-	-	0,03
Palmítico	C16:0	13,73	14,5	8,32
Palmitoleico	C16:1	0,13	0,16	0,11
Heptadecanoico	C17:0	0,07	0,07	0,06
Heptadecenoico	C 17:1	0,03	0,03	0,03
Estearico	C18:0	2,55	2,46	4,16
Oleico	C18:1n9c	34,89	33,32	21,54
cis-vacênico	C18:1n7	0,65	0,74	0,81
Linoleico (n-6)	C18:2n6c	45,82	46,37	17,1
α linolenico (n-3)	C18:3n3	0,91	1,58	47,18
Linoléico conjugado (CLA)	C18:2c9,t11	-	0,05	-
Araquídico	C 20:0	0,7	0,31	0,22
Eicosenoico	C20:1n9	0,25	0,2	0,12
Behênico	C22:0	0,1	0,1	0,14
Lignocérico	C24:0	0,12	-	0,12
Total		100	100	100

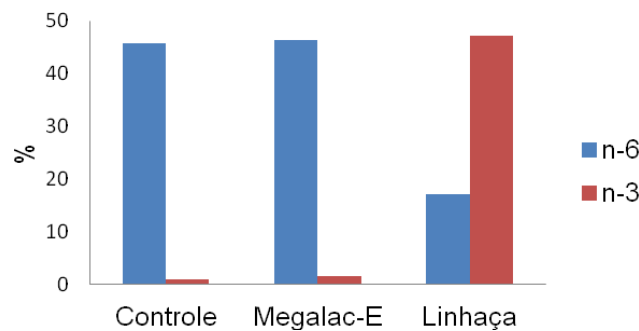


Figura 1. Composição de ácido linoleico (n-6) e ácido linolênico (n-3) nas dietas dos grupos experimentais para doadoras primíparas da raça Nelore.

4.4. Quantificação do número de folículos, presença de CL e concentração de P_4

O número de folículos, o número de doadoras com CL e a taxa de doadoras com CL (n° de doadoras com CL/total de animais) foram quantificados por ultrassonografia nos dias 30, 45, 60 e 75 do pós-parto. Para o exame ultrassonográfico foi utilizado o aparelho de ultrassom Aloka SSD-500 com transdutor linear transretal de 5 MHz (Figura 2).

Para quantificação das concentrações plasmáticas de P_4 foi realizado colheita de sangue em todos os animais no terceiro procedimento de aspiração, aos 60 dias de parição (Figura 2). O sangue foi colhido por venopunção da jugular em tubos do tipo vacuitainer heparinizados de 10 mL (BD, São Paulo, Brasil). Cada amostra foi acondicionada em geladeira com temperatura entre 4 e 6°C (por no máximo uma hora e meia) e posteriormente centrifugada por 20 minutos a 3600g. Depois da centrifugação, foram retirados cerca de 3 mL de plasma sanguíneo, que por sua vez, foram divididos em duas alíquotas em eppendorfs de 2 mL e acondicionados em freezer -24°C.

As dosagens foram realizadas no Laboratório Endomed Patologia Clínica de Jaboticabal. O método utilizado foi o de quimioluminescência (Siemens™ Progesterone kit, Los Angeles, USA). A dose mínima detectável foi 0,2 ng/mL. Foi considerada atividade lútea concentração plasmática de $P_4 > 1,5$ ng/mL. Foi utilizado este valor de referência, pois os animais *Bos taurus indicus* são sujeitos a estresse que pode influenciar a glândula adrenal a produzir quantidade substanciais de P_4 (maior de 1,0 ng/mL) sem apresentação de CL (CLARO JUNIOR, et al., 2010).

4.5. Técnica de Aspiração Folicular

A primeira aspiração foi realizada entre o 25^o e o 32^o dia do pós-parto e as demais com intervalo de 15 dias (45^o, 60^o e 75^o), totalizando 4 aspirações (Figura 2).

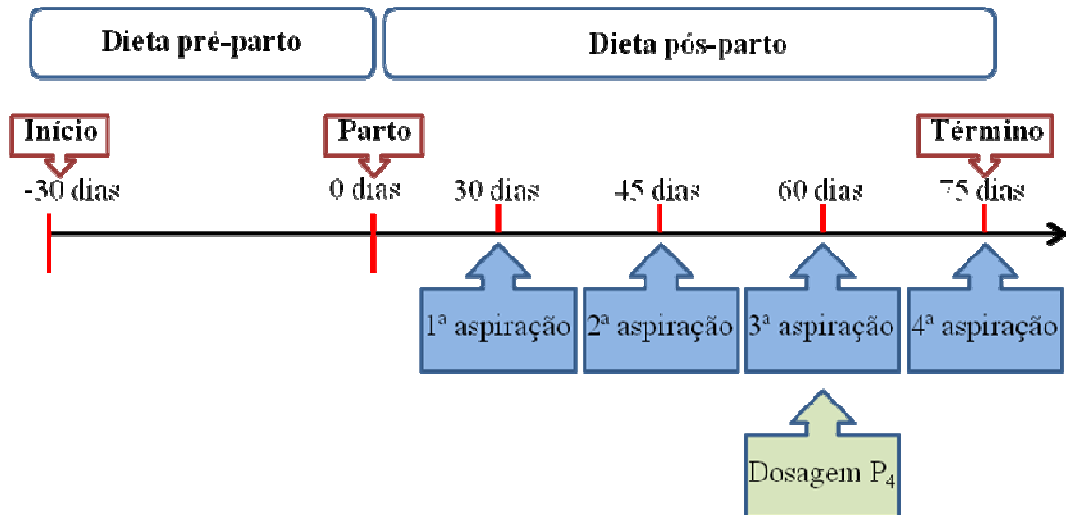


Figura 2. Representação esquemática do protocolo experimental de alimentação e aspiração para doadoras primíparas da raça Nelore.

O procedimento de aspiração folicular foi realizado utilizando-se um equipamento de ultrassom Aloka SSD 500 com transdutor microconvexo de 5 MHz, conectado na guia de aspiração transvaginal. As aspirações foram realizadas com agulhas hipodérmicas descartáveis 20G (0,9 x 50 mm; Terumo, São Paulo, Brasil), e sistema de aspiração Cook (Cook, Queensland, Australia) acoplado em tubos de polipropileno tipo Falcon de 50 mL. A pressão de vácuo foi obtida com bomba de vácuo (WTA, Cravinhos, Brasil), ajustada entre 70 e 90 mm Hg.

Previamente às aspirações, foi realizada anestesia epidural baixa com 5 mL de lidocaína 2% (Lidovet, Bravet, Rio de Janeiro, Brasil) e higienização da região perineal com água e álcool 70%. A guia de aspiração acoplada ao transdutor do ultrassom foi inserida até o fornix vaginal de cada lado correspondente ao ovário e com auxílio de manipulação retal, os ovários foram posicionados na linha de punção indicada na tela do ultrassom e a bomba de vácuo foi acionada iniciando-se as aspirações dos folículos observados.

As lavagens da agulha foram realizadas com o mesmo meio de armazenamento dos oócitos, qual seja PBS (Phosphate-buffered saline; Apêndice 3) acrescido de

10.000 UI/L de Heparina (Liquemine, Roche Químicos e Farmacêuticos, Rio de Janeiro, Brasil), acondicionado em tubo tipo Falcon de 50 mL. Logo após as aspirações o sistema foi lavado com o meio de punção e o material coletado encaminhado imediatamente para o laboratório da fazenda.

4.6. Lavagem, seleção e transporte dos oócitos

O material aspirado foi transportado para o laboratório da fazenda, e lavado com PBS em filtro de colheita de embriões até que o conteúdo do filtro se tornasse translúcido. O sedimento restante no filtro foi depositado em placas de Petri de 90 mm, para a procura e seleção dos oócitos. Posteriormente, com uso de estereomicroscópio, foi efetuada a contagem e avaliação da qualidade dos oócitos recuperados que foram classificados em graus de I à V (DE LOOS et al., 1991), sendo que:

- a) Grau I: revestimento com multicamadas de cumulus compacto e ooplasma homogêneo;
- b) Grau II: revestimento de 3 a 5 camadas de cumulus compacto, ooplasma homogêneo ou com regiões escuras na periferia;
- c) Grau III: pouco revestimento de células do cumulus (1 a 3 camadas), ooplasma irregular com picnose;
- d) Grau IV ou atrésico: cumulus expandido com células escuras e em grumos;
- e) Grau V ou Desnudo: sem camadas do cumulus e com ooplasma uniforme ou com granulações.

Após a avaliação, os oócitos classificados como grau I, II e III foram transportados em criotubos contendo meio de maturação (Apêndice 4) sob óleo mineral em atmosfera de 5% de CO₂ e 12% de O₂ e temperatura controlada de 36°C até o laboratório de PIVE do Departamento de Reprodução Animal da FCAV/UNESP.

4.7. Produção *in vitro* de embriões (PIVE)

4.7.1 Maturação *in vitro* dos oócitos (MIV)

A maturação ocorreu por 24 horas, sendo 6 a 8 horas de transporte nos criotubos e de 16 a 18 horas no laboratório em microgotas de 100 µL de meio de maturação (Apêndice 4), sob óleo mineral em incubadora com 5% de CO² em ar, temperatura de 38,5° C e umidade relativa de 95%.

4.7.2 Fecundação *in vitro* dos oócitos (FIV)

Para a fecundação, os oócitos foram lavados por duas vezes em meio TL-Sêmen (Apêndice 5) e uma vez em FIV gotas (Apêndice 6) para remoção do meio de MIV. Realizado o procedimento de lavagem, os oócitos de cada grupo experimental foram transferidos para gotas de 100 µL de FIV gotas sob óleo mineral. Foi utilizado sêmen convencional do mesmo touro para a fecundação de todos os oócitos do experimento. O sêmen foi descongelado em água a 35-37°C por 20-30 segundos e colocado sobre gradiente de Percoll (45% e 90%; Apêndice 7) para seleção e recuperação de espermatozóides móveis. Foram colhidos 30 µL do sedimento selecionado pelo Percoll e colocados em outro tubo ependorff contendo 30 µL de meio FIV gotas pré-equilibrado. Amostras de 5 µL de sêmen foram diluídas em 95 µL de meio FIV gotas para avaliação da motilidade e mais 5 µL de sêmen em 250 µL de água para cálculo da concentração. O volume do sedimento foi ajustado para concentração final de 25x10⁶ espermatozóides vivos/mL. A cada gota de fecundação, já contendo os oócitos foram adicionados 8 µL da suspensão de sêmen. Para a fecundação, espermatozóides e oócitos foram coincubados por 18 a 20 horas em atmosfera de 5% de CO₂, umidade relativa de 95% e temperatura de 38,5°C.

4.7.3 Cultivo *in vitro* dos embriões formados (CIV)

Após aproximadamente 20h de fecundação, os prováveis zigotos foram removidos das gotas de fecundação e lavados em três diferentes gotas de meio TL Sêmen (Apêndice 5), onde tiveram parte das células do cumulus removidas por sucessivas pipetagens. Depois foram lavados uma vez em meio de desenvolvimento (SOFaa; Apêndice 8) e transferidos para microgotas de 100 µL contendo o mesmo

meio. As trocas de meio (feeding) foram realizadas no terceiro e quinto dia de cultivo, onde eram retirados 50 μ L de meio de cada gota de cultivo e acrescentados 50 μ L de meio SOFaa fresco (pré equilibrado). Os embriões foram co-incubados em atmosfera de 5% de CO₂, umidade relativa de 95% e temperatura de 38,5°C.

4.7.4 Quantificação do número de clivagem e de desenvolvimento embrionário

Os embriões de duas a quatro células, 32 a 36 horas pós-fertilização, foram considerados clivados, e no sétimo dia da fecundação foi verificada a quantidade de embriões produzidos (mórula até blastocisto) e a taxa de produção de embriões (número de embriões produzidos/quantidade de oócitos viáveis).

4.8. Taxa de gestação das doadoras

Após o término do experimento, aos 75 dias pós-parto, as doadoras primíparas da raça Nelore entraram em estação de monta (EM) com exposição ao touro por um período de 2 meses (135 dias pós-parto). Trinta dias após a saída da estação de monta foi realizado o diagnóstico por ultrassom Aloka SSD-500 com transdutor linear transretal 5 MHz para verificar a taxa de gestação (Nº de animais gestantes/Nº total de doadoras/grupo).

4.9. Análise estatística

As variáveis dependentes [número de folículos observados, total de oócitos recuperados, número de oócitos viáveis e de clivagem, produção de embrião, taxa de oócitos viáveis (nº de oócitos viáveis/oócitos totais) e taxa de produção de embrião (nº de embriões produzidos/oócitos viáveis)] foram analisadas pelo método dos quadrados mínimos (HARVEY, 1960). Para a realização das análises foi utilizado o programa Statistical Analyses System (SAS System for Windows, 1991). O procedimento utilizado foi Análise de Variância pelo proc GLM e para as correlações utilizou-se o proc-CORR. As diferenças entre as médias (\pm ep) foram comparadas pelo teste de Tukey com significância de 5%.

Como os dados das variáveis dependentes não seguiram às premissas, os mesmos foram transformados em raiz quadrada ($x+1$) para os números ou $\text{Log}(x+1)$ para as taxas.

Para a análise utilizou-se o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijkl} = \mu + t_i + A_j(t_i) + B_k + I_{ik} + e_{ijkl}$$

em que:

Y_{ijkl} = variáveis dependentes;

μ = média paramétrica;

t_i = efeito fixo do i-ésimo tratamento ($i = 1, 2$ e 3);

A_j = efeito fixo do j-ésimo animal ($j = 1, \dots, 22$);

B_k = efeito fixo do k-ésimo período das aspirações ($k = 1, 2, 3$ e 4);

I_{ik} = efeito da interação entre o i-ésimo tratamento com o k-ésimo período das aspirações; e

e_{ijkl} = efeito do erro aleatório associado a cada observação.

O número de doadoras com CL, taxa de doadoras com CL (n° de doadoras que apresentaram CL/total de animais) e taxa de doadoras gestantes (n° gestantes no final da EM/total de animais) foram comparadas pelo teste χ^2 (qui-quadrado) ao nível de significância de 5%.

A concentração de progesterona plasmática foi analisada pelo teste Kruskal-Wallis (SIEGEL, 1975) pelo programa Graphpad Prism (GraphPad Prism version 4.0 for Windows; GraphPad Software). A comparação entre as médias ($\pm ep$) foi pelo teste de comparação múltipla de Dunn's com significância de 5%.

5. Resultados

Não foi detectado efeito de tratamento de suplementação, de dias de aspirações pós-parto e das interações sobre as variáveis: número de folículos, quantidade de oócitos totais, de oócitos viáveis e de clivados, PIVE, taxa de embriões produzidos, presença de CL, concentração de P₄ e taxa de doadoras gestantes (Tabelas 3 e 4; Figuras 3 a 7).

Tabela 3. Valores de P para efeitos principais de tratamento alimentar, dias de aspirações e interação entre esses fatores.

Resultados	Valores de P		
	Tratamento	Aspirações (dias)	Trat*Asp
Nº de folículos vizualizados	0,38	0,77	0,96
Nº de oócitos totais	0,56	0,84	0,95
Nº oócitos viáveis[#]	0,79	0,31	0,99
Taxa de oócitos viáveis* (%)	0,65	0,31	0,91
Nº de estruturas clivadas	0,78	0,84	0,68
Nº de embriões produzidos	0,39	0,11	0,23
Taxa de embriões** (%)	0,31	0,08	0,58
Nº de doadoras com CL	-	-	0,28
Taxa de doadoras com CL	0,17	-	-
[] P4	0,36	-	-
Taxa de doadoras gestantes (%)	0,37	-	-

Diferença significativa quando P < 0,05

[#] Viáveis = oócitos de grau I, II e III

* ócitos viáveis/oócitos totais

** Número de embriões/oócitos viáveis

As Figuras 3 e 4 representam a interação entre os dias de aspiração no pós-parto e os tratamentos de suplementações para vacas primíparas da raça Nelore. Não foi observado efeito para número de folículos, quantidade de oócitos totais, de oócitos viáveis, taxa de oócitos viáveis, número de clivagem, PIVE e taxa de embriões produzido.

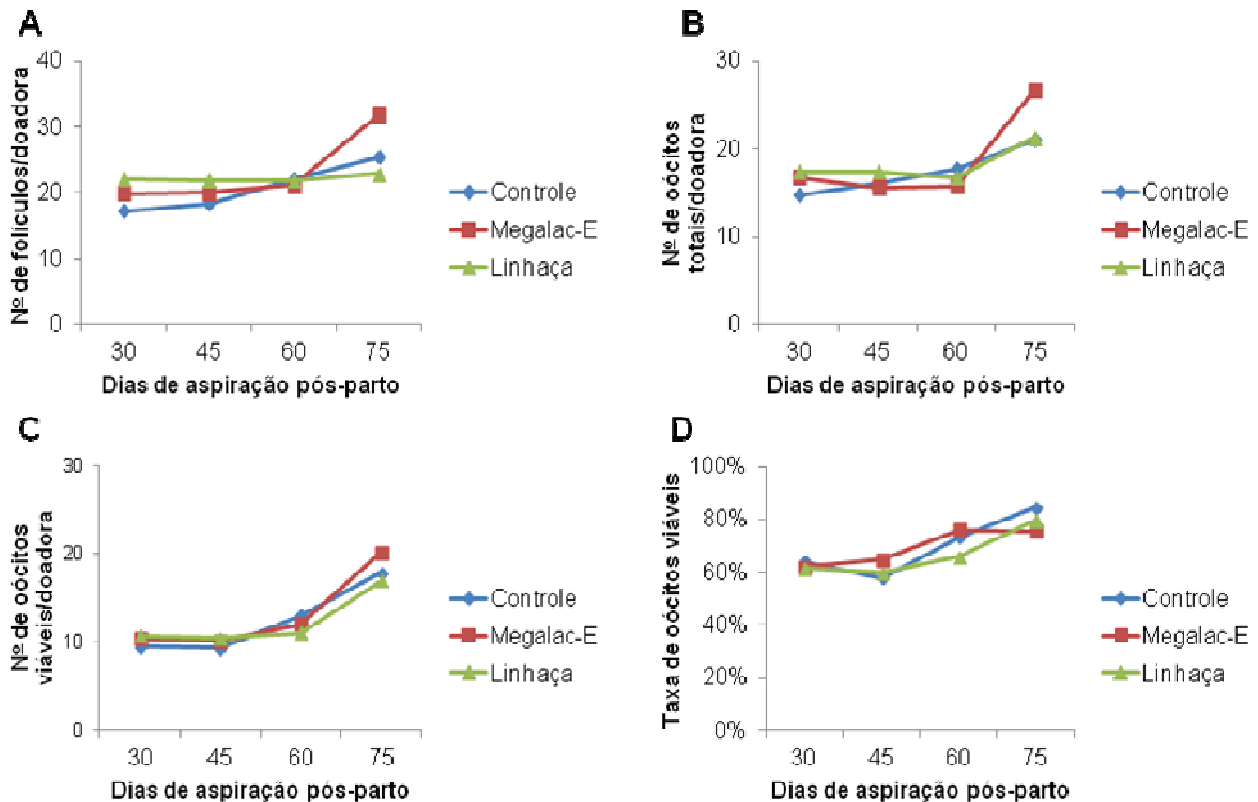
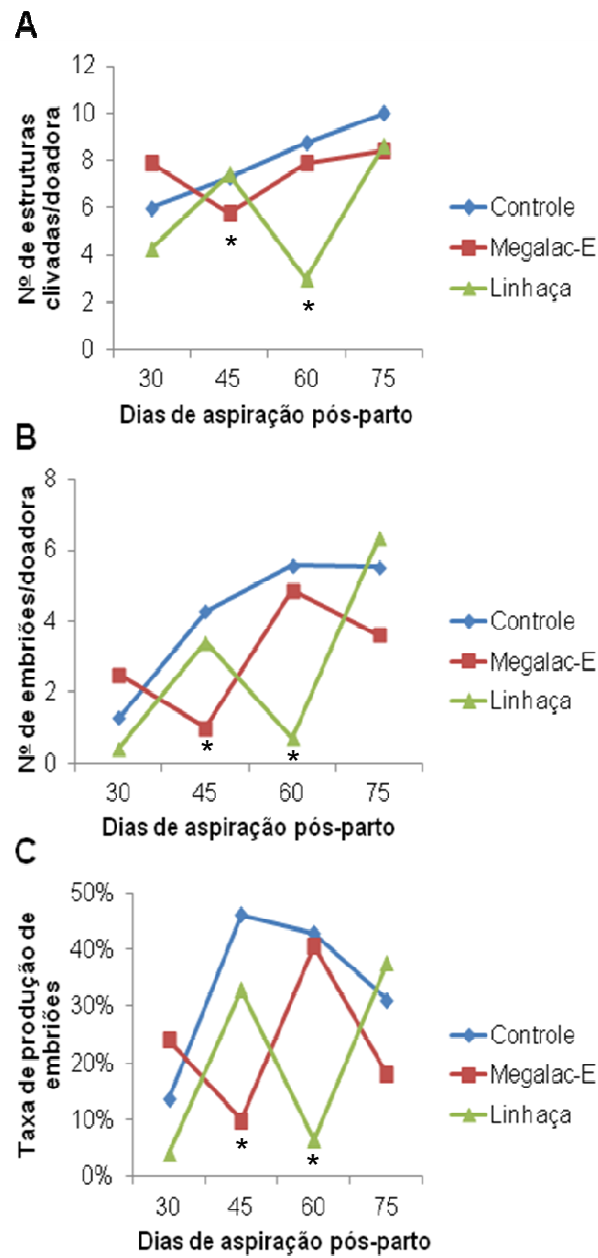


Figura 3. Efeitos da interação da suplementação com Megalac-E[®] e linhaça com os dias de aspiração pós-parto no número de folículos visualizados (A), quantidade de oócitos totais (B), de oócitos viáveis (C) e taxa de oócitos viáveis (D; quantidade de oócitos viáveis/total de oócitos) em doadoras primíparas da raça Nelore (média; $P > 0,05$).



* Nas aspirações dos dias 45 e 60 do pós-parto ocorreu contaminação do material aspirado e prejudicou o desenvolvimento embrionário.

Figura 4. Efeitos da interação da suplementação com Megalac-E[®] e linhaça com os dias de aspiração pós-parto na quantidade de estruturas clivadas (A), na PIVE (B) e taxa de produção de embriões (C) de doadoras primíparas da raça Nelore (média; $P > 0,05$).

A Tabela 4 apresenta os resultados do grupo controle e dos tratamentos com suplementações, em relação às médias de todas as aspirações para número de folículos, quantidade de oócitos totais, de oócitos viáveis e de clivados e PIVE.

Tabela 4. Efeitos da suplementação com Megalac-E[®] e linhaça na quantidade de oócitos aspirados e na PIVE de doadoras primíparas da raça Nelore (Média de todas as aspirações \pm erro padrão).

Resultados	Grupos de alimentação			Valor de P
	Controle (n=7)	Megalac-E [®] (n=8)	Linhaça (n=7)	
N^o de folículos visualizados	20,80 \pm 1,53	23,20 \pm 1,48	22,18 \pm 1,53	0,38
N^o de oócitos totais	17,37 \pm 1,56	18,68 \pm 1,51	18,21 \pm 1,56	0,56
N^o de oócitos viáveis[#]	12,38 \pm 1,12	13,16 \pm 1,08	12,27 \pm 1,12	0,79
Taxa de oócitos viáveis* (%)	71%	70%	67%	0,65
N^o de estruturas clivadas	8,00 \pm 0,82	7,47 \pm 0,8	5,84 \pm 0,82	0,78
N^o de embriões produzidos	4,17 \pm 0,7	3,00 \pm 0,68	2,73 \pm 0,7	0,39
Taxa de embriões** (%)	33%	22%	22%	0,31

Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna diferem entre si (P<0,05) pelo porc GLM do SAS

Os dados estão descritos como média \pm EP

As variáveis descritas como contagem representam o número de estruturas de todas as aspirações/doadora/aspiração

[#] Viáveis = oócitos de grau I, II e III

* Ócitos viáveis/oócitos totais

** Número de embriões/oócitos viáveis

A evolução dos dias pós-parto em relação ao número de folículos, quantidade de oócitos totais, de oócitos viáveis, taxa de oócitos viáveis, PIVE e taxa de embriões produzido estão representadas na Figura 5 pelas médias de todos os tratamentos de suplementação e controle.

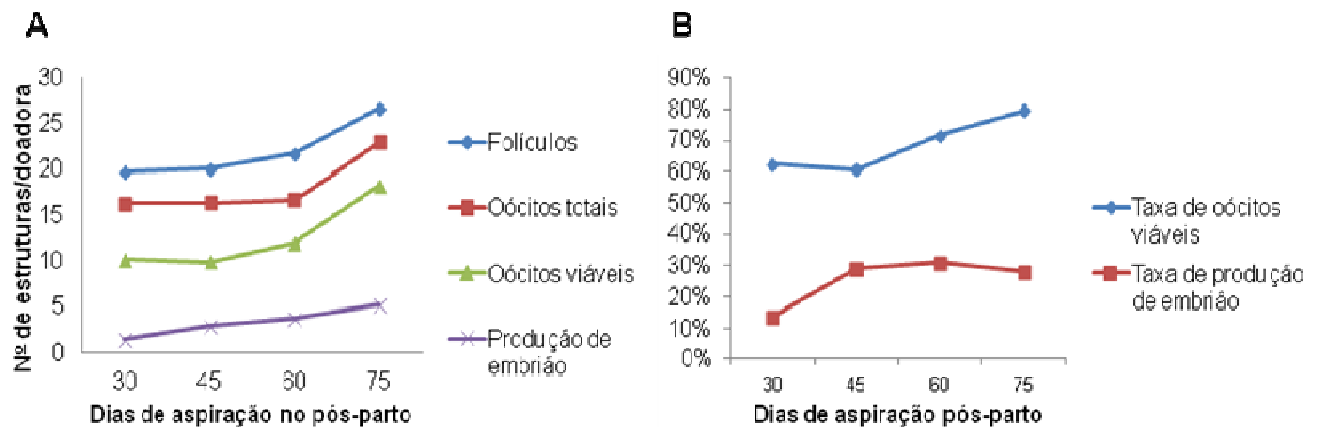


Figura 5. Efeito dos dias pós-parto no momento da aspiração de doadoras primíparas da raça Nelore sobre as variáveis: A - número de folículos, quantidade de oócitos totais, de oócitos viáveis e na PIVE. B - taxa de oócitos viáveis (viáveis/total de oócitos) e taxa de produção de embriões (nº de embriões produzidos/oócitos viáveis; Média; $P > 0,05$).

Na Figura 6 verifica-se que o grupo suplementado com linhaça apresentou numericamente maior quantidade de doadoras ciclando no pós-parto em relação aos outros grupos alimentares, mas estatisticamente não foi observado efeito de tratamento alimentar.

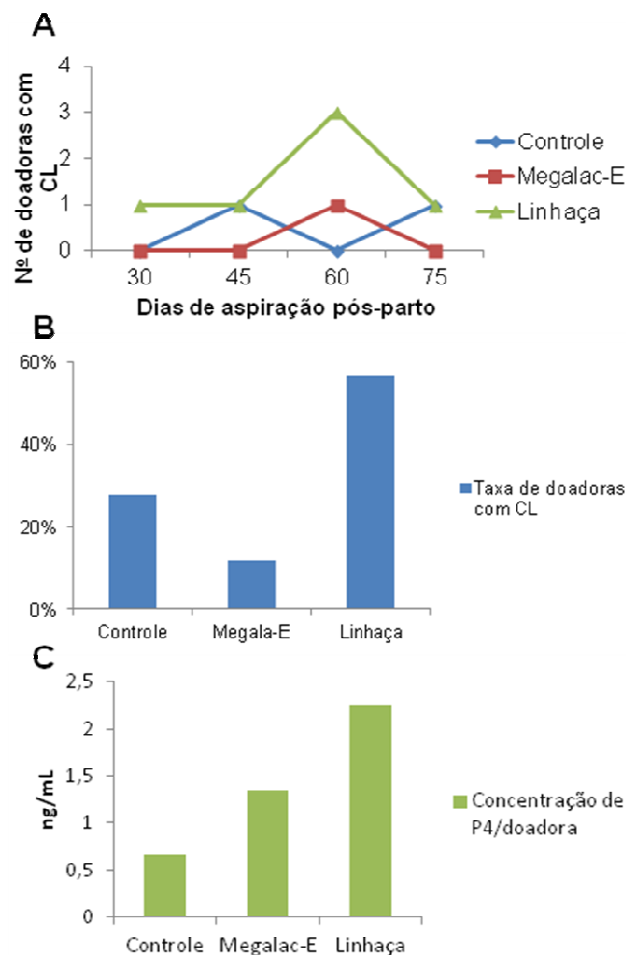


Figura 6. A - Número de doadoras primíparas da raça Nelore que apresentaram CL na interação entre os dias pós-parto no momento das aspiração e os tratamentos de suplementação. B - Taxa de doadoras que apresentaram CL (taxa de doadoras com CL/número total de doadoras) por tratamento alimentar durante todas as aspirações. C - Média de concentração de P₄ na terceira aspiração (60 dias pós-parto) por grupos de suplementação (P>0,05).

Após o término dos tratamentos alimentares (aos 75 dias pós-parto), as fêmeas entraram na estação de monta com exposição ao touro por 2 meses. Posteriormente à estação de monta, foi avaliada a taxa de gestação das doadoras e apesar de não ter sido detectado efeito de tratamento, foi observado maior valor numérico nos animais suplementados com dieta rica em ácidos graxos (Controle: 3/7 = 42,8%; Megalac-E[®]: 6/8 = 75%; Linhaça: 5/7 = 71,4%; Figura 7).

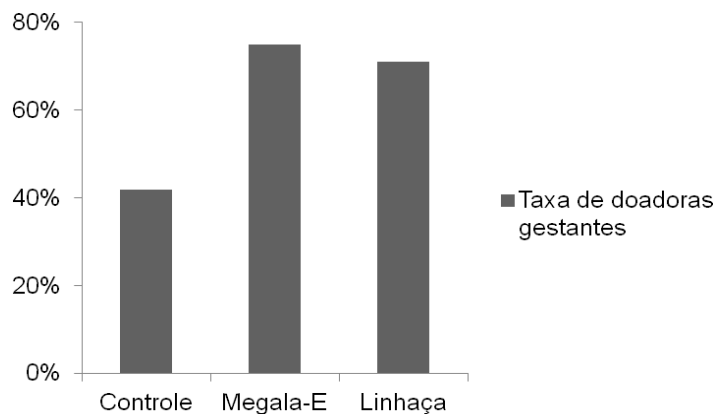


Figura 7. Taxa de gestação (número de doadoras gestantes/total de animais/tratamento) das doadoras primíparas da raça Nelore após a estação de monta ($P > 0,05$).

6. Discussão

As suplementações com AGs são formas de aumentar o nível energético das dietas, além de possuírem efeito na reprodução dos ruminantes (FUNSTON, 2004; RAES et al., 2004). Os AGPs, principalmente o n-3 e o n-6 têm importante efeito sobre os processos reprodutivos, como crescimento folicular ovariano, função do CL, produção de progesterona, ovulação, produção de oócito, de embrião, manutenção da gestação e do parto (ABAYASEKARA; WATHES, 1999; WATHES et al., 2007).

Com o objetivo de melhorar a PIVE e o retorno à ciclicidade no período pós-parto em doadoras primíparas da raça Nelore, foi fornecida suplementação com fontes de AGPs protegido (Megalac-E[®], rica principalmente em n-6) e não protegido (linhaça, rica principalmente em n-3) durante o pré e pós-parto. No entanto, não foram encontrados efeitos dessas dietas sobre o número de folículos observados nos dias das aspirações após o parto. Nogueira et al. (2012) também não relataram

diferença na quantidade de folículos em doadoras de corte suplementadas com Megalac-E[®]. Entretanto, maior taxa de crescimento folicular em animais que ingeriram dietas com altos níveis energéticos foram observadas por Armstrong et al. (2001) e Mollo et al. (2007). Além disso, Wathes et al. (2007) observaram maior número de folículos após 3 a 4 semanas de suplementação com AGPs.

As dietas com fontes de gordura protegida e não protegida fornecidas para doadoras primíparas Nelore não influenciaram a recuperação de oócitos totais e dos viáveis. Resultados diferentes foram relatados por Nogueira et al. (2012) que observaram aumento na recuperação de oócitos em novilhas Nelore suplementadas com AGPs. Em vacas leiteiras alimentadas com dieta rica em energia (AGs), Kendrick et al. (1999) observaram número de oócitos aumentado linearmente a partir de 30 (1,1) e 100 dias (2,1) pós-parto, diferente desse estudo onde não se verificou aumento na quantidade dos oócitos aspirados a partir dos dias pós-parto. Já, em ovelhas, Zeron et al. (2002) relataram maior número e melhor qualidade de oócitos quando suplementadas com óleo de peixe (rico em n-3) protegido por 13 semanas.

Uma das razões para a ausência de efeito da suplementação com AGPs nessas variáveis reprodutivas, no presente estudo, pode ter sido o fornecimento insuficiente de AGPs (100g de Megalac-E[®]/doadora/dia e 1kg de torta de linhaça/doadora/dia; GUARDIEIRO et al., 2010a), apesar desta quantidade de Megalac-E[®] ser a sugerida pelo fabricante e utilizada em experimentos que obtiveram resultados positivos na reprodução (SALES et al., 2007; LOPES et al., 2009).

Segundo Fouladi-Nashta et al. (2007), vacas leiteiras suplementadas com gordura tiveram maior taxa de clivagem e produção de blastocistos. No entanto, de acordo com Mollo et al. (2007) e Guardieiro et al. (2010b), em doadoras de corte suplementadas com AGPs não foi observado aumento no número de clivagem e da PIVE. Resultados semelhantes aos observados nesse estudo em doadoras primíparas da raça Nelore no período pós-parto alimentadas com AGPs protegido e não protegido. Outra razão que pode ter influenciado para a ausência de efeitos de tratamento de suplementação nessas variáveis de desenvolvimento embrionário é o pequeno número de animais avaliados por grupo.

As aspirações no período após o parto em doadoras bovinas é uma estratégia para PIVE que não afeta a reprodução e o intervalo entre partos na próxima monta

natural, IA ou IATF. Estudos anteriores relataram que o desenvolvimento da onda folicular retoma imediatamente após o parto em *Bos taurus* (MURPHY et al., 1990) e *Bos indicus* (RUIZ-CORTÉS; OLIVEIRA-ANGEL, 1999) e, por isso, a aplicação da OPU-PIV de embriões poderia ser usada para melhorar a produção e intervalo de tempo mais curto. No entanto, Aller et al. (2010) observaram uma baixa taxa de clivagem e de desenvolvimento de blastocistos em animais aspirados no pós-parto (30 à 77 dias).

De acordo com Ferreira (2011), doadoras da raça Gir não apresentaram efeito positivo nos dias de aspirações no pós-parto para quantidade de oócitos viáveis e PIVE. Resultado semelhante foi observado nesse estudo para doadoras primíparas da raça Nelore. Já segundo Lopes et al. (2006), doadoras da raça Holandesa aspiradas no pós-parto tiveram melhora na taxa média de produção de blastocisto (32 dias = 5%; 85 dias = 20%) de acordo com os dias pós-parto. Resultado este que demonstra a recuperação do sistema reprodutor das doadoras no período pós-parto.

Em estudos com suplementação de gordura para vacas no pós-parto foi observado retorno à atividade cíclica mais rápido (STAPLES et al., 1998), aumento na concentração de progesterona, no tamanho dos folículos (ZACHUT et al., 2008), na taxa de concepção e diminuição da mortalidade embrionária (RAES et al., 2004; PETIT; TWAGIRAMUNGU, 2006). De acordo com Artunduaga et al. (2010), vacas primíparas da raça Holandesa alimentadas com AGPs protegidos durante o pré e pós-parto tiveram melhor retorno à ciclicidade e desempenho reprodutivo. Já no presente estudo não foi observado efeito de tratamento para o retorno a ciclicidade em doadoras primíparas Nelore. Em relação à taxa de gestação no final da estação de monta de fêmeas primíparas da raça Nelore não houve efeito das suplementações com AGPs principalmente pelo pequeno número de animais analisados. No entanto, Lopes et al. (2009) e Peres et al. (2008) com maior número de fêmeas Nelore lactantes suplementadas com AGPs observaram aumento na taxa de gestação.

De acordo com Sartori e Mollo (2007) e Santos et al. (2008) a estratégia de suplementação com AGPs para vacas no período pré-parto é uma dieta rica em ácido linoleico (n-6), que aumenta a síntese de $PGF_{2\alpha}$ e atua no crescimento folicular, além de melhorar a involução uterina e restabelecer a ciclicidade

precocemente. E no pós-parto, com ácido linolênico (n-3), que reduz a síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ uterina, aumentando a fertilidade e diminuindo as perdas embrionárias precoces.

Outra hipótese para a ausência de efeitos da suplementação com AGPs, nesse estudo, para essas variáveis reprodutivas doadoras primíparas da raça Nelore pode ser a qualidade das três dietas fornecidas. Estas que satisfizeram as necessidades de manutenção, de lactação e reprodutiva dessas fêmeas no pós-parto mostrando efeito positivo no sistema reprodutivo tanto para os animais do grupo controle quanto para os suplementados com AGPs. Assim, é necessário mais estudos com maior número de doadoras e diferentes fontes de gordura para testar a real influência dos AGPs na quantidade de oócitos, PIVE, retorno à ciclicidade e taxa de gestação de fêmeas primíparas.

7. Conclusões

As suplementações com AGPs protegido (rico principalmente em n-6) e não protegido (rico principalmente em n-3) no pré e pós-parto não aumentaram a população folicular, a quantidade de oócitos recuperados, a produção *in vitro* de embriões, o retorno à ciclicidade e a taxa de gestação de fêmeas primíparas da raça Nelore.

Aspirações realizadas com maior número de dias pós-parto não permitiu a obtenção de maior número de oócitos e de produção *in vitro* de embriões.

8. Referências

ABAYASEKARA, D. R.; WATHES, D. C. Effects of altering dietary fatty acid composition on prostaglandin synthesis and fertility. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids**, London, v. 61, n. 5, p. 275-287, 1999.

ACNB (ASSOCIAÇÃO DOS CRIADORES DE NELORE DO BRASIL). A raça Nelore - História, São Paulo, divulgada em 2006. Disponível em: <<http://www.nelore.org.br/Raca/Historico>>. Acesso em: 23 fev. 2011.

ALLER, J. F.; MUCCI, N. C.; KAISER, G. G.; RÍOS, G.; CALLEJAS, S.S.; ALBERIO, R. H. Transvaginal follicular aspiration and embryo development in superstimulated early postpartum beef cows and subsequent fertility after artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 119, n. 1-2, p. 1–8, 2010.

ANUALPEC 2012. **Anuário da pecuária brasileira**. São Paulo: Instituto FNP, Consultoria e Comércio, 2012. p. 378.

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. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 64, n. 6, p. 1624-1632, 2001.

ARTUNDUAGA, M. A. T.; COELHO, S. G.; BORGES, A. M.; LANA, A. M. Q.; REIS, R. B.; CAMPOS, B. G.; SATURNINO, H. M.; SÁ FORTES, R. V.; COSTA, H. N. Primeira onda folicular e ovulação de vacas primíparas da raça Holandesa alimentadas com diferentes fontes energéticas durante o período de transição. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 62, n. 1, p. 116-123, 2010.

BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de Ruminantes. 2ª Edição**. Jaboticabal, SP: Funep, 2011, 616p.

BILBY, T. R.; BLOCK, J.; DO AMARAL, B. C.; SA FILHO, O.; SILVESTRE, F. T.; HANSEN, P. J.; STAPLES, C. R.; THATCHER, W. W. Effects of dietary unsaturated fatty acids on oocyte quality and follicular development in lactating dairy cows in summer. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 89, n. 10, p. 3891–3903, 2006.

BLONDIN, P.; BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUGU, H.; BARNERS, F.; SIRARD, M. A. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 66, n. 1, p. 38-43, 2002.

CERRI, R. L. A.; JUCHEM, S. O.; CHEBEL, R. C.; RUTIGLIANO, H. M.; BRUNO, R. G. S.; GALVÃO, K. N.; THATCHER, W. W.; SANTOS, J. E. P. 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**, New York, v. 92, n. 4, p. 1520-1531, 2009.

CHILDS, S.; CARTER, F.; LYNCH, C. O. Embryo yield and quality following dietary supplementation of beef heifers with n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA). **Theriogenology**, Philadelphia, v. 70, n. 8, p. 992-1003, 2008a.

CHILDS, S.; LYNCH, C. O.; HENNESSY, A. A. 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**, Cambridge, v. 2, n. 6, p. 883-893, 2008b.

CLARO JÚNIOR, I.; SÁ FILHO, O. G.; PERES, R. F. G.; AONO, F. H.S.; DAY, M. L.; VASCONCELOS, J. L. M. Reproductive performance of prepubertal *Bos indicus* heifers after progesterone-based treatments. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 74, n. 6, p. 903-911, 2010.

DAYAN, A.; WATANABE, M. R.; WATANABE, Y. F. Fatores que interferem na produção comercial de embriões FIV. **Arquivos da Faculdade de Veterinária-UFRGS**, Porto Alegre, v. 28, n. 1, p. 181-185, 2000.

DE LOSS, F.; KASTROP, P.; VAN MAURYK, P.; VANBENEDEN T. H.; KRUIP, T. A. Heterologous cell contacts and metabolics coupling in bovine cumulus oocyte complexes. **Molecular Reproduction and Development**, Hoboken, v. 28, n. 3, p. 255-259, 1991.

FERREIRA, M. B. D. **Obtenção de oócitos e produção *in vitro* de embriões em doadoras lactantes da raça gir (*bos taurus indicus*)**. 2011.. Tese de Doutorado em Medicina Veterinária (Reprodução Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2011

FOULADI-NASHTA, A. A.; GUTIERREZ, C. G.; GONG, J. G.; GARNSWORTHY, P. C.; WEBB, R. Impact of dietary fatty acids on oocyte quality and development in lactating dairy cows. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 77, n. 1, p. 9-17, 2007.

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

GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential *in vitro*. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 67, n. 1, p. 6–15, 2007.

GUARDIEIRO, M. M.; BASTOS, M. R.; MOURÃO, G. B.; CARRIJO, L. H. D.; MELO, E. O.; RUMPF, R.; SARTORI, R. Função ovariana de novilhas Nelore alimentadas com dieta suplementada com gordura protegida ruminal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 4, p. 408-414, 2010a.

GUARDIEIRO, M. M.; MACHADO, G. M.; BASTOS, M. R.; MOURÃO, G. B.; CARRIJO, L. H. D.; DODE, M. A. N.; SARTORI, R. Postcryopreservation viability of embryos from Nelore heifers supplemented with rumen-protected fat. **Reproduction, Fertility and Development**, Collingwood, v. 22, n. 1, p. 205-206, 2010b. Abstract.

HARVEY, W. R. **Least squares analysis of data with unequal subclass numbers.** Beltsville: ARS – USDA Publ. nº 20 – 8, 1960.

HAWKINS, D. E.; NISWENDER, K. D.; OSS, G. M. An increase in serum lipids increases luteal lipid content and alters the disappearance rate of progesterone in cows. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 73, n. 2, p. 541-545, 1995.

KENDRICK, K. W.; BAILEY, T. L.; GARST, A. S.; PRYOR, A. W.; AHMADZADEH, A.; AKERS, R. M.; EYESTONE, W. E.; PEARSON, R. E.; GWAZDAUSKAS, F. C. Effects of energy balance on hormones, ovarian activity and recovered oocytes in lactating Holstein cows using transvaginal follicular aspiration. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 82, n. 8, p. 1731–1740, 1999.

KIM, J. Y.; KINOSHITA, M.; OHNISHI, M.; FUKUI, Y. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen–thawed immature and *in vitro* matured bovine oocytes. **Reproduction**, Cambridge, v. 122, n. 1, p. 131-138, 2001.

LEEMPUT, E. E. van de; VOS, P. L. A. M.; ZEINSTRAS, E. C.; BEVERS, M. M.; WEIJDEN, G. C. van der; DIELEMAN, S. J. Improved *in vitro* embryo development using *in vivo* matured oocytes from heifers superovulated with a controlled preovulatory LH surge. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 52, n. 2, p. 335-349, 1999.

LOPES, A. S.; MATINUSEN, T.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Effect of days postpartum, breed and ovum pick-up scheme on bovine oocyte recovery and embryo development. **Reproduction in Domestic Animal**, Berlin, v. 41, n. 3, p. 196–203, 2006.

LOPES, C. N.; SCARPA, A. B.; CAPPELLOZZA, B. I.; COOKE, R. F.; VASCONCELOS, J. L. Effects of rumen-protected polyunsaturated fatty acid supplementation on reproductive performance of *Bos indicus* beef cows. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 87, n. 12, p. 3935-43, 2009.

MAGGIONI, D.; ROTTA, P. P.; ITO, R. H. **Efeito da nutrição sobre a reprodução de ruminantes: uma revisão.** PUBVET, Londrina, v. 2, n. 11, 2008.

MOLLO, M. R.; RUMPF, R.; MARTINS, A. C. Função ovariana em novilhas Nelore submetidas a alta ou baixa ingestão alimentar. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, p. 958, 2007. Suplemento 3, resumo.

MURPHY, M. G.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F. Pattern of follicular growth and resumption of ovarian activity in post-partum beef suckler cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 90, n. 2, p. 523-533, 1990.

NOGUEIRA, E.; SILVA, A. S. da; AMARAL, T. B.; ÍTAVO, L. C. V.; DIAS, A. M.; MINGOTI, G. Z. Follicular dynamics and production of oocytes in Young Nelore Heifers with energetic supplementation. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 41, n. 9, p. 2012-2017, 2012.

PERES, M. S.; SANTOS, P. G.; ANDRIGHETTO, C. Efeito da semente de girassol na taxa de concepção de vacas Nelore no período pós-parto. **Acta Scientiae Veterinariae**, Ribeirão Preto, v. 36, p. 639, suppl.2, 2008. Suplemento 2, resumo.

PESSUTI, O; MEZZADRI, F. P. Atualidade e perspectivas da pecuária paranaense. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 1., 2004, Londrina. **Anais...** Londrina: [s.n.], 2004. p. 21-27.

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

PETIT, H. V.; DEWHURST, R. J.; SCOLLAN, N. D. Milk production and composition, ovarian function and prostaglandin secretion of dairy cows fed omega-3 fats. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 85, n. 4, p. 889-899, 2002.

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**, Amsterdam, v. 113, n. 1-4, p. 199-221, 2004.

RIGOLON, L. P.; PRADO, I. N.; CAVALIERI, F. L. B.; NASCIMENTO, W. G.; COPOVILA, L. C.; RAMOS, F. S.; MOREIRA, F. B. Effect of the dry matter intake level on the sanguine profile of glucose, insulin, urea, estrogen and progesterone and concentration of IGF-I in the follicular liquid of crossbred heifers. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 52, n. 1, p. 61-68, 2009.

ROBINSON, R. S.; PUSHPAKUMARA, P. G. A.; CHENG, Z. Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on ovarian and uterine function in lactating dairy cows. **Reproduction**, New York, v. 124, n. 1, p. 119-131, 2002.

RUIZ-CORTÉS, Z. T.; OLIVERA-ANGEL, M. Ovarian follicular dynamics in suckled Zebu (*Bos indicus*) cows monitored by real time ultrasonography. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 54, n. 4, p. 211–220, 1999.

SALES, J. N. S.; SOUZA, A. H.; BENEDITO, T. B.; ARAÚJO, T. P. B.; PENTEADO, L.; SÁ FILHO, M. F.; CREPALDI, G. A.; BARUSELLI, P. S. Efeito da suplementação com Megalac-E sobre a taxa de prenhes de vacas Nelore primíparas inseminadas em tempo fixo. **Acta Scientiae Veterinarie**, Porto Alegre, v. 35, p. 1127, 2007.

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

SARTORI, R.; MOLLO, M. R. Influência da ingestão alimentar na fisiologia reprodutiva da fêmea bovina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, p. 197-204, 2007.

SAS, 1991. **SAS for P.C. 6.04**. Cary, NC: SAS Institute, 1991.

SIEGEL, S. **Estatística não paramétrica**. 2. ed. México: Trillas, 1975. 346 p.

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**, New York, v. 81, n. 3, p. 856–871, 1998.

TANAKA, T.; ARAI, M.; OHTANI, S.; UEMURA, S.; KUROIWA, T.; KIM, S.; KAMOMAE, H. Influence of parity on follicular dynamics and resumption of ovarian cycle in postpartum dairy cows. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 108, n. 1-2, p. 134-143, 2008.

THANGAVELU, G. M.; COLAZO, G.; AMBROSE, D. J. Diets enriched in unsaturated fatty acids enhance early embryonic development in lactating Holstein cows. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 68, n. 5, p. 949-957, 2007.

WAGNER, J. J.; LUSBY, K. S.; OLTJEN, J. W.; RAKESTRAW, J.; WETTEMANN, R. P.; WALTERS, L. E. Carcass composition in mature hereford cows: Estimation and effect on daily metabolizable energy requirement during winter. **Journal Animal Science**, v. 66, n. 3, p. 603-612, 1988.

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

ZACHUT, M.; ARIELI, A.; LEHRER, H.; ARGOV, N.; MOALLEM, U. Dietary unsaturated fatty acids influence preovulatory follicle characteristics in dairy cows. **Reproduction**, Cambridge, v. 135, n. 5, p. 683-692, 2008.

ZERON, Y.; SKLAN, D.; ARAV, A. Effect of polyunsaturated fatty acid supplementation on biophysical parameters and chilling sensitivity of ewe oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, Hoboken, v. 61, n. 2, p. 271-278, 2002.

CAPÍTULO 3 - EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM FONTES DE ÁCIDOS GRAXOS EM DOADORAS DA RAÇA HOLANDESA DURANTE O PRÉ E PÓS-PARTO SOBRE O RETORNO À CICLICIDADE, PRODUÇÃO *in vitro* DE EMBRIÕES E TAXA DE GESTAÇÃO

RESUMO – A suplementação de bovinos leiteiros com fontes de ácidos graxos poliinsaturados (AGPs) é uma prática utilizada para aumentar a energia das dietas. Os AGPs proporcionam efeitos positivos nas funções reprodutivas de importantes tecidos, incluindo hipotálamo, hipófise, ovários e útero. Tendo em vista o exposto idealizou-se o presente trabalho com o objetivo de avaliar as condições reprodutivas do pós-parto, número de folículos, presença de CL, concentração de P₄, quantidade de oócitos totais, de viáveis, a PIVE e a taxa de gestação de doadoras da raça Holandesa suplementadas com dieta rica em AGPs protegido (principalmente de n-6) e não protegido (principalmente n-3) durante o pré e pós-parto. As doadoras foram divididas aleatoriamente em 3 grupos, sendo que o grupo controle apresentava 6 fêmeas, o segundo grupo, com 5 animais que foram suplementados com uma fonte de gordura protegida contendo 100g/doadora/dia de Megalac-E[®] no pré-parto e 300g/doadora/dia no pós-parto e o terceiro grupo com 5 fêmeas suplementadas com uma fonte de gordura não protegida contendo 1kg/doadora/dia de torta de linhaça no pré-parto e 1,5kg/doadora/dia no pós-parto. As dietas foram fornecidas por 30 dias pré-parto e 60 dias pós-parto. Os animais foram submetidos à OPU nos dias 30, 45 e 60 pós-parto. Os oócitos recuperados foram selecionados e os viáveis submetidos aos procedimentos da PIVE. Os dados foram analisados pelo método dos quadrados mínimos utilizando Análise de Variância pelo proc GLM. As diferenças entre médias foram comparadas pelo teste de Tukey com significância de 5%. Não foi detectado efeito de tratamento de suplementação, de dias de aspirações pós-parto e das interações sobre as variáveis: quantidade de oócitos viáveis, taxa de oócitos viáveis, número de clivagem, de PIVE, taxa de doadoras com CL, concentração de P₄ e taxa de doadoras gestantes. No entanto, foi observado maior número de folículos e de oócitos totais no grupo suplementado com linhaça em relação ao grupo Megalac-E[®]. Este resultado pode ser explicado pelo efeito individual nos animais. A taxa de produção de embriões no dia 45 pós-parto do grupo controle foi maior em relação ao dia 30 do controle e ao dia 45 do grupo alimentado com Megalac-E[®]. Uma razão para esse resultado é as diferentes fases do ciclo estral que estes animais se encontravam nesses dias pós-parto. Os resultados do presente estudo demonstraram que aspirações realizadas no pós-parto de doadoras suplementadas com Megalac-E[®] e linhaça não aumentaram o número de oócitos viáveis, de clivados, a PIVE, retorno à ciclicidade e a taxa de gestação. Assim, é necessário mais estudos com maior número de doadoras e diferentes fontes de gordura para testar a real influência dos AGPs na reprodução de fêmeas produtoras de leite.

Palavras-chave: Ácidos graxos poliinsaturados, ciclicidade, embriões, Holandesa, oócitos e pós-parto.

1. Introdução

A bovinocultura de leite é um dos ramos da pecuária de grande importância para o mercado brasileiro. O rebanho leiteiro brasileiro possui cerca de 37,39 milhões de cabeças com uma produção de mais de 30 milhões de litros de leite por ano, apresentando o 6º lugar na produção mundial (ANUALPEC, 2012). Porém, o Brasil importa muito deste produto e assim é necessário melhorar o sistema de produção em termos nutricional e genético para que se possa subir de posição no ranking mundial.

O rebanho leiteiro brasileiro possui como principal raça a Holandesa (*Bos taurus taurus*), que é responsável por 70% da produção de leite (CNA, 2005). Segundo Galli et al. (2001) os resultados de PIVE de vacas Holandesas giram em torno de 20%. Ao contrário de animais *Bos indicus*, nos quais o número de oócitos recuperados e a PIVE é maior (PONTES et al., 2009). A menor produção de embriões apresentada pelas doadoras Holandesas é explicada por algumas causas, como a alta produção de leite, estresse térmico e sistema nutricional insuficiente para repor as energias de manutenção dos animais, influenciando negativamente na qualidade dos oócitos e na PIVE. Mas, com todas essas dificuldades a PIVE de leite no Brasil apresentou crescimento de mais de 27% em 2011, com mais de 83 mil embriões produzidos (VIANA, 2011).

No entanto, Prynce et al. (2004) observaram que alta produção de leite tem correlação com baixa eficiência reprodutiva em bovinos. Para amenizar este problema é necessário um balanço alimentar adequado para suprir a energia perdida em decorrência deste sistema de produção. De acordo com Gutiérrez et al. (1997) e Diskin et al. (2003), o estado nutricional dos animais influencia o crescimento dos folículos ovarianos. Além disso, as dietas podem afetar a capacidade de desenvolvimento dos oócitos e produção de embrião (O'CALLAGHAN et al., 2000). A suplementação lipídica proporciona efeitos positivos nas funções reprodutivas de importantes tecidos, incluindo hipotálamo, hipófise, ovários e útero (FUNSTON, 2004).

Segundo Staples et al. (1998) e Van Kneegsel et al. (2005), a suplementação com gordura é uma prática utilizada para aumentar a energia das dietas e é muito utilizada em gado de leite. As gorduras protegidas da bio-hidrogenação do rúmen

melhoram a qualidade de absorção dos AGPs pelas vacas leiteiras de alta produtividade; com isso, há um aumento do potencial de desenvolvimento dos oócitos e a PIVE (FOULADI-NASHTA et al., 2007). Além disso, essa suplementação aumenta a taxa de concepção em vacas de leite durante a lactação (BOKEN et al., 2005). O uso de AGPs de cadeia longa, particularmente o ácido linolênico (n-3), pode melhorar a qualidade oocitária e a taxa de gestação das fêmeas bovinas (COLAZO et al., 2004).

De acordo com Mc Namara et al. (2003), vacas Holandesas alimentadas com gordura protegida tiveram taxas de gestação maior que as alimentadas com outras gorduras ou outras fontes energéticas. Segundo Hawkins et al. (1995), vacas suplementadas com AGPs protegido apresentaram aumento nas concentrações séricas de colesterol bom (HDL) e P_4 plasmática. O colesterol é precursor de esteróides, portanto, aumentando as concentrações sanguíneas de colesterol, existe a possibilidade de, concomitantemente, elevar as concentrações circulantes de esteróides (WHYTE et al., 2007). Assim, dietas com alto teor de ácidos linoleico (n-6) e linolênico (n-3) contribuem para o aumento sérico na concentração de estradiol e progesterona em relação às outras dietas (WHYTE et al., 2007).

Segundo Juchem et al. (2010) vacas Holandesas que receberam suplementação rica em n-6 apresentaram taxa de gestação maior em comparação com animais alimentados com gordura saturada. Assim, supõe-se que os AGPs são importantes para a produção dos oócitos e de embriões (STURMEY et al., 2009). Os AGPs podem afetar diretamente a maturação dos oócitos e citoplasmática, através de alterações da composição de lipídios (BENDER et al., 2010) ou indiretamente, por influenciar as concentrações de PGs e outros metabólitos do fluido folicular (FOULADI-NASHTA et al., 2009).

Animais suplementados com linhaça, rica em n-3, no período pré e pós-parto apresentaram retorno à ciclicidade, pico de LH e E_2 mais precocemente em relação aos animais que não receberam esse tipo de dieta (ZACHUT et al., 2011). Isso explica as possíveis ligações entre os AGPs, metabólitos e início do estro.

Vacas de leite que receberam suplementação com semente de linhaça e óleo de peixe protegido, ambos rico em n-3, apresentaram menor mortalidade embrionária (PETIT; TWAGIRAMUNGU, 2006; CHILDS et al., 2008). Isso comprova

a importância dos AGPs na alimentação de vacas leiteiras de alta produção para a eficiência reprodutiva. Tendo em vista o exposto o presente estudo visou avaliar os efeitos das suplementações ricas em ácidos linoleico (n-6) e linolênico (n-3) protegidos ou não, no pré e pós-parto de fêmeas da raça Holandesa de alta produção leiteira sobre o retorno à ciclicidade, obtenção de oócitos, na PIVE e na taxa de gestação.

2. Hipóteses

➤ A suplementação com dieta rica em n-3 e n-6 adiantará o retorno à ciclicidade após o parto e aumentará a população folicular dos animais e isso se refletirá positivamente na taxa de gestação.

➤ Animais suplementados com dieta rica AGPs (n-3 e n-6) apresentarão maior número de oócitos aspirados, maiores quantidade de oócitos viáveis, além de aumento na PIVE.

➤ Animais aspirados com maior número de dias pós-parto suplementados com AGPs apresentarão maior quantidade de oócitos aspirados, maior número de oócitos viáveis e aumento na PIVE.

3. Objetivos

3.1 Geral

Avaliar as condições reprodutivas do pós-parto, número de folículos, quantidade de oócitos totais, de oócitos viáveis e a PIVE de doadoras da raça Holandesa (*Bos taurus taurus*) de alta produção leiteira suplementadas com dieta rica em AGPs (n-3 e n-6) protegidos ou não durante o pré e pós-parto.

3.2 Específicos

➤ Avaliar a quantidade de oócitos totais, de oócitos viáveis e a PIVE de doadoras da raça Holandesa alimentadas com dietas rica em AGPs (n-3 e n-6) no pré e pós-parto.

➤ Avaliar o retorno da ciclicidade após o parto, a concentração de progesterona plasmática, o número de folículos, presença de CL e a taxa de gestação de fêmeas da raça Holandesa suplementadas com dietas rica em AGPs (n-3 e n-6) no pré e pós-parto.

➤ Avaliar a relação de maior número de dias pós-parto de doadoras da raça Holandesa suplementadas com AGPs com o número de folículos, presença de CL, quantidade de oócitos totais, de oócitos viáveis e a PIVE.

4 Material e Métodos

Os produtos químicos foram adquiridos da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EUA). Aqueles de origem diferente estão informados no texto.

4.1. Local

O experimento foi realizado no Sítio Boa Esperança localizado no município de Irapuã, SP. As atividades laboratoriais foram realizadas no Departamento de Reprodução Animal da UNESP - Campus de Jaboticabal, SP no período de junho a outubro de 2012.

4.2. Doadoras de oócitos

Foram utilizadas 16 fêmeas adultas pluríparas da raça Holandesa (*Bos taurus taurus*) com escore corporal entre 2,5 e 3,5 (numa escala de 0 a 5, LOWMAM et al, 1976) e média de produção de 32 kg/dia. Estas fêmeas estavam em perfeitas condições sanitárias e reprodutivas, sem apresentar enfermidades e/ou patologias que afetassem a produção de embriões. Os animais foram mantidos com silagem de milho, cevada, ração (milho, farelo de soja e algodão, polpa cítrica, núcleo, ureia e bicarbonato de sódio), a pasto de Tyfton (*Cynodon spp*) e Mombaça (*Panicum maximum cv. Mombaça*) e com acesso a água e sal proteinado *ad libitum*. Não houve pré-seleção das doadoras em relação ao número de folículos presentes nos ovários e/ou recrutamento folicular e a divisão dos animais entre os tratamentos foi feita aleatoriamente de acordo com a data de parição.

4.3 Tratamento e Delineamento experimental

As doadoras foram divididas aleatoriamente em 3 grupos, sendo que o grupo controle apresentava 6 fêmeas as quais foram alimentadas com a dieta padrão da fazenda experimental. O segundo grupo, com 5 animais, que foram suplementados com uma fonte de gordura protegida contendo 100g/doadora/dia no pré-parto de Megalac-E[®] (Química Geral do Nordeste, Rio de Janeiro, Brasil) e 300g/doadora/dia no pós-parto (Apêndice 2). O terceiro grupo, com 5 fêmeas, que foram suplementadas com uma fonte de gordura não protegida contendo 1,0Kg/doadora/dia no pré-parto de torta de linhaça prensada a frio e 1,5Kg/doadora/dia no pós-parto (Figura 2).

Cada doadora recebeu 4kg de ração com o acréscimo de 100g de Megalac-E[®] ou 1,0Kg linhaça no pré-parto e no pós-parto receberam 11kg de ração com acréscimo de 300g de Megalac-E[®] ou 1,5Kg linhaça de acordo com o grupo experimental (Tabela 1). Essas suplementações tiveram início com 30 dias antes do parto e término com 60 dias pós-parto (Figura 2).

As doadoras do grupo suplementado com linhaça receberam-na em maior quantidade, quando comparado ao grupo suplementado com Megalac-E, por se tratar de uma fonte de AGPs não protegido à bio-hidrogenação do rúmen, este responsável pela degradação de mais de 80% dos n-3 e n-6 ingeridos na dieta (BERCHIELLI; PIRES; OLIVEIRA, 2011). Já, a quantidade de n-6 ingerida nas dietas, foi semelhante entre os grupos, mas no grupo Megalac-E[®] os AGPs são protegidos e sua absorção se dá no intestino delgado. Após a conclusão dos tratamentos os animais tiveram a mesma alimentação de rotina (mesma do grupo controle).

As dietas, oferecidas a cada grupo de doadoras, foram preparadas de acordo com as composições apresentadas nas Tabelas 1 e 2 e Figura 1. As análises bromatológicas foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da FCAV/UNESP e as análises cromatográficas no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas do Departamento de Tecnologia da FCAV/UNESP.

Tabela 1. Composição nutricional e análise bromatológica das rações utilizadas no experimento para doadoras da raça Holandesa.

Ração	Controle (Kg)		Megalac-E [®] (Kg)		Linhaça (Kg)	
	Pré-parto	Pós-parto	Pré-parto	Pós-parto	Pré-parto	Pós-parto
Ingredientes						
Farelo de Milho	450	388	450	388	450	388
Polpa Cítrica	200	200	200	200	200	200
Farelo de Algodão	100	100	100	100	100	100
Farelo de Trigo	100	0	100	0	100	0
Farelo de Soja	100	250	100	250	100	250
Núcleo	30	40	30	40	30	40
Uréia	20	10	20	10	20	10
Bicarbonato de sódio	0	10	0	10	0	10
Ingredientes						
Megalac - E[®]	0	0	0,1	0,3	0	0
Torta de Linhaça	0	0	0	0	1	1,5
Índices		(%)		(%)		(%)
Matéria Seca		89,97		90,32		90,39
Proteína Bruta		32,05		26,28		27,26
Extrato etéreo		2,55		3,11		3,15

Tabela 2. Análise cromatográfica das rações utilizadas no experimento para doadoras da raça Holandesa.

Ácidos	Nomenclatura	Controle (%)	Megalac-E [®] (%)	Linhaça (%)
Cáprico	C10:0	0,04	0,05	0,03
Láurico	C12:0	0,04	0,03	0,03
Mirístico	C14:0	0,17	0,15	0,14
pentadecanoico	C15:0	0,03	0	0,03
Palmitico	C16:0	18,98	17,22	15,53
Palmitoleico	C16:1	0,21	0,19	0,18
heptadecanoico	C17:0	0,14	0,12	0,11
heptadecenoico	C 17:1	0,04	0,04	0,04
Esteárico	C18:0	3,59	3,14	3,83
Oleico	C18:1n9c	29,68	28,33	27,86
cis-vacênico	C18:1n7	1,14	0,95	0,94
Linoleico (n-6)	C18:2n6c	41,85	46,5	37,65
α linolenico (n-3)	C18:3n3	2,78	2,08	12,53
Araquídico	C 20:0	0,49	0,47	0,41
Eicosenoico	C20:1n9	0,2	0,2	0,18
Behênico	C22:0	0,3	0,24	0,22
Tricosanóico	C23:0	0,05	0,03	0,05
Lignocérico	C24:0	0,3	0,26	0,24
	Total	100	100	100

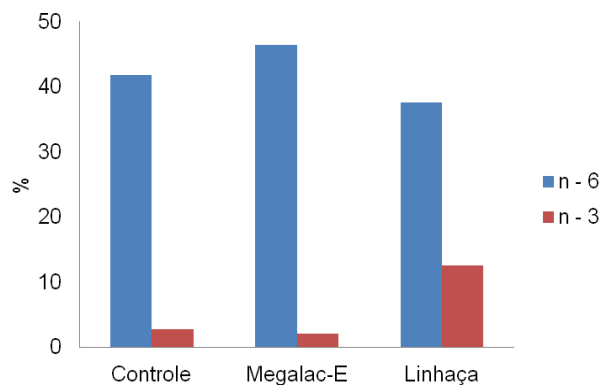


Figura 3. Composição de ácido linoleico (n-6) e ácido linolênico (n-3) nas dietas dos grupos experimentais para doadoras da raça Holandesa.

4.4. Quantificação do número de folículos, presença de CL e concentração de P₄

O número de folículos, o número de doadoras com CL e a taxa de doadoras com CL (n^o de doadoras com CL/total de animais) foram quantificados por ultrassonografia nos dias 30, 45 e 60 do pós-parto. Para o exame ultrassonográfico foi utilizado o aparelho de ultrassom Aloka SSD-500 com transdutor linear transretal de 5 MHz (Figura 2).

Para quantificação das concentrações plasmáticas de P₄ foram realizadas colheitas de sangue nas três aspirações (entre o 25^o e 32^o dia pós-parto e no 45^o e 60^o dia; Figura 2). O sangue foi colhido por venopunção da jugular em tubos do tipo vacuitainer heparinizados de 10 mL (BD, São Paulo, Brasil). Cada amostra foi acondicionada em geladeira com temperatura entre 4 e 6°C (por no máximo uma hora e meia) e posteriormente centrifugada por 20 minutos a 3600g. Depois da centrifugação, foram retirados cerca de 3 ml de plasma sanguíneo que, por sua vez, foram divididos em duas alíquotas em eppendorfs de 2 mL e acondicionados em freezer -24°C.

As dosagens foram realizadas no Laboratório Endomed Patologia Clínica de Jaboticabal. O método de utilizado foi quimioluminescência (SiemensTM Progesterone kit, Los Angeles, USA). A dose mínima detectável foi 0,2 ng/mL. Foi considerada atividade lútea concentração plasmática de P₄ > 1,0 ng/mL (SILVESTRE, et al., 2011).

4.5. Técnica de Aspiração Folicular

A primeira aspiração foi realizada entre o 25^o e o 32^o dia do pós-parto e as demais com intervalo de 15 dias (45^o, 60^o), totalizando 3 aspirações (Figura 2).

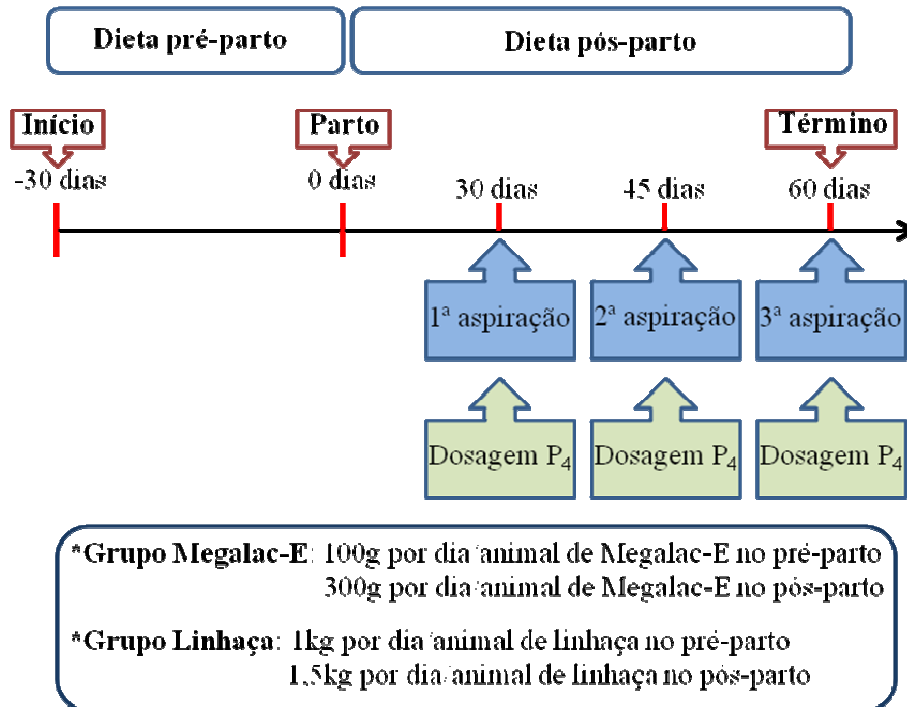


Figura 2. Representação esquemática do protocolo experimental de alimentação e aspiração para doadoras da raça Holandesa.

O procedimento de aspiração folicular foi realizado utilizando-se um equipamento de ultrassom Aloka SSD 500 com transdutor microconvexo de 5 MHz, conectado na guia de aspiração transvaginal. As aspirações foram realizadas com agulhas hipodérmicas descartáveis 20G (0,9 x 50 mm, Terumo, São Paulo, Brasil), e sistema de aspiração Cook (Cook, Queensland, Australia) acoplado em tubos de polipropileno tipo Falcon de 50 mL. A pressão de vácuo foi obtida com uma bomba de vácuo (WTA, Cravinhos, Brasil), ajustada entre 70 e 90 mm Hg.

Previamente às aspirações, foi realizada anestesia epidural baixa com 5 mL de lidocaína 2% (Lidovet, Bravet, Rio de Janeiro, Brasil) e higienização da região perineal com água e álcool 70%. A guia de aspiração acoplada ao transdutor do ultrassom foi inserida até o fornix vaginal de cada lado correspondente ao ovário e, com auxílio de manipulação retal, os ovários foram posicionados na linha de punção,

indicado na tela do ultrassom, e a bomba de vácuo foi acionada iniciando as aspirações dos folículos observados.

As lavagens das agulhas foram realizadas com o mesmo meio de armazenamento dos oócitos, qual seja PBS (Phosphate-buffered saline; Apêndice 3) acrescido de 10.000 UI/L de Heparina (Liquemine, Roche Químicos e Farmacêuticos, Rio de Janeiro, Brasil), acoplado a um tubo de 50 mL tipo Falcon. Logo após as aspirações o sistema foi lavado com o meio de punção e o material coletado encaminhado imediatamente para o laboratório montado na fazenda.

4.6. Lavagem, seleção e transporte dos oócitos

O material aspirado foi transportado para o laboratório, e lavado com PBS em filtro de colheita de embriões até que o conteúdo do filtro se tornasse translúcido. O sedimento restante no filtro foi depositado em placas de Petri de 90 mm, para a procura e seleção dos oócitos. Posteriormente, foi efetuada a contagem e avaliação da qualidade dos oócitos recuperados, com uso de estereomicroscópio, e os mesmos foram classificados em graus de I à V (DE LOOS et al., 1991), sendo que:

f) Grau I: revestimento com multicamadas de cumulus compacto e ooplasma homogêneo;

g) Grau II: revestimento de 3 a 5 camadas de cumulus compacto, ooplasma homogêneo ou com regiões escuras na periferia;

h) Grau III: pouco revestimento de células do cumulus (1 a 3 camadas), ooplasma irregular com picnose;

i) Grau IV ou atrésico: cumulus expandido com células escuras e em grumos;

j) Grau V ou Desnudo: sem camadas do cumulus e com ooplasma uniforme ou com granulações.

Após a avaliação, os oócitos classificados como grau I, II e III foram transportados em criotubos contendo meio de maturação (Apêndice 4) sob óleo mineral em atmosfera de 5% de CO₂ e 12% de O₂ e temperatura controlada de 36°C até o laboratório de PIVE do Departamento de Reprodução Animal da FCAV/UNESP. O tempo médio de transporte até o laboratório foi de 6 a 8 horas.

4.7. Produção *in vitro* de embriões (PIVE)

4.7.1 Maturação *in vitro* dos oócitos (MIV)

A maturação ocorreu por 24 horas, sendo 6 a 8 horas de transporte nos criotubos e de 16 a 18 horas no laboratório, em microgotas de 100 µL de meio de maturação (Apêndice 4) sob óleo mineral, em incubadora com 5% de CO² em ar, temperatura de 38,5° C e umidade relativa de 95%.

4.7.2 Fecundação *in vitro* dos oócitos (FIV)

Para a fecundação, os oócitos foram lavados por duas vezes em meio TL-Sêmen (Apêndice 5) e uma vez em FIV gotas (Apêndice 6) para remoção do meio de MIV. Realizado o procedimento de lavagem, os oócitos de cada grupo experimental foram transferidos para gotas de 100 µL de FIV gotas sob óleo mineral. Foi utilizado sêmen sexado do mesmo touro para a fecundação de todos os oócitos do experimento. O sêmen foi descongelado em água a 35-37°C por 20-30 segundos e colocado sobre gradiente de Percoll (45% e 90%; Apêndice 7) para seleção e recuperação de espermatozóides móveis. Foram colhidos 30 µL do sedimento selecionado pelo Percoll e colocados em outro tubo ependorff contendo 30 µL de meio FIV gotas pré-equilibrado. Amostras de 5 µL de sêmen foram diluídas em 95 µL de meio FIV gotas para avaliação da motilidade e mais 5 µL de sêmen em 250 µL de água para cálculo da concentração. O volume do sedimento foi ajustado para concentração final de 25x10⁶ espermatozóides vivos/mL. A cada gota de fecundação, já contendo os oócitos, foram adicionados 8 µL da suspensão de sêmen. Para a fecundação, espermatozóides e oócitos foram coincubados por 18 a 20 horas em atmosfera de 5% de CO₂, umidade relativa de 95% e temperatura de 38,5°C.

4.7.3 Cultivo *in vitro* dos embriões formados (CIV)

Após aproximadamente 20h de fecundação, os prováveis zigotos foram removidos das gotas de fecundação e lavados em três diferentes gotas de meio TL Sêmen (Apêndice 5), onde tiveram parte das células do cumulus removidas por sucessivas pipetagens. Depois foram lavados uma vez em meio de desenvolvimento (SOFaa; Apêndice 8) e transferidos para microgotas de 100 µL contendo o mesmo

meio. As trocas de meio (feeding) foram realizadas no terceiro e quinto dia de cultivo, onde eram retirados 50 μL de meio de cada gota de cultivo e acrescentados 50 μL de meio SOFaa fresco (pré equilibrado). Os embriões foram co-incubados em atmosfera de 5% de CO_2 , umidade relativa de 95% e temperatura de 38,5°C.

4.7.4 Quantificação do número de clivagem e de desenvolvimento embrionário

Os embriões de duas a quatro células, 32 a 36 horas pós-fertilização, foram considerados clivados, e no sétimo dia da fecundação foi verificada a quantidade de embriões produzidos (mórula até blastocisto) e a taxa de produção de embriões (número de embriões produzidos/ quantidade de oócitos viáveis).

4.8. Taxa de gestação das doadoras

Durante os procedimentos nutricionais e de aspiração as doadoras ficaram em observação de cio e foram inseminadas 12 horas após a manifestação do estro. Trinta dias depois de cada IA foi realizado diagnóstico por ultrassom (Aloka SSD-500 com transdutor linear transretal de 5 MHz) para verificar a taxa de gestação (N° de animais gestantes/ N° total de doadoras/grupo).

4.9. Transferência dos Embriões

Os embriões produzidos foram transferidos em vacas Holandesas receptoras. Estes animais foram sincronizados por protocolos hormonais (Figura 3).

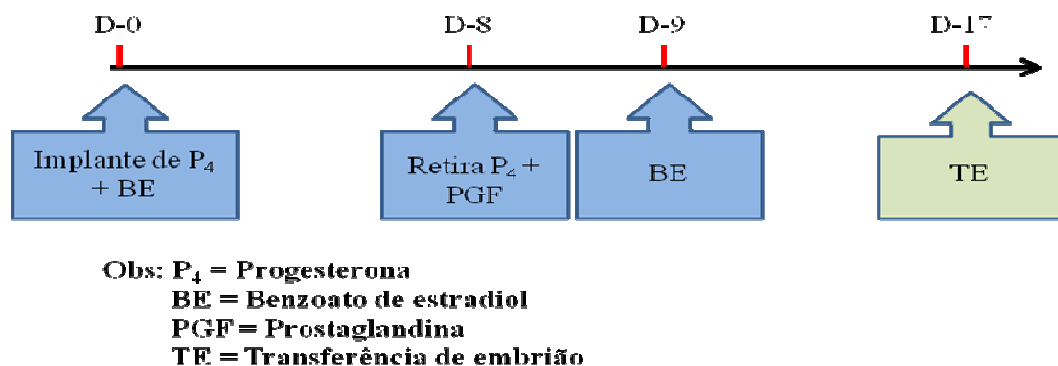


Figura 3. Representação esquemática do protocolo hormonal para sincronização das receptoras.

Os embriões foram envasados na palheta com meio HSO (Apêndice 9) no laboratório de PIVE e depois foram conduzidos para o local de transferência com temperatura controlada à 36°C. Em seguida, montou-se a palheta na bacia e colocou-a no inculador de embrião, enquanto isso a receptora foi anestesiada e higienizada. O embrião foi depositado no corno uterino epilateral ao CL desenvolvido pelo método transcervical. As aspirações foliculares nas doadoras foram realizadas sempre no D-9 do protocolo das receptoras e a FIV no D-10.

O diagnóstico de gestação nas receptoras ocorreu 30 dias após a FIV, ou seja, 23 dias após a transferência dos embriões. Foi utilizado ultrassom Aloka SSD-500 com transdutor linear transretal 5 MHz.

4.10. Análise estatística

As variáveis dependentes [número de folículos observados, total de oócitos recuperados, número de oócitos viáveis e de clivagem, produção de embrião, taxa de oócitos viáveis (nº de oócitos viáveis/oócitos totais), taxa de produção de embrião (nº de embriões produzidos/oócitos viáveis) e concentração de progesterona plasmática] foram analisadas pelo método dos quadrados mínimos (HARVEY, 1960). Para a realização das análises foi utilizado o programa Statistical Analyses System (SAS System for Windows, 1991). O procedimento utilizado foi Análise de Variância pelo proc GLM e para as correlações utilizou-se o proc-CORR. As diferenças entre as médias ($\pm dp$) foram comparadas pelo teste de Tukey com significância de 5%.

Como os dados não seguiram às premissas, os mesmos foram transformados em raiz quadrada ($x+1$) para os números ou $\text{Log}(x+1)$ para as taxas.

Para a análise utilizou-se o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijkl} = \mu + t_i + A_j(t_i) + B_k + I_{ik} + e_{ijkl}$$

em que:

Y_{ijkl} = variáveis dependentes;

μ = média paramétrica;

t_i = efeito fixo do i-ésimo tratamento ($i = 1, 2$ e 3);

A_j = efeito fixo do j-ésimo animal ($j = 1, \dots, 22$);

B_k = efeito fixo do k-ésimo período das aspirações ($k = 1, 2, 3$ e 4);

I_{ik} = efeito da interação entre o i-ésimo tratamento com o k-ésimo período das aspirações; e

e_{ijkl} = efeito do erro aleatório associado a cada observação.

Taxa de doadoras com CL (n° que apresentaram CL/total de animais), taxa de doadoras gestantes (n° gestantes no final da EM/total de animais) e taxa de receptoras gestantes (n° de receptoras gestantes/ n° de embriões produzidos) foram comparadas pelo teste χ^2 (qui-quadrado) ao nível de significância de 5%.

5. Resultados

Não foi detectado efeito de tratamento de suplementação, de dias de aspirações pós-parto e das interações sobre as variáveis: quantidade de oócitos viáveis e de clivados, PIVE, presença de CL, concentração de P_4 , taxa de doadoras gestantes e taxa de receptoras gestantes (Tabelas 3 e 4; Figuras 4 a 9).

Tabela 3. Valores de P para efeitos principais de tratamento alimentar, dias de aspirações e interação entre esses fatores.

Resultados	Valores de P		
	Tratamento	Aspirações (dias)	Trat* Asp
Nº de folículos visualizados	0,01	0,36	0,94
Nº de oócitos totais	0,057	0,11	0,52
Nº oócitos viáveis [#]	0,12	0,33	0,73
Taxa de oócitos viáveis* (%)	0,94	0,12	0,52
Nº de estruturas clivadas	0,14	0,23	0,45
Nº de embriões produzidos	0,15	0,09	0,11
Taxa de embriões** (%)	0,18	0,12	0,0018
Taxa de doadoras com CL	-	-	0,11
[] P_4	0,59	0,31	0,34
Taxa de doadoras gestantes (%)	0,81	-	-
Taxa de receptoras gestantes (%)	0,56	-	-

Diferença significativa quando $P < 0,05$

[#] Viáveis = oócitos de grau I, II e III

* ócitos viáveis/oócitos totais

** Número de embriões/oócitos viáveis

As Figuras 4 e 5 representam a interação entre os dias de aspiração no pós-parto e os tratamentos de suplementações para vacas da raça Holandesa. Não foi observado efeito para número de folículos, quantidade de oócitos totais, de oócitos viáveis, taxa de oócitos viáveis, número de clivagem e PIVE. A taxa de produção de embriões foi maior na aspiração do dia 45 pós-parto no grupo controle (47%) em relação ao dia 30 do mesmo grupo (0%) e ao dia 45 do grupo Megalac-E®.

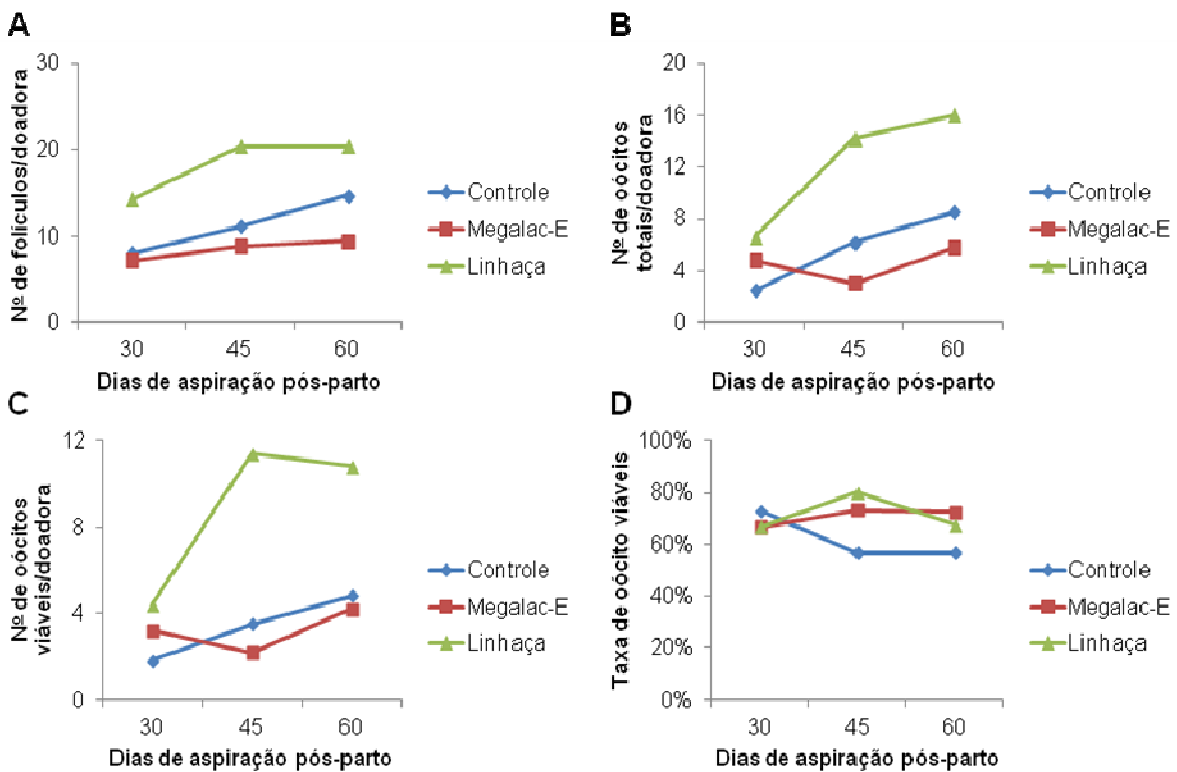
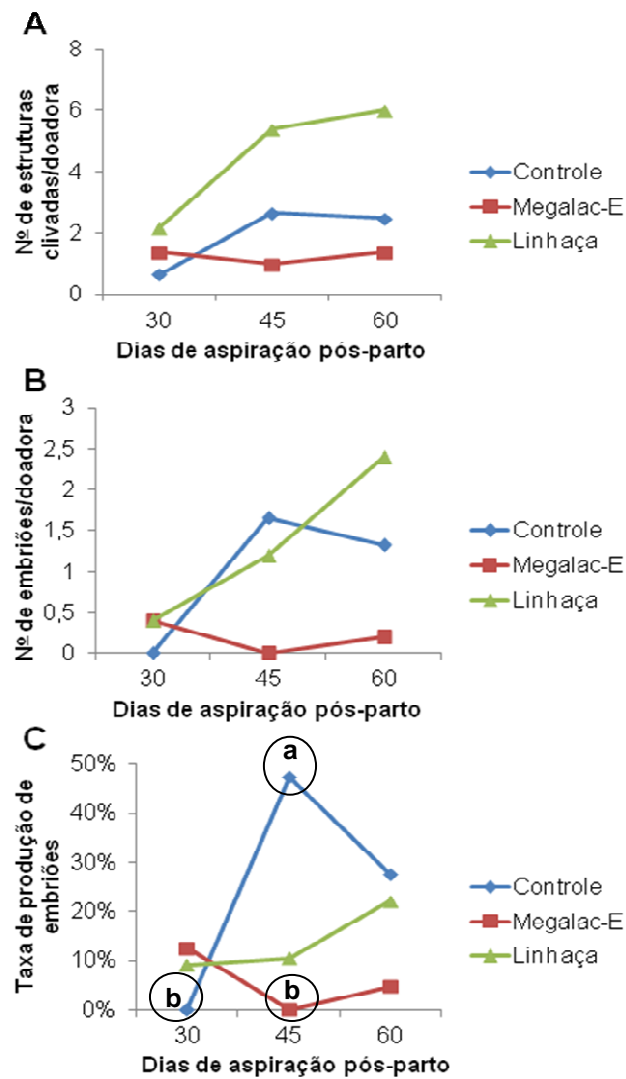


Figura 4. Efeitos da interação da suplementação com Megalac-E® e linhaça com os dias de aspiração pós-parto no número de folículos visualizados (A), quantidade de oócitos totais (B), de oócitos viáveis (C) e taxa de oócitos viáveis (D; quantidade de oócitos viáveis/total de oócitos) em doadoras da raça Holandesa (média; $P > 0,05$).



*Médias marcadas por letras distintas na mesma figura diferem entre si ($P < 0,05$) pelo proc GLM do SAS.

Figura 5. Efeitos da interação da suplementação com Megalac-E® e linhaça com os dias de aspiração pós-parto na quantidade de estruturas clivadas (A), na PIVE (B; $P > 0,05$) e taxa de produção de embriões (C; $P = 0,0018$) de doadoras da raça Holandesa.

A Tabela 4 apresenta os resultados do grupo controle e dos tratamentos com suplementações, em relação às médias de todas as aspirações para número de folículos, quantidade de oócitos totais, de oócitos viáveis e de clivados e PIVE. O número de folículos observado por doadora suplementada com linhaça em todas as aspirações foi maior em relação ao grupo suplementado com Megalac-E[®]. E o grupo suplementado com linhaça apresentou tendência à maior quantidade de oócitos totais aspirados.

Tabela 4. Efeito da suplementação com Megalac-E[®] e linhaça na quantidade de oócitos aspirados e na PIVE de doadoras da raça Holandesa (Média de todas as aspirações \pm erro padrão).

Resultados	Grupos de alimentação			Valor de P
	Controle	Megalac-E [®]	Linhaça	
Nº de folículos visualizados	11,27 \pm 1,49 ^{ab}	8,46 \pm 1,63 ^a	18,33 \pm 1,63 ^b	0,01
Nº de oócitos totais	5,72 \pm 1,24 ^a	4,53 \pm 1,36 ^a	12,26 \pm 1,36 ^b	0,057
Nº de oócitos viáveis[#]	3,38 \pm 1,22	3,20 \pm 1,34	8,86 \pm 1,34	0,12
Taxa de oócitos viáveis* (%)	59%	70%	72%	0,94
Nº de estruturas clivadas	1,94 \pm 0,52	1,26 \pm 0,57	4,53 \pm 0,57	0,14
Nº de embriões produzidos	1,00 \pm 0,24	0,20 \pm 0,27	1,33 \pm 0,27	0,15
Taxa de embriões** (%)	29%	6%	15%	0,18

Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna diferem entre si (P<0,05) pelo porc GLM do SAS

Os dados estão descritos como média \pm DP

As variáveis descritas como contagem representam o número de estruturas/doadora/aspiração

[#] Viáveis = oócitos de grau I, II e III

* ócitos viáveis/oócitos totais

** Número de embriões/oócitos viáveis

A evolução dos dias pós-parto em relação ao número de folículos, quantidade de oócitos totais, de oócitos viáveis, taxa de oócitos viáveis, número de clivagem, PIVE e taxa de embriões produzido esta representada na Figura 6 pelas médias de todos os tratamentos de suplementação e controle.

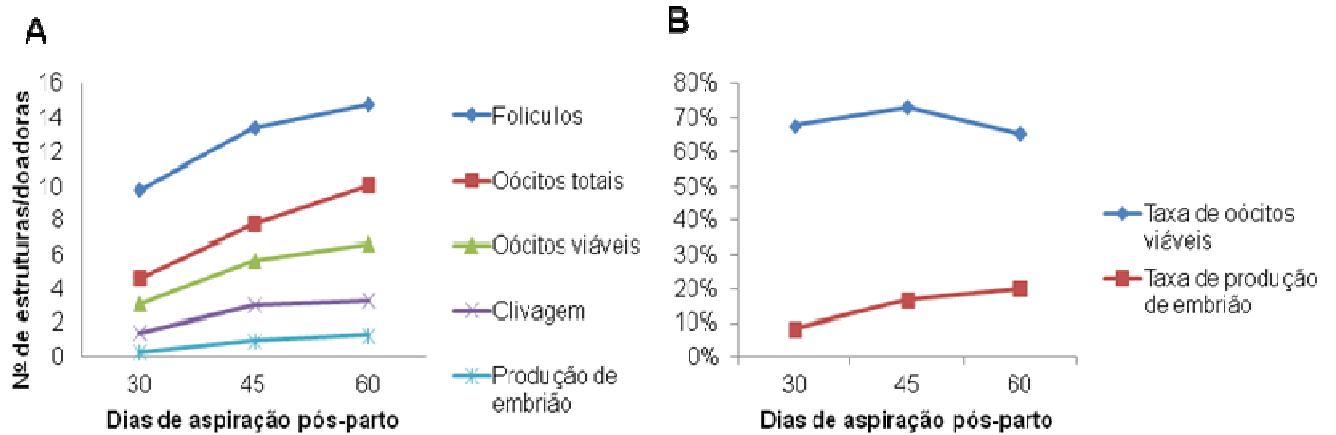


Figura 6. Efeito dos dias pós-parto no momento da aspiração de doadoras da raça Holandesa sobre as variáveis: A - número de folículos, quantidade de oócitos totais, de oócitos viáveis, de clivagem e na PIVE. B - taxa de oócitos viáveis (viáveis/total de oócitos) e taxa de produção de embriões (nº de embriões produzidos/oócitos viáveis; Média; $P > 0,05$).

Na Figura 7 verifica-se que não houve efeito de tratamento, de dias de aspirações pós-parto e da interação para a presença de CL e concentração de P_4 . Nota-se que todas as doadoras dos três grupos ciclaram até 60 dias pós-parto, e que a concentração de P_4 do grupo suplementado com linhaça tendeu a aumentar em linha crescente desde os 30 dias pós-parto.

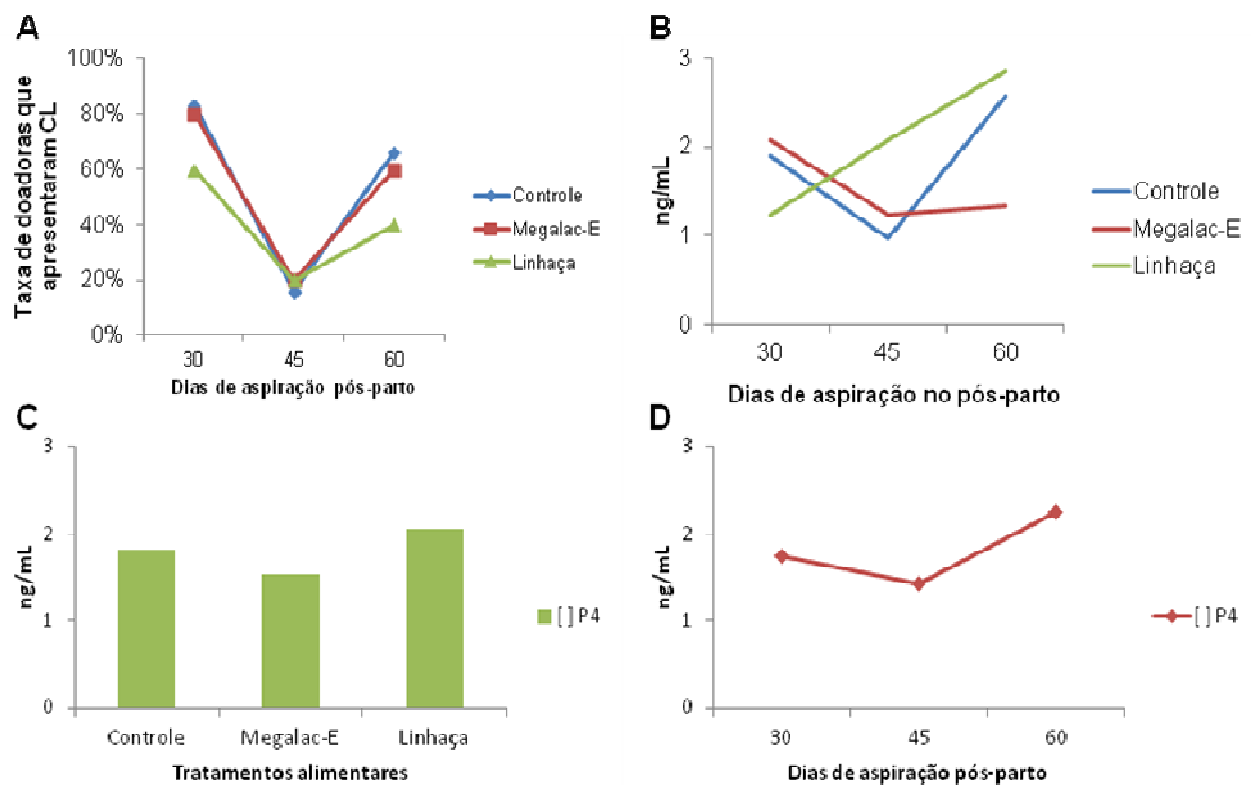


Figura 7. A - Taxa de doadoras que apresentaram CL (taxa de doadoras com CL/número total de doadoras) por tratamento de suplementação por dias pós-parto. B - Média de concentração de P_4 da interação entre os grupos de suplementação e os dias pós-parto. C - Média geral de concentração de P_4 por grupos de suplementação. D - Média geral de concentração de P_4 por dias pós-parto de doadoras da raça Holandesa ($P > 0,05$).

Durante o experimento as doadoras ficaram em observação de cio e as que apresentaram sinais de estro foram inseminadas. Após 30 dias de IA foi realizado o diagnóstico de gestação, sendo que os grupos controle, Megalac-E[®] e linhaça apresentaram taxas de 50% (3/6), 40% (2/5) e 60% (3/5), respectivamente (Figura 8).

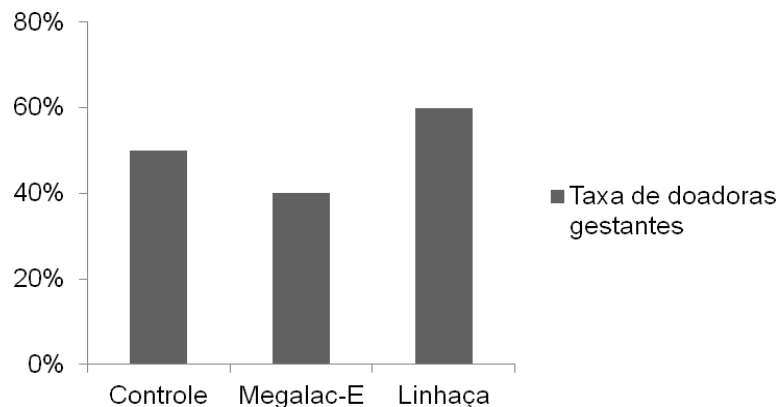


Figura 8. Taxa de gestação (número de doadoras gestantes/total de animais/tratamento) das doadoras da raça Holandesa ($P>0,05$).

A taxa de gestação das receptoras foi de 11% (2/18) para o grupo controle, 0% (0/3) para o grupo Megalac-E[®] e 20% (4/20) para o grupo linhaça (Figura 9).

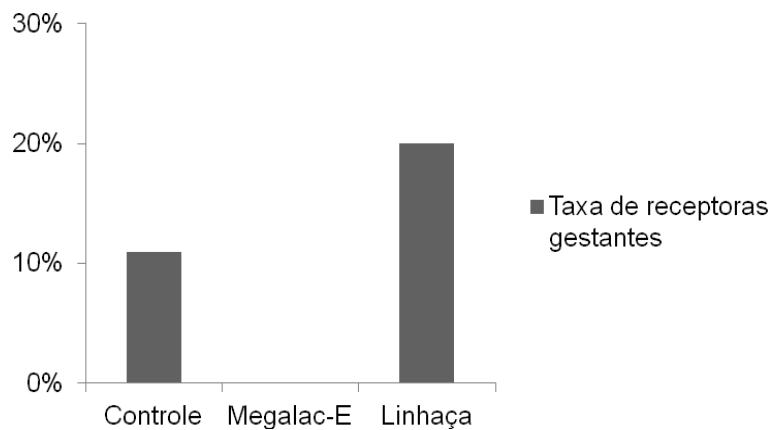


Figura 9. Taxa de gestação das receptoras (número de receptoras gestantes/total de embriões transferidos/tratamento; $P>0,05$).

6. Discussão

A suplementação com gordura é uma prática utilizada para aumentar a energia das dietas e seu uso é comum na suplementação alimentar de animais produtores de leite (STAPLES et al., 1998; VAN KNEGSEL et al., 2005). Segundo Funston (2004), suplementação lipídica proporciona efeitos positivos nas funções reprodutivas de importantes tecidos, incluindo hipotálamo, hipófise, ovários e útero.

Com o objetivo de melhorar a PIVE e o retorno à ciclicidade no período pós-parto em doadoras da raça Holandesa, foi fornecida suplementação com fontes de AGPs protegido (Megalac-E[®], rica principalmente em n-6) e não protegido (linhaça, rica principalmente em n-3) durante o pré e pós-parto. Os resultados mostraram maior número de folículos visualizados ($P=0,01$) por ultrassom para o grupo de animais suplementados com linhaça do que no grupo alimentado com Megalac-E[®]. Uma razão para esse resultado pode ser o efeito de qualidade reprodutiva individual dos animais, estes que se concentraram no grupo suplementado por linhaça. Apesar disso, alguns trabalhos anteriores observaram melhora na quantidade de folículos quando adicionado Megalac-E[®] à dieta (HIGHTSHOE et al., 1991; LUCY et al., 1991; WILLIAMS, 1996; LAMMOGLIA et al., 1997; DE FRIES et al., 1998; STAPLES et al., 1998; ARTUNDUAGA et al., 2010).

O mecanismo envolvido no aumento da população folicular de fêmeas suplementadas com AGPs ainda não está bem definido, mas foi observado que esses ácidos favorecem o desenvolvimento folicular através de metabólitos e hormônios atuando no sistema nervoso central influenciando a secreção de GnRH (LAMMOGLIA et al., 1997).

Dietas com gordura tem aumentado a quantidade e o tamanho dos folículos em vacas lactantes (STAPLES et al. 1998, GARNSWORTHY et al. 2008). Thomas e Williams (1996) observaram que a suplementação de vacas leiteiras com óleo de soja aumentou as concentrações plasmáticas de insulina, bem como as concentrações de IGF-I, o que estava associado ao crescimento folicular. Sabe-se que a insulina é um sinalizador importante dos efeitos da nutrição sobre a dinâmica folicular em bovinos (WEBB et al., 2004). Desta forma, as concentrações de insulina,

glicose e IGF-I atuam como sinalizadores metabólicos para o retorno à atividade ovariana cíclica no pós-parto (PATTON et al., 2007).

As dietas com fontes de gordura protegida (Megalac-E[®]) e não protegida (Linhaça) fornecidas para doadoras da raça Holandesa não influenciaram a recuperação de oócitos totais e dos viáveis. No entanto, houve uma tendência para maior número de oócitos totais aspirados para o grupo suplementado com linhaça (P=0,057). Segundo Kendrick et al. (1999), vacas da raça Holandesa suplementadas com dieta de alta energia produziram maior quantidade de oócitos. Diferentemente, nesse estudo, não foi verificado aumento na quantidade de oócitos totais e viáveis. No entanto, Fouladi-Nashta et al. (2007) observaram maior porcentagem de oócitos de melhor qualidade de vacas leiteiras alimentadas com alto teor de gordura. Isso sugere que a qualidade oocitária é influenciada pela qualidade da dieta ingerida. Além disso, vacas alimentadas com diferentes teores de gordura apresentaram aumento na composição de AGPs nos oócitos (FOULADI-NASHTA et al., 2007) e isto tem importante influência para a competência oocitária (ADAMIÁK et al., 2005), para a fertilização e para o potencial de desenvolvimento embrionário (KIM et al., 2001).

Fouladi-Nashta et al. (2007) observaram maior taxa de clivagem e de produção de blastocistos em vacas leiteiras suplementadas com Megalac-E. Resultado semelhante observado por Ponter et al. (2012) no número de oócitos de melhor qualidade e na PIVE de novilhas da raça Holandesa suplementadas com dois tipos de dieta (Soja, rica em n-6 e Linhaça, rica em n-3). No presente estudo, não foi detectado efeito de tratamento de suplementação sobre a quantidade de estruturas clivadas e a PIVE. Outra razão que pode ter influenciado para a ausência de efeitos de tratamento de suplementação nessas variáveis de desenvolvimento embrionário é o pequeno número de animais avaliados por grupo.

A taxa de produção de embrião no dia 45 pós-parto do grupo controle foi maior em relação ao dia 30 do mesmo grupo de suplementação e ao dia 45 do grupo alimentado com Megalac-E[®] (P=0,0018). Isto pode ser explicado pelas diferentes fases do ciclo estral que os animais apresentavam e da inexistência de embriões produzidos no dia 30 do grupo controle e no dia 45 do grupo suplementado com Megalac-E[®].

Segundo Staples et al. (1998) e Artunduaga et al. (2010) vacas primíparas da raça Holandesa alimentadas com AGPs protegidos durante o pré e pós-parto adiantaram o retorno á ciclicidade e melhoraram o desempenho reprodutivo. Em outros estudos, a taxa de gestação aumentou para animais suplementados com AGPs (MATTOS et al., 2002; COLAZO et al., 2004; JUCHEM et al., 2010). No presente estudo, não foram observados efeitos de tratamento de suplementação de fêmeas da raça Holandesa no período pós-parto sobre a presença de CL, concentração de P_4 e taxa de gestação. No entanto, os animais suplementados com linhaça apresentaram aumento crescente na concentração de P_4 nos dias pós-parto, assim pode-se subentender que algumas doadoras ficaram gestantes logo após as primeiras análises (30 dias pós-parto).

Segundo Artunduaga et al. (2010), AGPs (n-3 e n-6) podem aumentar as concentrações plasmáticas de colesterol, que é precursor de progesterona, favorecendo o desenvolvimento de ciclos estrais adequados para a primeira inseminação artificial pós-parto seguido pelo menor intervalo parto – concepção. A suplementação com n-3, por outro lado, inibe a síntese de PGF_{2a} e reduz perdas de gestação precoce em bovinos (THATCHER et al., 1994; BURKE et al., 1997; THATCHER et al., 1997; MATTOS et al., 2000; AMBROSE et al., 2006).

Uma estratégia para não afetar o intervalo entre partos de fêmeas de leite é a aplicação da OPU-PIVE no pós-parto. No entanto, Aller et al. (2010) em vacas de corte no período após o parto relataram baixa produção de embriões. Resultado semelhante foi observado por Ferreira (2011) em doadoras da raça Gir nas aspirações pós-parto para quantidade de oócitos viáveis e produção de embrião. Entretanto, Kendrick et al. (1999) avaliando vacas leiteiras alimentadas com dieta rica em energia no período pós-parto observaram aumento no número de oócito de 1,1 nos 30 dias pós-parto para 2,1 nos 100 dias. Nesse estudo não foi observado efeito dos dias de aspiração após o parto para quantidade de folículos, de oócitos e de PIVE. Apesar disso, a taxa de embriões nos dias 30, 45 e 60 pós-parto (8%, 17% e 20% respectivamente) foi semelhante à relatada por Lopes et al. (2006) em doadoras da raça Holandesa (32 dias = 5%; 85 dias = 20%). Isto mostra a recuperação do sistema reprodutor de fêmeas Holandesa no período pós-parto.

De acordo com Sartori e Mollo (2007) e Santos et al. (2008) a estratégia de suplementação com AGPs para vacas no período pré-parto é uma dieta rica em ácido linoleico (n-6), que aumenta a síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e atua no crescimento folicular, além de melhorar a involução uterina e restabelecer a ciclicidade precocemente. E no pós-parto, com ácido linolênico (n-3), que reduz a síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ uterina, aumentando a fertilidade e diminuindo as perdas embrionárias precoces.

Outra hipótese para a ausência de efeitos da suplementação com AGPs, nesse estudo, para essas variáveis reprodutivas em doadoras da raça Holandesa de alta produção leiteira pode ser a qualidade das três dietas fornecidas. Estas dietas podem ser consideradas balanceadas corretamente para satisfazer as necessidades de manutença, de lactação e reprodutiva no período pós-parto, mostrando efeito positivo no sistema reprodutivo tanto para os animais do grupo controle quanto para os suplementados com AGPs. Assim, é necessário mais estudos com maior número de doadoras e diferentes fontes de gordura para testar a real influência dos AGPs na quantidade de oócitos, PIVE, retorno à ciclicidade e taxa de gestação de fêmeas primíparas.

7. Conclusões

A suplementação com linhaça (rica principalmente em n-3) para doadoras da raça Holandesa aumentou a população folicular dos ovários e a quantidade de oócitos totais recuperados.

As suplementações com AGPs protegido (rico principalmente em n-6) e não protegido (rico principalmente em n-3) no pré e pós-parto não aumentaram a quantidade de oócitos viáveis, a produção *in vitro* de embriões, o retorno à ciclicidade e a taxa de gestação de fêmeas primíparas da raça Nelore.

Aspirações realizadas com maior número de dias pós-parto não permitiu a obtenção de maior número de oócitos e de produção *in vitro* de embriões.

8. Referências

- 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. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 73, n. 5, p. 918-926, 2005.
- ALLER, J. F.; MUCCI, N. C.; KAISER, G. G.; RÍOS, G.; CALLEJAS, S.S.; ALBERIO, R. H. Transvaginal follicular aspiration and embryo development in superstimulated early postpartum beef cows and subsequent fertility after artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 119, n. 1-2, p. 1-8, 2010.
- AMBROSE, D. J.; KASTELIC, J. P.; CORBETT, R.; PITNEY, P. A.; PETIT, H. V.; SMALL, J. A.; ZALOKOVIC, P. Lower pregnancy losses in lactating dairy cows fed a diet enriched in α -linolenic acid. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 89, n. 8, p. 3066-3074, 2006.
- ANUALPEC 2012. **Anuário da pecuária brasileira**. São Paulo: Instituto FNP, Consultoria e Comércio, 2012. p. 378.
- 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. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 64, n. 6, p. 1624-1632, 2001.
- ARTUNDUAGA, M. A. T.; COELHO, S. G.; BORGES, A. M.; LANA, A. M. Q.; REIS, R. B.; CAMPOS, B. G.; SATURNINO, H. M.; SÁ FORTES, R. V.; COSTA, H. N. Primeira onda folicular e ovulação de vacas primíparas da raça Holandesa alimentadas com diferentes fontes energéticas durante o período de transição. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 62, n. 1, p. 116-123, 2010.
- BENDER, K.; WALSH, S.; EVANS, A. C. O.; FAIR, T.; BRENNAN, L. Metabolite concentrations in follicular fluid may explain differences in fertility between heifers and lactating cows. **Reproduction**, Cambridge, v. 139, n. 6, p. 1047-1055, 2010.
- BOKEN, S. L.; STAPLES, C. R.; SOLLENBERGER, L. E.; JENKINS, T. C.; THATCHER, W. W. Effect of grazing and fat supplementation on production and reproduction of Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 88, n. 12, p. 4258-4272, 2005.
- BURKE, J. M.; STAPLES, C. R.; RISCO, C. A.; DE LA SOTA, R. L.; THATCHER, W. W. Effect of ruminant grade menhaden fish meal on reproductive and productive performance of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 80, n. 12, p. 3386-3398, 1997.

CHILDS, S.; HENNESSY, A. A.; SREENAN, J. M.; WATHES, D. C.; CHENG, Z.; STANTON, C.; DISKIN, M. G.; KENNY, D. A. Effect of level of dietary n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on systemic and tissue fatty acid concentrations and on selected reproductive variables in cattle. **Theriogenology**, Philadelphia, n. 70, n. 4, p. 595-611, 2008.

CNA. **CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL**. Brasília: CNA; 2005. Disponível em <www.cna.org.br>. Acesso em: 21 nov. 2005.

COLAZO, M. G.; KASTELIC, J. P.; MARTÍNEZ, M. F.; WHITTAKER, P. R.; WILDE, R.; AMBROSE, J. D.; CORBETT, R.; MAPLETOFT, R. J. Fertility following fixed-time AI in CIDR-treated beef heifers given GnRH or estradiol cypionate and fed diets supplemented with flax seed or sunflower seed. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 61, n. 6, p. 1115-1124, 2004.

DE FRIES, C. A.; NEUENDORFF, D. A.; RANDEL, R. D. Fat supplementation influences postpartum reproductive performance in Brahman cows. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 76, n. 3, p. 864-870, 1998.

DE LOSS, F.; KASTROP, P.; VAN MAURYK, P.; VANBENEDEN T. H.; KRUIP, T. A. Heterologous cell contacts and metabolics coupling in bovine cumulus oocyte complexes. **Molecular Reproduction and Development**, Hoboken, v. 28, n. 3, p. 255-259, 1991.

DISKIN, M. G.; MACKAY, D. R.; ROCHE, J. F.; SREENAN, J. M. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 78, n. 3-4, p. 345-70, 2003.

FERGUSON, E. M.; ASHWORTH, C. J.; EDWARDS, S. A.; HAWKINS, N.; HEPBURN, N.; HUNTER, M. G. Effect of different nutritional regimens before ovulation on plasma concentrations of metabolic and reproductive hormones and oocyte maturation in gilts. **Reproduction**, Cambridge, v. 126, n. 1, p. 61-71, 2003.

FERREIRA, M. B. D. **Obtenção de oócitos e produção *in vitro* de embriões em doadoras lactantes da raça gir (*Bos taurus indicus*)**. 2011. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária - Reprodução Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2011.

FOULADI-NASHTA, A. A.; GUTIERREZ, C. G.; GONG, J. G.; GARNSWORTHY, P. C.; WEBB, R. Impact of dietary fatty acids on oocyte quality and development in lactating dairy cows. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 77, n. 1, p. 9-17, 2007.

FOULADI-NASHTA, A. A.; WONNACOTT, K. E.; GUTIERREZ, C.G.; GONG, J.G.; SINCLAIR, K. D.; GARNSWORTHY, P. C.; WEBB, R. Oocyte quality in lactating dairy cows fed on high levels of n-3 and n-6 fatty acids. **Reproduction**, Cambridge, v. 138, n. 5, p. 771-781, 2009.

- FUNSTON, R.N. Fat supplementation and reproduction in beef females. **Journal of Animal Science**, Savoy v. 82, p. 154 - 161, 2004.
- GALLI, C.; CROTTI, G.; NOTARI, C.; TURINI, P.; DUCHI, R.; LAZZARI, G. Embryo production by ovum pick up from live donors. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 55, n. 6, p. 1341-1357, 2001.
- GARNSWORTHY, P. C.; SINCLAIR, K. D.; WEBB, R. Integration of physiological mechanisms that influence fertility in dairy cows. **Animal**, New York, v. 2, n. 8, p. 1144–1152, 2008.
- GUTIÉRREZ, C. G.; OLDHAM, J.; BRAMLEY, T. A.; GONG, J. G.; CAMPBELL, B. K.; WEBB, R. The recruitment of ovarian follicles is enhanced by increased dietary intake in heifers. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 75, n. 7, p. 1876–1884, 1997.
- HARVEY, W. R. **Least squares analysis of data with unequal subclass numbers**. Beltsville: ARS – USDA Publ. n° 20 – 8, 1960.
- HAWKINS, D. E.; NISWENDER, K. D.; OSS, G. M. An increase in serum lipids increases luteal lipid content and alters the disappearance rate of progesterone in cows. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 73, n. 2, p. 541-545, 1995.
- HIGHTSHOE, R. B.; COCHRAN, R.; CORAH, L. R. Effects of calcium soaps of fatty acids on postpartum reproductive function in beef cows. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 69, n. 10, p. 4097-4103, 1991.
- JUCHEM, S. O.; CERRI, R. L.; VILLASENOR, M.; GALVAO, K. N.; BRUNO, R. G.; RUTIGLIANO, H. M.; DEPETERS, E. J.; SILVESTRE, F. T.; THATCHER, W. W.; SANTOS, J. E. Supplementation with calcium salts of linoleic and transoctadecenoic acids improves fertility of lactating dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 45, n. 1, p. 55–62, 2010.
- KENDRICK, K. W.; BAILEY, T. L.; GARST, A. S.; PRYOR, A. W.; AHMADZADEH, A.; AKERS, R. M.; EYESTONE, W. E.; PEARSON, R. E.; GWAZDAUSKAS, F. C. Effects of energy balance on hormones, ovarian activity and recovered oocytes in lactating Holstein cows using transvaginal follicular aspiration. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 82, n. 8, p. 1731–1740, 1999.
- KIM, J. Y.; KINOSHITA, M.; OHNISHI, M.; FUKUI, Y. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen–thawed immature and *in vitro* matured bovine oocytes. **Reproduction**, Cambridge, v. 122, n. 1, p. 131-138, 2001.
- LAMMOGLIA, M. A. S.; WILLARD, S. T.; HALLFORD, D. M. Effects of dietary fat on follicular development and circulating concentrations of lipids, insulin, progesterone, estradiol, PGF2a and growth hormone in estrous cyclic Brahman cows. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 75, n. 6, p. 1591-1600, 1997.

LOPES, A. S.; MATINUSEN, T.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Effect of days postpartum, breed and ovum pick-up scheme on bovine oocyte recovery and embryo development. **Reproduction in Domestic Animal**, Berlin, v. 41, n. 3, p. 196–203, 2006.

LOWMAN, B. G.; SCOTT, N.; SOMERVILLE, S. **Condition scoring of cattle**. rev. Edinburg, UK: East of Scotland College of Agriculture, 1976. Bulletin n. 6.

LUCY, M. C.; STAPLES, C. R.; MICHEL, F. M. Energy balance and number of ovarian follicles detected by ultrasonography in early post-partum dairy cows. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 74, n. 2, p. 473-482, 1991.

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

MATTOS, R.; STAPLES, C. R.; WILLIAMS, J.; AMOROCHO, A.; MCGUIRE, M. A.; THATCHER, W. W. Uterine, ovarian, and production responses of lactating dairy cows to increasing dietary concentrations of menhaden fish meal. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 85, n. 4, p. 755-764, 2002.

Mc NAMARA, S.; BUTLER, T.; RYAN, D. P.; MEE, J. F.; DILLON, P.; O'MARA, F. P.; BUTLER, S. T.; ANGLESEY, D.; RATH, M.; MURPHY, J. J. Effect of offering rumen-protected fat supplements on fertility and performance in spring-calving Hostein-Friesian cows. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 79, n. 1-2, p. 45-56, 2003.

O'CALLAGHAN, D.; YAAKUB, H.; HYTTEL, P.; SPICER, L. J.; BOLAND, M. P. Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition and systemic hormone concentrations in ewes. **Journal of Reproduction & Fertility**, Cambridge, v. 118, n. 2, p. 303–313, 2000.

OLDICK, B. S.; STAPLES, C. R.; THATCHER, W. W.; GYAWU, P. Abomasal infusion of glucose and fat - effect on digestion, production, and ovarian and uterine functions of cows. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 80, n. 7, p. 1315-1328, 1997.

PATTON, J.; KENNY, D. A.; McNAMARA, S. Relationships among milk production, energy balance, plasma analytes and reproduction in Holstein – Friesian cows. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 90, n. 2, p. 649-658, 2007.

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

PONTER, A. A.; GUYADER-JOLYC, C.; NUTTINCKA, F.; GRIMARDA, B.; HUMBLTD, P. Oocyte and embryo production and quality after OPU-IVF in dairy

heifers given diets varying in their n-6/n-3 fatty acid ratio. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 78, n. 3, p. 632–645, 2012.

PONTES, J. H. F.; NONATO-JUNIOR, I.; SANCHES, B. V.; ERENO-JUNIOR, J. C.; UVO, S.; BARREIROS, T. R. R.; OLIVEIRA, J. A.; HASLER, J. F.; SENEDA, M. M. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 71, n. 4, p. 690–697, 2009.

PRYCE, J. E.; ROYAL, M. D.; GARNSWORTH, P. C.; MAO, I. L. Fertility in the high-producing dairy cow. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 86, p. 125-135, 2004.

SILVESTRE, F. T.; CARVALHO, T. S. M.; FRANCISCO, N.; SANTOS, J. E. P.; STAPLES, C. R.; JENKINS, T. C. Effects of differential supplementation of fatty acids during the peripartum and breeding periods of Holstein cows: I. Uterine and metabolic responses, reproduction, and lactation. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 94, n. 1, p. 189-204, 2011.

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**, New York, v. 81, n. 4, p. 856–871, 1998.

STURMEY, D. G.; REIS, A.; LEESE, H. J. Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 44, n. 1, p. 50-58, 2009.

THATCHER, W. W.; BINELLI, M.; BURKE, J. M.; STAPLES, C. R.; AMBROSE, J. D.; COELHO, S. Antiluteolytic signals between conceptus and endometrium. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 47, n. 1, p. 131–140, 1997.

THATCHER, W. W.; STAPLES, C. R.; DANET-DESNOYERS, G.; OLDICK, B.; SCHMITT, E. P. Embryo health and mortality in sheep and cattle. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 72, p. 16-30, 1994. Supplement 3.

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**, Savoy, v. 75, n. 9, p. 2512–2519, 1997.

VAN KNEGSEL, A. T. M.; VAN DEN BRAND, H.; DIJKSTRA, J.; TAMMINGA, S.; KEMP, B. Effect of dietary energy source on energy balance, production, metabolic disorders and reproduction in lactating dairy cattle. **Reproduction Nutrition Development**, Les Ulis, v. 45, n. 6, p. 665-88, 2005.

VIANA, J. H. M. Levantamento estatístico da produção de embriões bovinos no Brasil em 2011: mudanças e tendências futuras. **O embrião**. Jaboticabal. Ano XVI, ed. 51, p. 6-11, 2012.

WEBB, R.; GARNSWORTHY, P. C.; GONG, J. G.; ARMSTRONG, D. G. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 82, p. 63-74, 2004. Supplement 3.

WHYTE, J. J.; ALEXENKO, A. P.; DAVIS, A. M.; ELLERSIECK, M. R.; FOUNTAIN, E. D.; ROSENFELD, C. S. Maternal diet composition alters serum steroid and free fatty acid concentrations and vaginal pH in mice. **Journal of Endocrinology**, Bristol, v. 192, n. 1, p. 75-81, 2007.

WILLIAMS, G. L. Influence of dietary fat intake and metabolism on follicular growth in cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 31, p. 539-542, 1996.

ZACHUT, M.; ARIELI, A.; MOALLEM, U. Incorporation of dietary n-3 fatty acids into ovarian compartments in dairy cows, and the effects on hormonal and behavioral patterns around estrus. **Reproduction**, Cambridge, v. 141, n. 6, p. 833-840, 2011.

APÊNDICES

Os produtos químicos foram adquiridos da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EUA). Aqueles de origem diferente estão informados no texto.

Apêndice 1: Quantidade de Megalac-E[®] na dieta para fêmeas da raça Nelore no pós-parto

Megalac-E[®] (Química Geral do Nordeste, Rio de Janeiro, Brasil)

Média de produção de leite = 10kg

% de gordura no leite = 4%

% de ácido linoleico (n-6) na gordura total do leite = 5%

% de ácido linoleico (n-6) no Megalac-E[®] = 41%

10kg de leite x 4% gordura no leite = 0,4kg de gordura x 5% de ác. linoleico = 0,02kg x 1000 = 20g de ác. linoleico / 41% de ác. Linoleico de Megalac-E[®] = 48,78g de ác. Linoleico.

Fornecimento de Megalac-E[®]: para afetar na reprodução é necessário fornecer o dobro da quantidade de ác. Linoleico eliminado no leite.

48,78g x 2 = **97,5g de Megalac-E[®]** para vacas Nelore.

Apêndice 2: Quantidade de Megalac-E[®] na dieta para fêmeas da raça Holandesa no pós-parto

Média de produção de leite = 32kg

% de gordura no leite = 3,8%

% de ácido linoleico (n-6) na gordura total do leite = 5%

% de ácido linoleico (n-6) no Megalac-E[®] = 41%

32kg de leite x 3,8% gordura no leite = 1,216kg de gordura x 5% de ác. linoleico = 0,0608kg x 1000 = 57g de ác. linoleico / 41% de ác. Linoleico de Megalac-E = 148,29g de ác. Linoleico.

Fornecimento de Megalac-E[®]: para afetar na reprodução é necessário fornecer o dobro da quantidade de ác. Linoleico eliminado no leite.

148,29g x 2 = **296g de Megalac-E[®]** para vacas Holandesa.

Apêndice 3: PBS Completo

O PBS é composto por água Milli-Q suplementado com 137mM de Cloreto de Sódio (J. T. Baker, Center Valley, USA), 2,7mM de Cloreto de Potássio (Merck, Darmstadt, Alemanha), 8mM de Fosfato de Sódico bibásico anidro (Casa da Química, Diadema, Brasil), 1,5mM de Fosfato de Potássico monobásico (Merck, Darmstadt, Alemanha), 0,7mM de Cloreto de Cálcio di-hidratado (Merck, Darmstadt, Alemanha), 0,5mM de Cloreto de Magnésio hexahidratado (Merck, Darmstadt, Alemanha), 5,5mM de DI-Glucose e 83,4µg/mL de Sulfato de Amicacina (Biochimico, Rio de Janeiro, Brasil).

Apêndice 4: Meio maturação dos oócitos

O meio base utilizado para a MIV foi o TCM 199 com sais de Earle (Gibco, Grand Island, EUA) suplementado com 26mM de Bicarbonato de Sódio (Mallinckrodt, Hazelwood, USA), 1,0µg/mL de FSH (Calier, Juatuba, Brasil), 50µg/mL de hCG (Serono, Aubonne, Suíça), 1,0µg/mL de Estradiol 17β, 0,20mM de Piruvato Sódico (Biochemical, Nova York, EUA), 83,4µg/mL de Sulfato Amicacina (Biochimico, Rio de Janeiro, Brasil). Como fonte protéica na Maturação foi utilizado 10% de SFB (Crypion, Andradina, Brasil).

Apêndice 5: Meio TL-Sêmen

O meio TL-Sêmen é composto por 100mM de Cloreto de Sódio (J. T. Baker, Center Valley, USA), 3mM de Cloreto de Potássio (Merck, Darmstadt, Alemanha), 0,4mM de Cloreto de Magnésio hexahidratado ((Merck, Darmstadt, Alemanha), 0,3mM de Fosfato de Sódico bibásico anidro (Casa da Química, Diadema, Brasil), 25mM de Bicarbonato de Sódio (Mallinckrodt, Hazelwood, USA), 2mM de Cloreto de Cálcio di-hidratado (Merck, Darmstadt, Alemanha), 26mM de DL-Ácido Lático (60%), 30µM de *Phenol Red* (Sal Sódico Cristalino) e 10mM de Hepes Ácido.

Apêndice 6: Meio FIV gotas

O meio FIV gotas é composto por TL-Stock [114mM de Cloreto de Sódio (J. T. Baker, Center Valley, USA), 3mM de Cloreto de Potássio (Merck, Darmstadt, Alemanha), 0,5mM de Cloreto de Magnésio hexahidratado ((Merck, Darmstadt,

Alemanha), 0,3mM de Fosfato de Sódico bibásico anidro (Casa da Química, Diadema, Brasil), 25mM de Bicarbonato de Sódio (Mallinckrodt, Hazelwood, USA), 2mM de Cloreto de Cálcio di-hidratado (Merck, Darmstadt, Alemanha), 12mM de DL-Ácido Lático (60%) e 30 μ M de *Phenol Red* (Sal Sódico Cristalino)], 83,4 μ g/mL de Sulfato Amicacina (Biochimico, Rio de Janeiro, Brasil), 100mM de Piruvato Sódico (Biochemical, Nova York, EUA), PHE [29,4mM de DL-Ácido Lático (60%), 1,0 μ g/mL de Bissulfito de Sódio, Salina 0,9% e 2mM de D-Penicilamina], 176UI/mg de Heparina e 6mg/mL de BSA (FIV).

Apêndice 7: Solução de Percoll 90%

A solução de Percoll 90% é composta por 31mM de Cloreto de Potássio (Merck, Darmstadt, Alemanha), 3mM de Dihidrofosfato de Sódio monohidratado (Merck, Darmstadt, Alemanha), 800mM de Cloreto de Sódio (J. T. Baker, Center Valley, USA), 50mM de HEPES Ácido, 50mM de HEPES Sódico, 1,0M de Cloreto de Cálcio di-hidratado (Merck, Darmstadt, Alemanha), 100mM de Cloreto de Magnésio hexa-hidratado (Merck, Darmstadt, Alemanha), 26,4mM de DL-Ácido Lático (60%) e 20mM de Bicarbonato de Sódio (Mallinckrodt, Hazelwood, USA).

Apêndice 8: Meio SOFaa

O meio SOFaa é composto por 1,1M de Cloreto de Sódio (J. T. Baker, Center Valley, USA), 72mM de Cloreto de Potássio (Merck, Darmstadt, Alemanha), 12mM de Fosfato de Potássio Monobásico (Merck, Darmstadt, Alemanha), 7,4mM de Sulfato de Magnésio (Merck, Darmstadt, Alemanha), 50 μ M de DL-Ácido Lático (60%), 250mM de Bicarbonato de Sódio (Mallinckrodt, Hazelwood, USA), 260 μ M de *Phenol Red* (Sal Sódico Cristalino), 178mM de Cloreto de Cálcio di-hidratado (Merck, Darmstadt, Alemanha), 200mM de L-Glutamina, BME Essenciais 50x, MEM Não-Essenciais 100x, 2,8mM de Myo-Inositol, 340 μ M de Tri-Citrato de Sódio Di-Hidratado, 100mM de Piruvato Sódico (Biochemical, Nova York, EUA), 83,4 μ g/mL de Sulfato Amicacina (Biochimico, Rio de Janeiro, Brasil), 5mg/ml de BSA (CIV) e 2,5% de SFB.

Apêndice 9: Meio HSOF

O meio HSOF é constituído por 1,1M de Cloreto de Sódio (J. T. Baker, Center Valley, USA), 72mM de Cloreto de Potássio (Merck, Darmstadt, Alemanha), 12mM de Fosfato de Potássio Monobásico (Merck, Darmstadt, Alemanha), 7,4mM de Sulfato de Magnésio (Merck, Darmstadt, Alemanha), 50µM de DL-Ácido Lático (60%), 250mM de Bicarbonato de Sódio (Mallinckrodt, Hazelwood, USA), 260µM de *Phenol Red* (Sal Sódico Cristalino), 178mM de Cloreto de Cálcio di-hidratado (Merck, Darmstadt, Alemanha), 125 mM de Hepes Sódico, 125mM de Hepes Ácido, 200mM de L-Glutamina, BME Essenciais 50x, MEM Não-Essenciais 100x, 2,8mM de Myo-Inositol, 340µM de Tri-Citrato de Sódio Di-Hidratado, 100mM de Piruvato Sódico (Biochemical, Nova York, EUA), 83,4µg/mL de Sulfato Amicacina (Biochimico, Rio de Janeiro, Brasil), 5mg/ml de BSA (CIV) e 2,5% de SFB.