

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE REPRODUÇÃO ANIMAL

INFLUÊNCIA DA ALTA OU BAIXA INGESTÃO ALIMENTAR NA
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES E FUNÇÃO OVARIANA EM
BOS INDICUS

ALINE CARVALHO MARTINS

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade Estadual “Júlio de
Mesquita Filho” Campus de Botucatu,
para obtenção do título de Mestre em
Medicina Veterinária, Área de
Reprodução Animal.

Orientador: Roberto Sartori Filho

Botucatu-SP
Junho, 2007

Dedico este trabalho:

Aos meus pais, Luíz Elias e Liane

Aos meus avós Maria Vitória, Durval, Otarníria e Warip

À minha irmã Luíza

E ao namorado Stefen

Que sempre me apoiaram em todos os momentos

Vocês são muito importantes

Amo muito todos vocês

Agradecimentos

Aos meus pais e avós que são meus exemplos de vida e sempre me deram um grande apoio afetivo, me incentivando e apoiando no caminho que resolvi seguir.

A toda minha família que sempre foi para mim exemplo de união, companheirismo e alegria e estão sempre me ajudando no que podem.

Ao Stefen, pelo companheirismo, carinho e presença sempre, mesmo estando longe. E também a toda sua família, que já fazem parte da minha vida.

Ao orientador Roberto Sartori Filho pela sua vontade e disposição de ensinar, pela sua amizade, apoio e incentivo sempre que precisei.

Ao Alexandre Floriani Ramos e José Urias Câmara pela grande ajuda, disposição, paciência e ensinamentos na parte experimental.

Ao Ivo Pivato, Marcos Rollemberg Mollo e Katlen Driessen pela colaboração na parte experimental e pela amizade.

Tatiane Carmo Duarte Mundim pela grande colaboração na realização da parte de expressão gênica e também pela paciência e amizade. E ao Maurício Machaim Franco pelas orientações à respeito de expressão gênica, pelo incentivo e pelas agradáveis conversas sobre ciência.

Aos pesquisadores Margot Nunes Dode, Rodolfo Rumpf e Eduardo Melo que de alguma forma sempre estiveram presentes auxiliando com seus conhecimentos.

Ao pessoal da fazenda Sucupira, que sempre cuidaram para que a execução do experimento fosse possível, e que tiveram importante participação no dia a dia da fazenda, de forma especial ao Thomas, Weber, Arlindo, Expedito, Manoel, Milton, Josefa, Tonha, Lia e Linda.

Aos estagiários, que sempre tiveram importante colaboração.

Aos amigos que foram grandes companheiros, Michele Ricieri Bastos, Emivaldo de Siqueira Filho, Normandes Vieira, Rosiara Maziero e Maria Clara Mattos pela convivência e amizade. E aos amigos Karina Alberti, Cristiane Barreto, Juliana Zuppi e Edson Siqueira Filho pelo apoio que deram no período que estive em Botucatu.

Ao médico veterinário Luiz Henrique Carrijo da Integral Nutrição Animal que auxiliou na parte de nutrição.

À Integral Nutrição Animal pela assistência e fornecimento de seus produtos para alimentação dos animais.

Ao Guilherme de Paula Nogueira pela colaboração com a dosagem de FSH.

À FMVZ, professores e funcionários que fazem com que o curso de pós- graduação seja possível e de qualidade.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Laboratório de Reprodução Animal pelo suporte para a realização do experimento.

Ao CNPq (Edital Universal, processo 475696/2004-2) pelo auxílio financeiro.

À CAPES pela bolsa de estudo.

À banca examinadora pela disponibilidade e colaboração.

À todos meus sinceros agradecimentos.

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da alta ou baixa ingestão alimentar na produção *in vitro* de embriões e na função ovariana em bovinos. Vinte vacas aneloradas não lactantes com ECC de 2,9 (1 a 5) e pesando 410,5 kg ficaram 14 dias em adaptação à dieta de manutenção. Em seguida, foram divididas aleatoriamente em dois grupos experimentais recebendo dietas de 170% (alta ingestão) ou 66% (baixa ingestão) em relação à manutenção durante 56 dias. Com 21 dias nas dietas experimentais, as vacas tiveram o estro sincronizado para posterior avaliação dos ovários e coleta de sangue diariamente até seis dias após a ovulação. Dosagens de progesterona foram realizadas no Dia 7 do ciclo estral, de estradiol, IGF-I, FSH e insulina no período peri-ovulatório, além de avaliação de FSH e insulina no início das aspirações. Entre 7 e 10 dias após o estro, todos os folículos com diâmetro acima de 5 mm foram aspirados através de ultra-sonografia transvaginal e as vacas receberam aplicação de cloprostenol, além da colocação de um implante auricular de norgestomet. Quatro dias após, as vacas foram submetidas à aspiração folicular seriada (intervalo de 3 e 4 dias). Os ovócitos coletados foram classificados, maturados, fecundados *in vitro* e incubados por 7 dias. Os embriões de qualidade I foram submetidos a avaliação de expressão gênica para os genes INF- τ , GRB-10, CATALASE, GPX-4, Mn-SOD, e BAX através da técnica de RT-PCR semiquantitativa. As vacas ganharam 0,96 kg/dia de PV e perderam 0,93 kg/dia de PV nos grupos de alta e baixa ingestão alimentar. O diâmetro do folículo ovulatório não diferiu entre os grupos ($P>0,10$). O grupo de alta ingestão alimentar apresentou um pico pré-ovulatório de estradiol sérico menor que o grupo baixa ingestão alimentar. Não detectou-se diferença entre os grupos no volume luteal e na concentração sérica de progesterona. As concentrações séricas de FSH, IGF-I e insulina no período peri-ovulatório também não diferiram entre os tratamentos. As concentrações de FSH e insulina no início das aspirações tiveram uma tendência a serem maiores nos animais com alta ingestão alimentar ($0,05<P<0,10$). No momento das OPUs, o número de folículos >3 mm aspirados foi maior no grupo alta ingestão em relação ao grupo baixa ingestão assim como o tamanho do maior folículo. Não houve diferença no número de ovócitos por coleta, mas observou-se uma tendência na taxa de ovócitos de qualidade superior ser maior no grupo baixa ingestão alimentar. Também não detectou-se diferença na taxa de clivagem, no número e taxa de embriões e no número e taxa de blastocistos dos ovócitos de qualidade

superior, inferior ou total entre os dois grupos. Quanto à expressão dos genes avaliados nos embriões, a do gene BAX foi maior no grupo de baixa ingestão alimentar, entretanto, não houve diferença na expressão nos outros genes. Por outro lado, a expressão global foi maior no grupo de baixa ingestão alimentar. Os resultados sugerem que alterações na dieta podem interferir tanto na função ovariana quanto na produção de embriões em bovinos.

Palavras chaves: nutrição, embrião, ovário, bovino

Abstract

The aim of this study was to evaluate the influence of high or low feed intake on *in vitro* embryo production and on ovarian function in zebu cows. Twenty nonlactating zebu cows with body condition 2.9 (1 a 5) and weighing 410.5 kg received maintenance diet during 14 days. After this, they were randomly divided into two groups that received 170% (high feed intake) or 66% (low feed intake) of the maintenance diet during 56 days. Within 21 days on the experimental diets, the cows had estrus synchronized to posterior evaluation of the ovaries and daily blood samples collection until six days after ovulation. Evaluation of serum progesterone was realized on Day 7 of the estrus cycle, of estradiol, IGF-I, FSH and insulin was determined at the periovulatory period, and the evaluation of FSH and insulin at the beginning of aspiration. Between 7 and 10 days after estrus, all follicles with diameter above 5mm were aspirated by transvaginal ultrasound and the cows received 150 µg of d-Cloprostenol im, in addition to a norgestomet ear implant. Four days after implant insertion, the cows were submitted to serial ovum pick up. The recovered oocytes were classified, matured, *in vitro* fertilized, and incubated for 7 days. The quality I embryos were submitted to evaluation of the genes INF- τ , GRB-10, CATALASE, GPX-4, Mn-SOD and BAX by the RT-PCR technique. The cows have gained 0.96 kg/day of BW and have lost 0.93 kg/day of BW on high and low feed intake groups, respectively. The diameter of the ovulatory follicle did not differ between groups ($P>0.10$). The high feed intake group presented a lower preovulatory estradiol surge as compared with cows in the low feed intake group. We were not able to detect difference between the groups for luteal tissue volume and for serum progesterone concentration. The serum FSH, IGF-I and insulin concentrations at the periovulatory period also did not differ between the treatments. FSH and insulin concentrations at the beginning of aspirations had a tendency to be greater for the animals that received high feed intake ($0.05<P<0.10$). At the time of OPUs, the number of >3 mm follicles observed and aspired in the ovaries was greater in group high than low feed intake, as well as the size of the largest follicle. There was no difference in the number of oocytes per collection, but a tendency was observed in the rate of superior quality oocytes to be greater for the group low feed intake. Also, there was no difference in the cleavage rate, embryo number and rate and in the blastocysts number and rate from the superior, inferior or total oocytes between

groups. For the genes evaluated on embryos, only the expression of the BAX gene was greater in low feed intake group. For the other genes evaluated, there was no detectable difference in expression between groups. When the global expression of all genes was evaluated, there was a greater expression on the embryos from the low feed intake animals. The results suggest that alterations on diet can interfere on ovarian function, as much as on embryo production in cattle.

Keywords: nutrition, embryo, ovary, bovine

Lista de tabelas

Tabela 1. Composição de MS, NDT e PB da dieta dos animais que estavam recebendo dieta de manutenção, e em seguida, as dietas de restrição ou superalimentação.....	38
Tabela 2. Ingestão diária de nutrientes da dieta manutenção, de engorda (170% da dieta de manutenção) e de restrição alimentar (66% da dieta de manutenção).....	38
Tabela 3. Descrição dos kits utilizados e coeficientes de variação (CV) intra-ensaio obtidos nas dosagens hormonais realizadas.....	41
Tabela 4. Seqüência dos primers utilizados e tamanhos dos fragmentos amplificados para avaliação dos genes CATALASE, Mn-SOD, INTERFERON- τ , GPX-4, BAX, GRB 10 e ACTINA.....	45
Tabela 5. Resultados (média $\pm$ erro padrão) de diâmetro do folículo ovulatório, volume do corpo lúteo no Dia 7 do ciclo estral e das variáveis detectadas durante as seis sessões de aspiração folicular (folículos observados e folículos aspirados/vaca/sessão; diâmetro do maior folículo, taxa de recuperação e porcentagem de ovócitos viáveis) em vacas submetidas a baixa (n = 10) ou alta (n = 10) ingestão alimentar.....	49
Tabela 6. Concentrações séricas (média $\pm$ erro padrão) de hormônios em vacas submetidas a baixa ou alta ingestão alimentar.....	54
Tabela 7. Taxas de clivagem, de embriões totais (mórulas e blastocistos) e de blastocistos em relação aos ovócitos de qualidade superior, inferior e à soma dos dois observados nos tratamentos de baixa (n = 10 animais) ou alta (n = 10 animais) ingestão alimentar após seis sessões de aspiração ovocitária por vaca com intervalos de 3 ou 4 dias entre as sessões.....	55

Tabela 8. Média $\pm$ erro padrão da produção de embriões totais e blastocistos/vaca/aspiração com relação aos ovócitos de qualidade superior, inferior e à soma dos dois observados nos tratamentos de baixa (n = 10) ou alta (n = 10) ingestão alimentar após seis sessões de aspiração ovocitária por vaca com intervalos de 3 ou 4 dias entre as sessões.....	56
---	----

Lista de figuras

Figura 1. Esquema do delineamento experimental.....	40
Figura 2. Peso corporal (kg) dos animais com baixa ou alta ingestão alimentar ao longo do período experimental.....	47
Figura 3. Escore de condição corporal dos animais com baixa ou alta ingestão alimentar ao longo do período experimental.....	48
Figura 4. Concentrações séricas de progesterona dos animais com baixa ou alta ingestão alimentar no dia 7 do ciclo estral.....	50
Figura 5. Concentrações séricas de estradiol dos animais com baixa ou alta ingestão alimentar no período peri-ovulatório.....	50
Figura 6. Concentrações séricas de FSH dos animais com baixa ou alta ingestão alimentar durante o período peri-ovulatório, anterior às aspirações foliculares.....	51
Figura 7. Concentrações séricas de FSH dos animais com baixa ou alta ingestão alimentar no momento da terceira aspiração folicular.....	51
Figura 8. Concentrações séricas de IGF-I total dos animais com baixa ou alta ingestão alimentar durante o período peri-ovulatório, anterior às aspirações foliculares.....	52
Figura 9. Concentrações séricas de insulina dos animais com baixa ou alta ingestão alimentar durante o período peri-ovulatório, anterior às aspirações foliculares.....	53
Figura 10. Concentrações séricas de insulina dos animais com baixa ou alta ingestão alimentar no momento da primeira aspiração folicular.....	53
Figura 11. Gel de agarose 1,5% mostrando os produtos amplificados pela RT-PCR. 1 e 5 = Blastocistos expandidos (Bx) de vacas com alta ingestão; 2 e 6 = Bx de vacas com baixa ingestão; 3 e 7 = Blastocistos (BI) de vacas com alta ingestão; 4 e 8 = BI de vacas com baixa ingestão. Estes embriões foram submetidos a avaliação dos genes: β -ACTINA, GRB-10 = <i>growth factor receptor-bound 10</i> , CATALASE, BAX = B-cell lymphoma protein 2 associated protein X; GPX-4 = glutathione peroxidase 4, MnSOD = magnésio superóxido desmutase e INF τ = interferon tau) em embriões de vacas	

submetidas a baixa ou alta ingestão alimentar.....57

Figura 12. Quantificação (média $\pm$ erro padrão) para os genes MnSOD (magnésio superóxido desmutase), CATALASE, GPX 4 (glutathione peroxidase 4), INF τ (interferon tau), GRB 10 (*growth factor receptor-bound 10*) e BAX (B-cell lymphoma protein 2 associated protein X) em embriões de vacas submetidas a baixa (n = 51) ou alta (n = 65) ingestão alimentar.....58

Figura 13. Quantificação (média $\pm$ erro padrão) para os genes agrupados (MnSOD (magnésio superóxido desmutase), CATALASE, GPX-4 (glutathione peroxidase 4), INF τ (interferon tau), GRB-10 (*growth factor receptor-bound 10*) e BAX (B-cell lymphoma protein 2 associated protein X)) em embriões de vacas submetidas a baixa (n = 51) ou alta (n = 65) ingestão alimentar.....59

Lista de abreviações

BAX = B-cell lymphoma protein 2 associated protein x

BCL-2 = B-cell lymphoma protein 2

BI = blastocisto

Bx = blastocisto expandido

CCOs = complexos *cumulus* ovócitos

cDNA = ácido desoxirribonucléico complementar

Cu/Zn-SOD = cobre/zinco superóxido desmutase

CV = coeficiente de variação

Cx43 = connexin 31

ECC = escore de condição corporal

FIV = fertilização *in vitro*

FSH = hormônio folículo estimulante

GH = hormônio do crescimento

GPX = glutathione peroxidase

GRB = *growth factor receptor-bound*

GnRH = hormônio liberador de gonadotrofinas

LH = hormônio luteinizante

HSP = heat shock protein

IFN- τ = interferon τ

IGF = fator de crescimento semelhante à insulina

IGFBPs = proteínas ligadoras de IGF

IR = receptor de insulina

IRMA = ensaio imunorradiométrico

LIF = bovine leukemia inhibitory factor

LR- $\square$ = bovine leukemia inhibitory factor-receptor- $\square$

MnSOD = gene magnésio superóxido desmutase

MS = matéria seca

NDT = nutrientes digestíveis totais

NPY = neuropeptideo Y

NRC = Nutrient requirements of beef cattle

OPU = ovum pick up

PB = proteína bruta

PBS = *phosphate buffered saline*

PGF 2α = prostaglandina F 2α

PHE = penicilamina, hipotaurina e epinefrina

PV = peso vivo

RIE = radioimunoensaio

RNA_m = ácido ribonucléico mensageiro

RT = enzima transcriptase reversa

SFB = soro fetal bovino

SOX = sarcosine oxidase

TUNEL = (terminal deoxyribonucleotidyl transferase mediated dUTPneck end labelling)

Sumário

Resumo

Abstract

Lista de tabelas

Lista de figuras

Lista de abreviações

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1. Influência da nutrição na função ovariana, na qualidade do ovócito e produção de embriões	22
2.1.1. Influência da nutrição na função ovariana	22
2.1.2. Influência da nutrição na qualidade do ovócito	26
2.1.3. Influência da nutrição na produção de embriões	28
2.2. Avaliação da qualidade embrionária através da expressão gênica	29
2.2.1. Gene BAX	30
2.2.2. Gene GRB-10	31
2.2.3. Gene INF- τ	32

2.2.4. Genes CATALASE, GPX, Mn-SOD	33
3. OBJETIVOS	35
4. HIPÓTESE	36
5. MATERIAL E MÉTODOS	37
5.1 Animais e manejo nutricional	37
5.2. Sincronização do estro e aspiração folicular	38
5.3. Dosagens hormonais	40
5.4. Produção <i>in vitro</i> de embriões	41
5.5. Expressão gênica dos embriões	43
5.6. Análise estatística	46
6. RESULTADOS	47
6.1. Peso e ECC	47
6.2. Folículo ovulatório, corpo lúteo e aspiração folicular	48
6.3 Concentrações séricas de estradiol, progesterona, insulina, IGF-I e FSH	49
6.4. Produção de embriões <i>in vitro</i>	54
6.5. Expressão gênica dos embriões	56

7. DISCUSSÃO	60
8. CONCLUSÕES	69
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

1. INTRODUÇÃO

A utilização de tecnologias de reprodução assistida vem se tornando importante quando se deseja aumentar a eficiência reprodutiva de um rebanho. Porém, mais importante que qualquer tecnologia utilizada, é o manejo nutricional adequado, o qual irá refletir em bons índices tanto no contexto reprodutivo quanto sanitário dos animais.

Dentre as tecnologias associadas à reprodução, a produção *in vitro* de embriões tem tido uma participação importante devido à crescente demanda de animais de elevado mérito genético, especialmente da raça Nelore. Atualmente, o Brasil é um dos países que mais geram produtos utilizando esta biotecnologia (Thibier, 2006), porém com resultados variáveis e aquém do ideal. Uma das razões para isso é o inadequado manejo nutricional dos animais. Um exemplo que se observa frequentemente, é o excesso de alimentação para fêmeas de elevado mérito genético que são utilizadas como doadoras de ovócitos ou embriões.

É sabido que a nutrição afeta o processo reprodutivo de diferentes espécies e vários relatos mostram sua influência na puberdade, produção de gametas, desenvolvimento embrionário e placentário e também lactação (Martin et al., 2004).

O balanço energético dos animais tem uma alta relação com o desempenho reprodutivo. Para que o animal esteja em balanço energético positivo ou negativo, vários fatores são importantes, dentre eles, o escore de condição corporal (ECC), as exigências nutricionais de acordo com a categoria animal e o consumo de alimento em relação às suas necessidades nutricionais.

Scaramuzzi et al. (2006) classificaram os efeitos da nutrição na reprodução como agudo, dinâmico e estático. O efeito agudo acontece antes de mudanças no peso corporal, o dinâmico está associado ao aumento no peso corporal e o estático com o elevado peso corporal por si.

Para exemplificar o que mudanças na dieta por curto ou longo prazo podem provocar na reprodução, já foi observado que alteração na dieta por duas semanas foi capaz de alterar o perfil metabólico dos animais e isto provocou mudanças na função ovariana (Gutierrez et al., 1997). Mas, para que uma restrição

alimentar colocasse os animais em condição anovulatória foram necessárias por volta de 32 semanas (Bossis et al., 1999).

A densidade energética da dieta é o fator nutricional que, a curto prazo, provoca maiores alterações na reprodução. Associado à energia contida na dieta, a quantidade e tipo de proteína também são importantes. Para um bom aproveitamento tanto de energia quanto de proteína é importante que haja um correto balanceamento entre eles, além de sincronia na taxa de degradação entre as fontes de proteína e energia da dieta. Altos níveis de proteína degradável ou não degradável pelo rúmen podem aumentar níveis de uréia e amônia plasmática elevando concentrações de amônia no fluido folicular, e seus efeitos no folículo poderiam levar à subsequente redução na sobrevivência embrionária (Sinclair et al., 2000).

Além disso, o consumo excessivo ou deficiente de outros nutrientes, como vitaminas, macro e micro minerais tem sido relacionado ao baixo desempenho reprodutivo dos bovinos (Santos & Amstalden, 1998).

Por isso, as estratégias nutricionais utilizadas no rebanho podem resultar em melhora significativa nas taxas reprodutivas. Animais que recebem dieta muito acima das necessidades de manutenção associada a um alto ECC têm produção de embriões prejudicada, e quando associada a um baixo ECC o efeito da dieta pode ser positivo na produção de embriões (Adamiak et al., 2005).

Mudanças agudas na dieta, com níveis abaixo ou acima da manutenção, não parecem estar associadas às mudanças nas concentrações de gonadotrofinas. Estão relacionadas principalmente às alterações em hormônios metabólicos, como hormônio do crescimento (GH), insulina, fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), ou leptina (Webb et al., 2004).

Além disso, já foi observado que animais com maior ingestão alimentar têm um maior metabolismo hepático levando à queda nas concentrações circulantes de hormônios esteróides (estradiol e progesterona), apesar de ovularem folículos maiores. Esta queda se deve a um aumento na taxa de degradação hepática desses hormônios (Parr et al., 1993a, b; Sangsritavong et al., 2002; Vasconcelos et al., 2003).

Mudanças nutricionais de curta duração têm sido estudadas e vêm trazendo informações importantes para que se possa lançar mão de estratégias no

manejo nutricional dos animais a fim de melhorar os resultados de produção de embriões *in vivo* ou *in vitro*.

Os mecanismos responsáveis pelo efeito da alimentação sobre a função ovariana e qualidade embrionária dos animais podem ser diversos. Por isso, um conhecimento mais aprofundado sobre a influência da nutrição na fisiologia reprodutiva e principalmente, na produção de embriões em bovinos nas condições brasileiras, é importante para o desenvolvimento de biotecnologias reprodutivas mais efetivas, maximizando-se assim a eficiência reprodutiva dessa espécie animal tão importante para a agropecuária.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Influência da nutrição na função ovariana, na qualidade do ovócito e produção de embriões

2.1.1. Influência da nutrição na função ovariana

A nutrição pode afetar a reprodução através do eixo hipotálamo-hipófise-gônada, tendo efeito ovariano indireto, além de ter efeito direto no ovário através de fatores sistêmicos e locais. Isto se deve à participação da nutrição na foliculogênese, principalmente através de mecanismos de sinalização metabólica (Scaramuzzi et al., 2006), além de alteração no metabolismo de alguns hormônios devido às mudanças no fluxo sanguíneo hepático (Parr et al., 1993a, b; Sangsritavong et al., 2002; Vasconcelos et al., 2003).

Com relação à influência no eixo hipotálamo-hipófise-gônada, não foram observadas grandes alterações quando a mudança na dieta aconteceu por um período curto. No entanto, a redução de glicose associada à dieta restrita pode influenciar a função hipotalâmica e hipofisária. A restrição energética parece promover efeitos inibitórios no eixo hipotálamo-hipofisário, através da diminuição da pulsatilidade de secreção de hormônio luteinizante (LH), resultando na redução do crescimento folicular (Bossis et al., 1999; Diskin et al., 2003).

Os mecanismos de sinalização e regulação da liberação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) que podem ser influenciados pela nutrição ainda não são totalmente entendidos. Acredita-se que opióides endógenos atuem como neuromoduladores da liberação de GnRH. E neste mecanismo de peptídeos opióides, a restrição alimentar pode alterar o pulso de GnRH, possivelmente mediado pelo neuropeptídeo Y (NPY), o qual parece desempenhar uma função na regulação da ingestão alimentar e conseqüentemente no balanço energético dos ruminantes (McShane et al., 1993). O NPY é um potente inibidor da liberação de LH além de estimular a ingestão alimentar, ao contrário da leptina. Além disso, a glicose aparentemente também age no sistema nervoso central, modulando a liberação de GnRH, conseqüentemente a liberação de LH (Diskin et al., 2003). No entanto, este processo de controle da liberação de GnRH parece influenciar apenas a liberação de

LH sem grandes alterações nas concentrações de hormônio folículo estimulante (FSH). Esta informação baseia-se em estudos que examinaram os efeitos da nutrição na secreção de FSH e indicaram claramente que a restrição alimentar crônica ou aguda não interferiram precisamente na síntese ou secreção de FSH, e que a carência de FSH não impediu a ovulação em novilhas submetidas à restrição alimentar (Diskin et al., 2003).

Bossis et al. (1999) induziram nutricionalmente novilhas de corte a condições anovulatórias restringindo a dieta e observaram falha na ovulação apenas por volta de 32 semanas após o início da restrição alimentar. Estes relataram redução nas concentrações de LH acompanhada de decréscimo nas concentrações de estradiol e falência na ovulação no último ciclo estral antes de entrarem em anestro.

Mudanças na dieta por um curto período são capazes de afetar o metabolismo dos ruminantes, alterando alguns hormônios metabólicos, dentre eles o GH, a insulina, o IGF (principalmente o IGF-I) e a leptina, que têm grande participação na função ovariana (Webb et al., 2004). Porém, estas modificações e suas conseqüências variam de acordo com a condição corporal dos animais (Adamiak et al., 2005).

Alguns trabalhos têm sido desenvolvidos observando aumento no número de folículos recrutados na onda através do aumento dos níveis ingeridos de energia por um período curto de tempo (Gutierrez et al., 1997; Gong et al., 2002; Freret et al., 2006). A aplicabilidade desta prática seria aumentar a resposta superovulatória para coleta de embriões *in vivo* e também para aumentar o número de folículos aspirados para produção de embriões *in vitro*.

A ingestão de diferentes níveis nutricionais por um período curto de tempo pode influenciar o recrutamento de pequenos folículos, sem afetar as concentrações de FSH (Gutierrez et al., 1997; Armstrong et al., 2001; Gong et al., 2002), resultando em maior número de folículos ovulados após tratamento superovulatório em animais com alta ingestão alimentar (Gong et al., 2002). Este aumento tem sido associado à maior concentração plasmática de IGF-I e insulina (Freret et al., 2006). Isto acontece porque na fase em que os folículos não são dependentes de gonadotrofinas (antral), mas sim de fatores de crescimento (pré-antral), existe uma grande influência de fatores de crescimento na estimulação folicular, sobretudo de IGF (Webb et al., 2004). As concentrações de IGF estão altamente relacionadas com a dieta ingerida,

portanto, o recrutamento folicular pode potencialmente ser alterado de acordo com a nutrição fornecida. Além do IGF, outros hormônios (insulina, GH e leptina) podem estar mediando o efeito da nutrição na função ovariana, no entanto os mecanismos e interação entre estes hormônios ainda não estão bem estabelecidos.

Dentre os hormônios metabólicos que sofrem influência da dieta está o GH. Foi observado aumento de GH com a adição de gordura na dieta de animais que estavam mantendo peso. Este aumento de GH não foi acompanhado de aumento de IGF-I sérico, porém ocorreu aumento na população de folículos médios (4,0 a 9,9 mm) e aumento de IGF-I no fluido folicular, mostrando que o GH pode ter efeito direto no ovário (Thomas et al., 1997). Isto é suportado pelo fato de que já foram identificados seus receptores no tecido ovariano em bovinos (Cohick et al., 1996).

Em estudo com cultivo de células da granulosa na presença de GH, este mostrou efeito proliferativo apenas quando há presença de insulina (Langhout et al., 1991). Fortune (2003) descreveu que populações de camundongos transgênicos com super-expressão de GH bovino tiveram aumento no número de folículos pré-antrais e antrais, e que camundongos sem receptores de GH tiveram concentrações plasmáticas de IGF-I e mRNA de IGF-I ovariano reduzidos. Em bovinos, a imunização contra fator de liberação de GH em novilhas pré-púberes diminuiu o número de folículos grandes sem alterar o número de folículos pequenos e médios (Cohick et al., 1996). O tratamento com GH recombinante em novilhas púberes aumentou o número de folículos pequenos mas não de grandes (Gong et al., 1991; Buratini Jr., 2000).

Chase et al. (1998) estudaram bovinos com deficiência de receptores de GH, os quais apresentaram concentrações altas anormais de GH e baixas de IGF-I, sem alteração nas concentrações de gonadotrofinas, mas com crescimento folicular e desenvolvimento do corpo lúteo (CL) alterados. Estes descreveram que em situações em que há deficiência de receptores para o GH, ele não estimula a liberação de IGF-I, levando ao aumento de GH devido à ausência do feedback negativo provocado pelo IGF-I, o qual é o seu regulador primário.

Foi observado um aumento no GH circulante em novilhas com dieta restrita acompanhado de decréscimo nas concentrações circulantes de IGF-I, indicando que o fígado é insensível ao GH em animais subnutridos e a causa desta

resposta reduzida no fígado ao GH envolve um decréscimo de receptores de GH hepáticos (Bossis et al., 1999).

Decréscimo na concentração circulante de GH foi associado a um aumento em pequenos folículos em novilhas superalimentadas. Este aumento de pequenos folículos foi correlacionado ao aumento de insulina sérica e não às concentrações de GH e IGF-I (Gutierrez et al., 1997; Gong et al., 2002).

Curiosamente, Cohick et al. (1996) descreveram um efeito do GH no desenvolvimento folicular através da alteração de concentrações de IGFBPs (proteínas ligadoras de IGF) no fluido folicular quando novilhas pré-púberes foram imunizadas contra fator de liberação de GH. Os autores ainda mostraram que as concentrações de IGF-I séricas reduziram drasticamente, embora não tenha sido observada alteração no fluido folicular. As IGFBPs têm papel importante na regulação da biodisponibilidade de IGF-I, pois se ligam ao IGF-I livre competindo com seus receptores (Fortune et al., 2004). No entanto, os mecanismos que controlam as IGFBPs ainda não são bem entendidos.

Dietas que modulam a produção de acetato e propionato no rúmen, acabam direcionando a produção de glicose, pois o propionato é um importante precursor para a gliconeogênese no fígado, aumentando assim a disponibilidade de energia. As concentrações de glicose, por sua vez, estão relacionadas à produção de insulina e IGF-I, modulados pelo GH (Thomas et al., 1997). Novilhas com alta ingestão de energia tiveram níveis circulantes de glicose, insulina e IGF-I aumentados (Freret et al., 2006).

Insulina e IGF-I possuem efeito esteroideogênico nos folículos, além de atuarem aumentando a responsividade às gonadotrofinas (Gong et al., 1993). No entanto, a leptina inibe a esteroideogênese induzida por gonadotrofinas e/ou insulina *in vitro*, porém, em níveis fisiológicos, parece não ser capaz de alterar a proliferação das células da granulosa (Spicer & Francisco, 1997).

Chilliard et al. (2005) mostraram em sua revisão que a expressão gênica de leptina e as concentrações plasmáticas da proteína são reguladas a curto, médio e longo prazo pela dieta, nutrientes e hormônios (especialmente glicose e insulina), balanço energético, ciclos fisiológicos e fatores ambientais.

Adamiak et al. (2005) mostraram que as concentrações de leptina plasmática estão relacionadas ao nível de alimentação e condição corporal, e estão envolvidas na ação da dieta na qualidade do ovócito juntamente com a insulina.

Entretanto, os efeitos da insulina e leptina no crescimento folicular e qualidade do ovócito não são facilmente separados.

Sabe-se que a leptina interfere na função da insulina, pois ela atua na homeostase de energia (apetite, gasto de energia, partição de nutrientes entre os tecidos e composição corporal), podendo decrescer níveis circulantes de insulina e estimular o GH (Chilliard et al., 2005).

Quando novilhas de corte (Hereford x Friesian) foram alimentadas com altos níveis energéticos, foi observado um aumento na taxa de crescimento folicular durante a primeira e a segunda ondas foliculares comparadas às novilhas ingerindo baixo nível de energia (Armstrong et al., 2001). A estimulação folicular através de IGF-I e insulina faz com que a taxa de crescimento folicular aumente, determinando assim, maior diâmetro do folículo dominante em animais que recebem dietas com altos níveis energéticos (Murphy et al., 1991; Armstrong et al., 2001). Ao contrário, animais em restrição demonstraram diminuição na taxa de crescimento folicular e diminuição do tamanho do folículo dominante em relação a animais recebendo dieta de manutenção (Bossis et al., 1997).

O tamanho do folículo dominante também é influenciado pela concentração circulante de estradiol (que controla a liberação de FSH e LH através de *feedback* positivo e negativo), podendo estar baixa em animais com alto nível dietético devido ao seu maior “clearance” hepático (Sartori et al., 2004).

Alterações na dieta também mudaram o número de ondas durante o ciclo estral em novilhas, sendo predominantemente 3 em animais com 70% e 2 em animais com 180% da dieta de manutenção (Murphy et al., 1991). Estudos recentes no Brasil em novilhas Nelore, entretanto, não confirmaram esses resultados

2.1.2. Influência da nutrição na qualidade do ovócito

Como dados da literatura fazem crer que a nutrição pode afetar todo o processo de foliculogênese, também é possível que ocorra alterações nos ovócitos quanto à sua qualidade.

*Mollo et al. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Universidade de Brasília). Comunicação pessoal, 2007.

Os mecanismos pelos quais a nutrição pode afetar a qualidade do ovócito ainda não estão bem estabelecidos, necessitando ainda de mais informações. Estudos demonstraram que altos planos nutricionais em ruminantes podem ser prejudiciais à qualidade do ovócito, levando a baixas taxas de desenvolvimento pós-fecundação (Nolan, et al., 1998; Armstrong et al., 2001).

Anteriormente, foi mostrado que GH, IGF-I e insulina têm ação direta no folículo. Portanto, o ambiente folicular pode ser afetado, alterando concentrações intra-foliculares de IGF-I. Thomas et al. (1997) observaram que não houve aumento de IGF-I sérico acompanhando o aumento de GH em novilhas que receberam dieta com adição de gordura. Apesar disso as concentrações de IGF-I no fluido folicular aumentaram. Armstrong et al. (2001) tiveram resultados indicando que a superestimulação pelo IGF-I pode ser prejudicial ao desenvolvimento do ovócito, mostrando que a indução nutricional de mudanças no sistema IGF ovariano podem ter papel chave na regulação da qualidade do ovócito.

Adamiak et al. (2005) observaram um efeito negativo da hiperinsulinemia na qualidade dos ovócitos, e esta hiperinsulinemia era provocada por ingestão de altos níveis nutricionais acompanhados por alta condição corporal, mostrando que os efeitos dependem não só da quantidade de dieta ingerida, mas também da condição corporal dos animais.

Reduções nas concentrações circulantes de estradiol e progesterona estão associadas à quantidade de dieta ingerida (Vasconcelos et al., 2003). Stock & Fortune (1993) demonstraram que o efeito do crescimento folicular prolongado, evidente quando as concentrações de progesterona estão baixas, estava relacionado a uma fertilidade mais baixa. Isto pode ser importante na definição do ambiente folicular para a maturação do ovócito e subsequente fecundação, podendo estar associado à deterioração na qualidade do ovócito. Yaakub et al. (1999) observaram que a proporção de estradiol e progesterona no fluido folicular pode ser importante para definir o ambiente folicular normal para maturação do ovócito e subsequente fecundação.

Altos níveis de proteína na dieta também podem afetar o ambiente folicular, influenciando negativamente a qualidade dos ovócitos, pois podem elevar as concentrações sanguíneas de uréia, amônia ou ambas (Butler, 2000). Armstrong et al. (2001) observaram que a qualidade de ovócito de pequenos folículos foi negativamente correlacionada com as concentrações de uréia plasmática.

2.1.3. Influência da nutrição na produção de embriões

O “status” nutricional pode ser associado com sobrevivência embrionária, sendo o maior fator que controla a eficiência reprodutiva em tecnologias de reprodução assistida (Webb et al., 2004).

Os maiores precursores de energia disponível para função celular em ruminantes são os ácidos graxos voláteis, mas as quantidades destes são dieta-dependentes. Suplementos concentrados rapidamente fermentados geralmente favorecem a produção de propionato, e dietas com fibra que são fermentadas mais lentamente, favorecem a produção de acetato (Yaakub et al., 1999). Baseando-se nestas informações, é importante a manipulação correta da dieta, pois a quantidade de concentrado pode interferir na concentração de glicose circulante e ter importantes influências na produção e desenvolvimento embrionário.

Animais alimentados por curto período (9 dias) com feno tiveram mais ovócitos fecundados comparados aos demais recebendo silagem ou silagem e concentrado, entretanto sem diferenças na produção de blastocistos *in vitro* (Yaakub et al., 1999). Wrenzycki et al. (2000) trataram novilhas com dois tipos de concentrado, um a base de cevada e outro com polpa cítrica mais polpa de beterraba, fornecendo ambos concentrados *ad libitum* ou restrito (3 kg/dia) por 116 dias. Este trabalho mostrou que animais ingerindo 3 kg/dia de concentrado (restrição) produziram maior número de embriões transferíveis e o concentrado polpa cítrica associada a polpa de beterraba foi mais favorável na produção de embriões transferíveis.

Nolan et al. (1998) não observaram efeito da dieta fornecida *ad libitum* ou restrita por 10 dias na produção de embriões transferíveis. Entretanto, com 24 horas de cultivo, uma maior proporção de embriões dos animais com dieta restrita se desenvolveu ao estágio de blastocisto. Além disso, os embriões deste tratamento apresentaram um maior número de células, mostrando diferenças na taxa de desenvolvimento.

Adamiak et al. (2005) observaram que o fornecimento de altos níveis alimentares (duas vezes a manutenção) associado a um ECC alto, foi prejudicial à qualidade ovocitária e produção de embriões. Entretanto, alta ingestão alimentar em animais com ECC baixo teve efeito positivo no desenvolvimento embrionário pós-fecundação ao estágio de blastocisto. Já Freret et al. (2006) fizeram um estudo com

novilhas que inicialmente estavam ganhando 950g de peso vivo por dia e foram divididas em dois grupos, aumentando (1300g de PV/dia) ou diminuindo (730g de PV/dia) este ganho. Não observaram efeitos prejudiciais do maior ganho de peso na produção de embriões *in vitro* comparado a novilhas com menor ganho de peso.

A produção de glicose induzida pela dieta pode alterar a sobrevivência embrionária, sabendo que os embriões bovinos são sensíveis à glicose e que em altas concentrações no meio de cultura esta inibe o desenvolvimento embrionário *in vitro* (Takahashi & First, 1992 apud Wrenzycki et al., 2000).

Altas concentrações de uréia e amônia provenientes de altos níveis de proteína na dieta também podem afetar o ambiente uterino, influenciando o desenvolvimento embrionário (Butler, 2000).

2.2. Avaliação da qualidade embrionária através da expressão gênica

A classificação morfológica é comumente usada como critério de avaliação da qualidade embrionária. Entretanto, estudos recentes têm buscado correlacionar o aspecto morfológico a outros métodos não invasivos, dentre elas o teste de criotolerância e testes metabólicos, assim como técnicas invasivas que envolvem estudos de expressão gênica. Essas técnicas avaliam a regulação gênica tanto a nível transcricional quanto traducional, permitindo por exemplo a avaliação da taxa de apoptose (Rubio Pomar et al., 2005; Lonergan et al., 2006).

A qualidade do ovócito é um dos fatores determinantes da produção de embriões, no entanto, o sistema de cultivo pós-fecundação determinará a qualidade dos blastocistos (Rizos et al., 2002). Isto fica claro quando se compara a viabilidade dos embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* de mesma avaliação morfológica.

Anormalidades detectadas no padrão de expressão de alguns genes de embriões bovinos produzidos *in vitro*, quando comparadas ao padrão dos embriões produzidos *in vivo*, podem explicar a qualidade reduzida daqueles em termos de viabilidade após criopreservação (Rizos et al., 2002). Corcoran et al. (2006) observaram que 85% dos 384 genes identificados em blastocistos produzidos *in vivo* e *in vitro*, foram “down-regulated” em blastocistos cultivados *in vitro*, e os autores sugeriram que a razão pela qual os embriões *in vitro* são de qualidade inferior àqueles *in vivo* seja devido à deficiência da “maquinaria celular” associada com a transcrição e tradução.

Portanto, diferenças na expressão de genes, consequentemente na qualidade embrionária, podem ocorrer quando se compara o sistema *in vivo* com o cultivo *in vitro*. Mas quando se compara diferentes sistemas de cultivo *in vitro*, também são observadas alterações, visto que, embriões pré-implantação são capazes de se desenvolver em condições inadequadas de cultivo, modificando o perfil de genes importantes para o desenvolvimento (Oliveira et al., 2005; Lonergan et al., 2006).

A presença de soro no meio de cultivo, por exemplo, aumentou a expressão de genes relacionados à apoptose [como o gene Bax (B-cell lymphoma protein 2 associated protein X)], ao estresse oxidativo [MnSOD (magnésio superóxido desmutase) e SOX (sarcosine oxidase)] e à de genes relacionados à comunicação através de junções gap (LIF, LR- α); e diminuiu a expressão do gene IFN- τ (interferon τ), relacionado ao reconhecimento materno da gestação e a do gene Cx43, relacionado à comunicação através de junções gap (Rizos et al., 2003).

Outro estudo analisou a influência de alta ou baixa tensão de oxigênio no ambiente de cultivo, observando alteração na expressão do gene Mn-SOD, que é uma enzima antioxidante. No entanto, isto não afetou a produção de embriões (Corrêa et al., 2007).

Oliveira et al. (2005) relataram que o aumento da densidade de embriões no cultivo diminuiu as taxas de clivagem e de blastocisto e aumentou a expressão do gene Hsp 70.1 (heat shock protein 70.1), que está diretamente relacionado às respostas celulares em embriões submetidos ao estresse causado por condições inadequadas de produção *in vitro*.

Adicionalmente, Wrenzycki et al. (2000) concluíram que diferenças observadas na expressão gênica e nos substratos metabólicos de embriões produzidos *in vivo* podem ser atribuídas à composição e quantidade da dieta fornecida às novilhas doadoras. Além disso, os autores sugerem que as alterações na expressão gênica podem ser usadas como marcadores moleculares para diferenciar populações de embriões produzidos sob diferentes regimes nutricionais.

2.2.1. Gene BAX

A apoptose, ou morte celular programada, tem sido observada em embriões no estágio de pré-implantação em diversas espécies de mamíferos e está

presumivelmente envolvida na eliminação de células anormais ou redundantes (Rubio Pomar et al., 2005).

Tem um papel importante no desenvolvimento do animal e na homeostase celular, pois age como um mecanismo de controle de qualidade, o qual remove células que estão danificadas, não funcionais, extraviadas ou supranumerárias (Paula-Lopes & Hansen, 2002). Makarevich & Markkula (2002) demonstraram através da técnica de TUNEL (terminal deoxyribonucleotidyl transferase mediated dUTPneck end labelling), que avalia células em apoptose, que 87% dos blastocistos bovinos cultivados *in vitro* tiveram reação Túnel positiva em um ou mais blastômeros.

Estudos têm mostrado que dentre vários genes e proteínas envolvidos no processo de apoptose, membros da família do gene BCL-2 (gene B-cell lymphoma protein 2) possuem papel chave na sua regulação. Pelo menos 15 membros da família do gene BCL-2 em mamíferos têm sido identificados e caracterizados em dois subgrupos: anti-apoptótico (Bcl-2, Bcl-w, Bcl-xL, Al, Mcl-1) e pró-apoptótico (Bax, Bak, Bok, Bik, Blk, Hrk, BNIP3, Bim, Bad, Bid, Bcl-xs) (apud Yang & Rajamahendran, 2002).

Yang & Rajamahendran (2002) observaram que a relação entre o Bax e o Bcl-2 é determinante crítico de sobrevivência ou morte celular. Esta relação foi um bom indicativo de qualidade dos embriões produzidos *in vitro* e de ovócitos. A expressão da proteína Bcl-2 foi maior que da proteína Bax em ovócitos grau I, embriões de 2-8 células, e blastocistos de boa qualidade. Por outro lado, a expressão da proteína Bax foi muito maior em relação à proteína Bcl-2 em ovócitos grau IV e embriões degenerados.

2.2.2. Gene GRB-10

As proteínas Grb (*growth factor receptor-bound*) Grb7/10/14 são proteínas adaptadoras celulares que podem ligar-se a vários receptores tirosina kinases, assim como a várias proteínas celulares (Holt & Siddle, 2005). Elas se ligam a outras proteínas para ativar receptores tirosina kinases e então regulam ou mediam a sinalização do receptor (Mori et al., 2005). Tem sido sugerido que têm função em diversos processos celulares, incluindo a regulação do crescimento celular e

metabolismo, apoptose e migração celular e está relacionado à ligação e à regulação de sinais do receptor de insulina e receptor de IGF (Holt & Siddle, 2005). O gene GRB-10 foi identificado em camundongos como gene “imprinted” maternalmente expresso (Miyoshi et al., 1998 apud Vecchione et al., 2003). Ele é expresso maternalmente na maioria dos tecidos e parece estar em todos os estágios embrionários (2, 4, 8 e 16-32 células, mórula, blastocisto em D7 e blastocisto expandido em D8) além de ovócitos maduros em bovinos (Ruddock et al., 2004).

Foi demonstrado que o GRB-10 expresso maternalmente limita o crescimento, possivelmente através da interação direta com a sinalização do IGF2, que é o maior fator de crescimento placentário e embrionário e a perda da função do GRB-10 resultou em super-crescimento fetal e placentário (Charalambous et al., 2003).

Vários genes “imprinted” são essenciais para o desenvolvimento fetal e para a regulação do crescimento (Ruddock et al., 2004). Genes paternalmente expressos devem agir aumentando o crescimento embrionário e placentário, enquanto que os genes maternalmente expressos devem limitar o crescimento (Charalambous et al., 2003).

Ramos et al. (2006) observaram que a supressão endógena do GRB-10 levou ao aumento nos níveis da proteína IR (receptor de insulina), entretanto, a super-expressão reduziu estes níveis, não alterando quantidades de RNAm de IR, demonstrando que a modulação ocorre a nível de proteína. Estes autores concluíram que além da inibição da atividade kinase do IR por ligação direta ao IR, o GRB10 também regula negativamente a sinalização da insulina mediando a estimulação da degradação do seu receptor.

Outro estudo mostrou que o GRB-10 atua como adaptador ligando a proteína Nedd4 ao receptor de IGF-I, mediando, portanto a ubiquitinação deste receptor (Vecchione et al., 2003). Além disso, Morrione et al. (1997) observaram efeito inibitório do GRB-10 (mGrb10^{-/-}) na proliferação celular mediada pelo IGF-I.

2.2.3. Gene IFN- τ

O IFN- τ , um interferon tipo I é secretado exclusivamente por células do trofotoderma. É o agente primário responsável pelo reconhecimento materno da

prenhez em bovinos (Roberts et al., 1992). A secreção de IFN- τ pelos embriões pode variar com idade e estágio embrionário, com as condições de cultivo a que eles são submetidos e com a presença de outros embriões no mesmo meio de cultivo (Kubisch et al., 2001).

Transcritos de IFN- τ têm sido detectados em blastocistos, mas não em mórulas, sugerindo que o início da produção de IFN- τ pode estar relacionado à formação da blastocela (Kubish et al., 2001).

Neira et al. (2007) observaram que embriões de qualidade excelente ou boa tiveram maior produção de IFN- τ comparados aos embriões de pior qualidade, mostrando que a produção do IFN- τ pode ser um indicador de qualidade embrionária. Além disso, o gene IFN- τ tem sido utilizado como marcador molecular da qualidade embrionária (Rizos et al., 2003).

2.2.4. Genes CATALASE, GPX, Mn-SOD

Embriões bovinos cultivados *in vitro* podem ser susceptíveis ao estresse oxidativo. Portanto, o conhecimento sobre os mecanismos de produção e eliminação de radicais de oxigênio em embriões pode ajudar a melhorar a eficiência de sistemas de produção de embriões *in vitro* (Gordon, 1994).

Embriões adquirem mecanismos de proteção quando são submetidos a algum tipo de estresse, e esta aquisição de tolerância a estressores ambientais pode ser devido à aquisição de proteção bioquímica ou simplesmente devido ao aumento no número de células (Edwards et al., 2001).

Com relação à aquisição de proteção bioquímica, várias enzimas antioxidantes protegem embriões contra dano peroxidativo, dentre elas Mn-SOD, catalase e GPX. A enzima Mn-SOD está localizada na mitocôndria e têm ação de detoxificação de espécies oxigênio reativas. O H₂O₂, que é o subproduto de ação da enzima Mn-SOD, é eliminado pela catalase ou GPX (Guérin et al., 2001). A catalase e a GPX são produzidas durante o estresse oxidativo sendo responsáveis pela conversão de radicais livres reativos em H₂O (Edwards et al., 2001). Os efeitos do estresse oxidativo na produção de embriões vai depender da sua intensidade. Corrêa et al. (2007) submeteram embriões a altas e baixas tensões de oxigênio, os quais mostraram alterações na expressão do gene Mn-SOD, que seria uma das

enzimas que primeiramente é aumentada no estresse oxidativo, com relação a expressão das outras enzimas antioxidantes CATALASE e GPX. Além disso, estes autores observaram que esta alteração inicial no sistema antioxidante não afetou a produção de embriões.

3. OBJETIVOS

Adquirir um conhecimento mais aprofundado sobre a fisiologia reprodutiva e qualidade embrionária em fêmeas bovinas, especialmente em relação ao manejo nutricional dos animais, para melhor utilizarem-se as técnicas de biotecnologia da reprodução.

Mais especificamente, pretendeu-se avaliar a influência da nutrição na produção *in vitro* de embriões em vacas aneloradas. Paralelamente, objetivou-se determinar as características de crescimento folicular e luteal, concentrações sangüíneas de IGF-I, insulina, progesterona, estradiol e FSH em animais submetidos a dois manejos nutricionais diferentes (alta e baixa ingestão alimentar).

4. HIPÓTESE

Vacas submetidas a baixa ingestão alimentar apresentam concentrações séricas hormonais (estradiol e progesterona) mais altas, apesar de ovularem folículos menores e possuírem tecido luteal menor. Além disso, estes animais deveriam produzir menos ovócitos, porém os embriões PIV (produzidos *in vitro*) seriam de qualidade superior quando comparados ao grupo com maior ingestão de matéria seca.

Embriões PIV provenientes de vacas submetidas à baixa ingestão alimentar teriam maior expressão de genes relacionados a embriões de qualidade superior.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Animais e manejo nutricional

Foram utilizadas 20 vacas aneloradas não lactantes com ECC inicial de 2,9 (escala de 1 a 5; Houghton et al., 1990) e peso inicial de 410,5 kg. O experimento foi realizado durante os meses de outubro a dezembro de 2005 no Campo Experimental Sucupira da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia localizado no município do Riacho Fundo-DF.

Todos os animais passaram por um período de adaptação à dieta de manutenção de 14 dias. Após este período os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais recebendo dietas de 170% (alta ingestão) ou 66% (baixa ingestão) em relação à manutenção. Esta dieta foi oferecida durante 56 dias sendo destes, 21 dias de adaptação e 35 dias em período experimental, conforme Figura 1. A dieta foi elaborada de acordo com as exigências do NRC (“nutritient requirements of beef cattle”) para esta categoria animal. Consistia de 36,6% de feno de coast-cross, 18,3% de silagem de milho, 24,4% de milho moído, 12,2% de farelo de trigo e 8,5% de concentrado comercial (Boião PPU[®], Integral Nutrição Animal, Goiânia, Goiás, Brasil). Os animais ingeriram 1,52%, 2,74% e 1,06% em relação ao peso vivo das dietas de manutenção, alta e baixa ingestão alimentar, respectivamente. O concentrado forneceu 12 g/kg de Ca, 9 g/kg de P, 1000 UI/kg de vitamina A.

As porcentagens de matéria seca (MS), nutrientes digestíveis totais (NDT) e proteína bruta (PB) dos componentes da dieta oferecida estão ilustrados na Tabela 1 e a ingestão diária das dietas estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 1. Composição de MS, NDT e PB da dieta dos animais que estavam recebendo dieta de manutenção, e em seguida, as dietas de baixa ou alta ingestão.

Componentes	Matéria seca (%)	NDT (%)	PB (%)
Feno coast-cross	85	50	10
Silagem milho	25	62,8	7,5
Milho	90	80	9
Trigo	90	70	14
Concentrado	90	65	22
Média total	37,9	62,4	11,52

Tabela 2. Ingestão diária de nutrientes da dieta manutenção, de engorda (170% da dieta de manutenção) e de restrição alimentar (66% da dieta de manutenção).

	Consumo de MS	Proteína total	NDT
Dieta	(Kg)	(Kg)	(Kg)
Manutenção	6,25	0,70	3,9
Restrição (66%)	4,37	0,49	2,7
Engorda (170%)	11,25	1,277	7,1

O peso corporal e ECC foram avaliados semanalmente e a dieta era ajustada de acordo com o peso dos animais. As vacas foram alojadas em dois piquetes sem gramíneas onde tinham acesso à dieta oferecida, além de água e sal mineral *ad libitum*.

5.2. Sincronização do estro e aspiração folicular

No fim do período de adaptação às dietas experimentais, as vacas tiveram o estro sincronizado. Foi aplicado, 50 µg i.m. de GnRH (Gestran Plus[®], Tecnopec, São Paulo, Brasil) e colocação de implante intravaginal de progesterona (DIB[®], Syntex, Buenos Aires, Argentina) no Dia 0. Após 7 dias, retirou-se o implante e aplicou-se 150 µg i.m. de prostaglandina F2 α (Veteglan[®], Calier, São Paulo, Brasil). A partir deste dia (com 21 dias em adaptação às dietas experimentais) os ovários foram avaliados diariamente com ultra-som (Aloka SSD-500, Japão) acoplado de probe linear de 7,5 MHz (Aloka, Japão) até ovulação, avaliando-se o tamanho do folículo ovulatório. Amostras de sangue no dia do estro e da ovulação foram

coletadas para avaliação das concentrações séricas de estradiol, IGF-I total, insulina e FSH. Seis dias após a ovulação foi avaliado o tamanho do CL através de ultra-sonografia e coletado sangue para avaliação da concentração sérica de progesterona.

Antes de iniciar as aspirações, entre 7 e 10 dias após o estro, todos os folículos com diâmetro acima de 5 mm foram aspirados através de ultra-sonografia transvaginal. No mesmo dia os animais receberam 150 µg i.m. de prostaglandina (Veteglan[®], Calier, São Paulo, Brasil), além da colocação de um implante auricular de norgestomet (Crestar[®], Intervet, México).

Quatro dias após a colocação do implante, as vacas foram submetidas à aspiração folicular (OPU) seriada com intervalos alternados de 3 e 4 dias entre as coletas perfazendo um total de 7 coletas por vaca.

As aspirações foliculares foram realizadas com auxílio de ultra-som (Aloka SSD-500, Japão) e transdutor convexo de 5 MHz (Aloka USD994T-5, Japão) acoplados à uma bomba de vácuo (Cook VMAR-5100, Austrália). Previamente às aspirações era realizada anestesia epidural baixa com lidocaína 2% (Pearson, Eurofarma, Brasil) e higienização da região perineal. O número de folículos pequenos (3 a 5,5 mm), médios (6 a 8,5 mm) e grandes (>9 mm) presentes no ovário e o tamanho do maior folículo eram registrados. Os folículos visualizados eram aspirados e o número e seus tamanhos também registrados. Coletas de sangue foram feitas nos dias das aspirações.

O meio de punção utilizado foi o PBS (*phosphate buffered saline*) acrescido de 1% de soro fetal bovino (SFB – Invitrogen - Gibco[®]) e 0,1% de heparina sódica (Liquemine[®] 25.000 UI/5mL, Roche, Brasil). A pressão da bomba de vácuo foi de 80 mmHg, equivalente a 13 mL/min neste sistema de agulha longa utilizando catéter de 16G (Jelco, Johnson e Johnson, Bélgica) conectado a um sistema de punção (Handle Cook, Austrália). O sistema era acoplado a um tubo de 50 mL (TPP, Suíça). Portanto, o líquido aspirado passava por este sistema e se depositava no tubo. No fim da aspiração o sistema era lavado com o meio de punção e levado imediatamente para o laboratório.

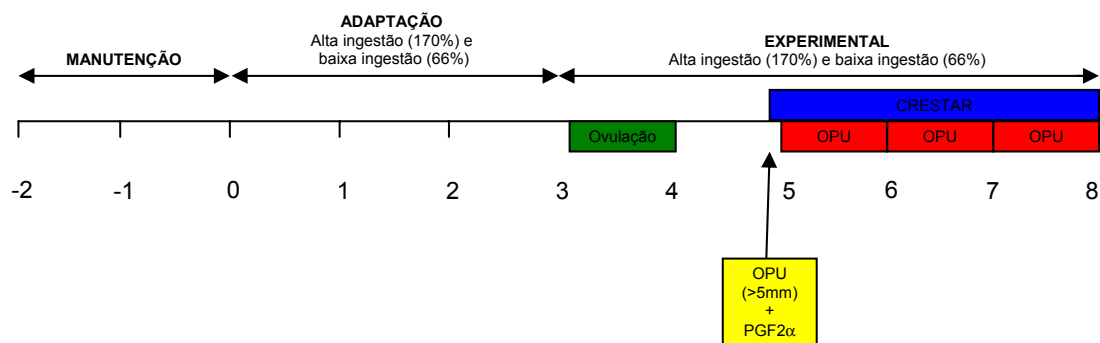


Figura 1. Esquema do delineamento experimental. Os animais ficaram por duas semanas na dieta de manutenção, posteriormente três semanas em adaptação à dieta experimental (alta ingestão e baixa ingestão) e em seguida iniciou-se o período experimental, com as mesmas dietas de alta (170% da manutenção) e baixa ingestão (66% da manutenção). No fim do período de adaptação os animais tiveram o estro sincronizado e sete a 10 dias após foi feita a aspiração (OPU) dos folículos maiores que 5 mm, juntamente com injeção de PGF2 α e inserção de implante auricular de norgestomet (Crestar[®]). Após 4 dias, iniciaram-se as sessões de aspiração (OPU) com intervalo de 3 e 4 dias durante três semanas.

5.3. Dosagens hormonais

O sangue foi coletado por punção dos vasos coccígeos com tubos de Vacutainer, refrigerado por 24 horas e centrifugado a 1600 g por 15 min. O soro foi então congelado a -20°C, para posteriormente ser analisado para dosagem de progesterona, estradiol, insulina e FSH através de radioimunoensaio (RIE) e IGF-I através de ensaio imunorradiométrico (IRMA) em momentos estratégicos do experimento.

Os kits utilizados para cada ensaio e os respectivos coeficientes de variação (CV) estão descritos na Tabela 3. As dosagens de progesterona sérica foram realizadas no Dia 7 do ciclo estral, de estradiol sérico e de IGF-I foram realizadas nos dias da ovulação e 1 e 2 dias antes desta. As dosagens insulina foram feitas no dia do estro, da ovulação e no momento da OPU. A dosagem de FSH foi realizada no dia do estro, da ovulação e da terceira OPU. As dosagens de IGF-I total foram realizadas após extração de acordo com as instruções presentes no kit. Para análise de E2, as amostras de soro sofreram dupla extração com éter dietílico e o ensaio foi realizado utilizando-se kit com modificações de acordo com

Kulick et al. (1999). A quantificação do FSH sérico foi realizada usando USDA-bFSH para iodinação e padrões de referência, e anti-soro NIDDK-anti-oFSH (Bolt & Rollings, 1983).

Tabela 3. Descrição dos kits utilizados e coeficientes de variação (CV) intra-ensaio obtidos nas dosagens hormonais realizadas.

Ensaio	Kit	CV intra-ensaio (%)
Progesterona	Coat-a-Count Progesterone, DPC-Medlab (TKPG2)	7,5
Estradiol 17 β	DSL-39100, Estradiol 3ª geração RIA	7,4
FSH	Vide texto	5,6
Insulina	Coat-a-Count Insulin, DPC-Medlab (TKIN5)	4,8
IGF-I total	DSL-5600 IRMA Active™	5,7

Por razões de perda ou quantidade insuficiente de amostras e também de não sincronização da ovulação de alguns animais, os resultados de dosagens hormonais não são necessariamente referentes aos 20 animais.

5.4. Produção *in vitro* de embriões

Dentre as sete aspirações por animal, em seis foram coletados ovócitos para produção de embriões *in vitro*. Os 10 animais de cada grupo foram divididos em dois subgrupos para serem aspirados apenas metade de cada grupo em cada dia de aspiração. Sendo assim tiveram quatro dias de aspiração por semana (duas aspirações por animal e dois grupos de aspiração), conseqüentemente, quatro manipulações diferentes por semana perfazendo 12 manipulações.

O líquido aspirado que se depositava no tubo de 50 mL era colocado em filtro para ser lavado com PBS. Posteriormente, era colocado em uma placa de petri de 100x20 mm, onde era feita a procura através de um estereomicroscópio (ZEISS® - Stemi SV6) dos complexos *cumulus* ovócitos (CCOs) e posteriormente classificados. A classificação foi feita da seguinte maneira: grau I, com cumulus compacto, contendo mais de três camadas em volta do ovócito, citoplasma

homogêneo; grau II, com cumulus compacto, mais de três camadas em volta do ovócito, citoplasma um pouco heterogêneo; grau III, com cumulus compacto, pelo menos uma camada completa em torno do ovócito, com o citoplasma heterogêneo; grau IV ovócitos desnudos com citoplasma heterogêneo, ovócitos com citoplasma degenerado, ovócitos atresícos ou expandidos. Os CCOs de qualidade I, II e III foram classificados como de qualidade superior e os ovócitos IV, classificados como de qualidade inferior. Os CCOs eram colocados em gotas de 200 µL cobertas com óleo mineral, sendo uma gota para cada vaca de ovócitos de qualidade superior e uma gota de ovócitos de qualidade inferior. O meio de maturação era composto de TCM 199 com sais de Earl suplementado com 10% de SFB, LH, FSH, L-glutamina, penicilina e estreptomicina. A maturação foi realizada em estufa à 39°C e 5% de CO₂ em ar por 23 a 25 horas.

Após este período de maturação, os ovócitos foram incubados com sêmen de um único touro da raça nelore, de mesma partida, já testada para FIV em gotas de 200 µL de meio de fecundação cobertas por óleo mineral, por 20 a 22 horas à 39°C e 5% de CO₂ em ar. Ao meio de fecundação foi adicionado PHE (penicilamina, hipotaurina e epinefrina) e heparina.

O sêmen utilizado foi descongelado a 36°C por 30 segundos e uma gota foi retirada para avaliação de motilidade e vigor. Posteriormente, o sêmen foi depositado em um tubo de 15 mL com 2 mL de percoll 90% e 2 mL de percoll 45% (1 mL de percoll 90% e 1 mL de meio de capacitação), que encontrava-se estabilizado na estufa a 39°C e 5% de CO₂ em ar. O sêmen foi centrifugado a 700 x g por 20 minutos a 30°C, formando um “pellet” no fundo do tubo. O “pellet” foi retirado cuidadosamente e colocado em outro tubo de 15 mL contendo 1 mL de meio de capacitação sendo novamente centrifugado por 5 minutos. O “pellet” resultante foi re-suspendido em 200 µL de meio de fecundação. Foi avaliado motilidade, vigor e concentração do sêmen após a capacitação e colocado nas gotas que estavam os CCOs em uma concentração de 1x10⁶ espermatozóides/mL. Espermatozóides e CCOs foram incubados por 20 a 22 horas a 39°C e 5% de CO₂ em ar.

Todas as estruturas foram colocadas em gotas de 200 µL de meio de cultivo a 39°C e 5% de CO₂ em ar permanecendo na estufa com as mesmas condições por sete dias. No Dia 2 (Dia 0 considerado o dia da fecundação), foi avaliada a porcentagem de estruturas clivadas e no Dia 7 foi avaliada a

porcentagem de embriões em relação ao número de CCOs que foram colocados para maturar. O meio utilizado para cultivo foi o SOFaaci, suplementado com aminoácidos essenciais, tri-citrato de sódio, myo-inositol e 5% de SFB.

Todos os meios utilizados para maturação, fecundação e cultivo foram fornecidos pela Nutricell® Nutrientes Celulares Ltda. (Campinas, São Paulo, Brasil).

5.5. Expressão gênica nos embriões

Após os sete dias de cultivo, os embriões de qualidade I, segundo classificação da IETS (Stringfellow e Seidel, 1999), passaram por banhos em meio PBS sem adição de SFB e logo em seguida foram colocados em tubos de 0,5 mL com quantidade mínima de PBS e congelados em nitrogênio líquido onde permaneceram até a extração do RNA.

Foram formados quatro *pools* de embriões para cada tratamento (alta e baixa ingestão alimentar), sendo destes, dois de blastocisto (BI) e dois de blastocisto expandido (Bx). A quantidade de embriões em cada pool foi: 15 Bx e 13 BI do grupo alta ingestão e 14 Bx e 11 BI do grupo baixa ingestão para uma primeira análise que foi depois repetida com 28 Bx e 9 BI do grupo alta ingestão e 13 Bx e 13 BI do grupo baixa ingestão. Estes embriões foram obtidos de quatro manipulações diferentes, mas contemporâneas para os dois grupos.

Os embriões foram submetidos à avaliação da expressão dos genes INF- τ , GRB-10, CATALASE, GPX-4, Mn-SOD, e BAX através da técnica de RT-PCR semi-quantitativo. O gene da β -ACTINA foi utilizado como controle constitutivo.

Para a extração do RNA total foi utilizado Trizol Reagent (Invitrogen™) seguindo as recomendações do fabricante, mas com modificações. Os embriões a serem avaliados foram descongelados em gelo, centrifugados para retirada do PBS, e então foi acrescentado 100 μ L de Trizol.

Foram adicionados 25 μ g de glicogênio e levado ao vortex por 5 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, foi adicionado 20 μ L de clorofórmio e voltado no vortex por 15 segundos, e foi feito repouso de 2 minutos em temperatura ambiente. Após o repouso, o tubo contendo o material foi centrifugado a 12000 x g por 15 minutos a 4°C, sendo retirado o sobrenadante transferindo-o para outro tubo. Nesse tubo foi adicionado 50 μ L de isopropanol gelado para precipitar o RNA,

deixando-se *overnight* a -20°C. Após este período, foi feita centrifugação a 13000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e adicionado 100 µL de etanol 75%, centrifugado a 7000 x g por mais 7 minutos a 4°C. Após estes procedimentos, o tubo foi deixado aberto em temperatura ambiente para secagem do “pellet” por 10 minutos. O “pellet” em seguida foi re-suspendido com 8 µL de água “DNase e RNase free”.

O RNA foi tratado com DNase (Promega®) adicionando o tampão da DNase para uma concentração final de 1X. Em seguida, foi adicionado 0,5 µL de DNase 1 UI/µL; o tubo ficou em banho-maria à 37°C por 30 minutos. Em seguida foi colocado no gelo novamente, e posteriormente adicionou-se 1 µL de “stop solution” e novamente foi levado ao banho-maria a 65°C por mais 10 minutos.

A avaliação da expressão gênica foi realizada pela técnica de RT-PCR semi-quantitativa, utilizando o gene da β-ACTINA como constitutivo.

Para a síntese de cDNA foram utilizados 12 µL de RNA total, acrescentando 0,5 µg/µL de oligo(dT) e 200 µM dos 4 dNTP's. Em seguida o tubo foi aquecido a 65°C por 5 minutos. Adicionou-se então o tampão (1X) da enzima transcriptase reversa (RT), 2 µL de DTT (0,1 M) e 40 UI de RNase-OUT. Em seguida a reação foi submetida a 42°C por 52 minutos, sendo que aos dois minutos, o programa foi parado e adicionado ao tubo 200 UI da enzima RT e foi dado segmento ao programa, terminando com um passo a 70°C por 15 minutos.

Para a PCR, as condições de reação foram as seguintes: tampão da Taq 1X, 0,8 mM dos 4 dNTP's, 0,5 µM de cada *primer*, 2UI de Taq DNA polimerase, 2 mM de MgCl₂ para CATALASE, BAX, GPX, MnSOD, INF-τ, GRB-10 e 1 mM para β-ACTINA, 1 µL de cDNA para CATALASE, BAX, GPX-4, MnSOD e 2 µL para os genes GRB-10 e β-ACTINA. Antes da realização das reações de PCR, foi determinado o número de ciclos, na fase exponencial de amplificação, para cada gene em questão. O número de ciclos de amplificação foi de 33 para GPX, MnSOD e INF-τ e 40 ciclos para CATALASE, BAX, GRB-10 e β-ACTINA. Foi utilizado o programa Script I do termociclador.

As seqüências dos “primers” utilizados, bem como o tamanho dos fragmentos amplificados estão mostrados na Tabela 4.

Tabela 4. Seqüência dos *primers* utilizados e tamanhos dos fragmentos amplificados para avaliação dos genes CATALASE, Mn-SOD, INTERFERON- τ , GPX-4, BAX, GRB 10 e ACTINA.

Gene	Primer	Fragmento amplificado
CATALASE		454 pb
sense	5'-GTTGCTTCTCCACTGTT-3'	
antisense	5'-GGCCATAGTCAGGATCTT-3'	
Mn-SOD		307 pb
sense	5'-CCCATGAAGCCTTTCTAATCCTG-3'	
antisense	5'-TTCAGAGGCGCTACTATTTCTTC-3'	
INTERFERON- τ		564 pb
Sense	5'-GCCCTGGTGCTGGTCAGCTA-3'	
antisense	5'-CATCTTAGTCAGCGAGAGTC-3'	
GPX-4		315 pb
Sense	5'-CGCCGAGTGTGGTTTAC-3'	
antisense	5'-AGGTCCTTCTCTATCACCAG-3'	
BAX		198 pb
Sense	TGCAGAGGATGATCGCAGCTGTG	
antisense	CCAATGTCCAGCCCATCATGGTC	
GRB 10		290 pb
Sense	GAAGATGGGACAAGCAAAGT	
antisense	CTGGCACCAAGTAACCATCTG	
β -ACTINA		344 pb
Sense	TATTGCTGCGCTCGTGGT	
antisense	TCTTCTCACGGTTGGCCT	

Os produtos amplificados foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 1,5% e corados com brometo de etídio.

A quantificação relativa dos transcritos foi determinada por densitometria pelo programa Image J, versão 1.36b, utilizando o gene da β -ACTINA como constitutivo.

5.6. Análise estatística

As variáveis foram testadas quanto à sua normalidade e homocedasticidade, através do teste de Lilliefors e Cochran, respectivamente. As variáveis (número de folículos pequenos, médios e grandes; número de folículos aspirados médios, grandes e totais; tamanho do maior folículo; número de ovócitos coletados; número de embriões de ovócitos de qualidade inferior e de blastocistos de ovócitos de qualidade superior) que apresentaram distribuição normal e homocedasticidade e as variáveis (número de folículos totais, de folículos pequenos aspirados, de embriões e blastocistos produzidos a partir de ovócitos de qualidade superior+inferior) que apresentaram distribuição normal e homocedasticidade após sofrerem transformação logarítmica, foram analisadas por análise de variância e pelo teste *t*. As variáveis que não tiveram distribuição normal (embriões produzidos a partir de ovócitos de qualidade superior e blastocistos produzidos de ovócitos de qualidade superior), foram analisadas pelo teste não paramétrico de Wilcoxon. As variáveis binomiais (taxa de recuperação, de ovócitos de qualidade superior, de clivagem, de embrião e de blastocisto) foram analisadas pelo teste de qui-quadrado. Para tais avaliações foi utilizado o programa SAEG, versão 9.0.

Os dados de expressão gênica foram comparados utilizando o programa Prophet, versão 5.0, 1996. As variáveis paramétricas (INT- τ , GRB-10, Mn-SOD, GPX-4, CATALASE), foram analisadas utilizando o teste *t*. As variáveis que não apresentaram distribuição normal (BAX e expressão global dos genes) foram analisadas pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney.

6. RESULTADOS

6.1. Peso e ECC

As vacas no grupo de alta ingestão alimentar ganharam em média 0,96 kg/d de peso vivo (PV) e as alimentadas com baixa ingestão perderam em média 0,93 kg/d de PV durante os 56 dias recebendo a dieta experimental (Figura 2).

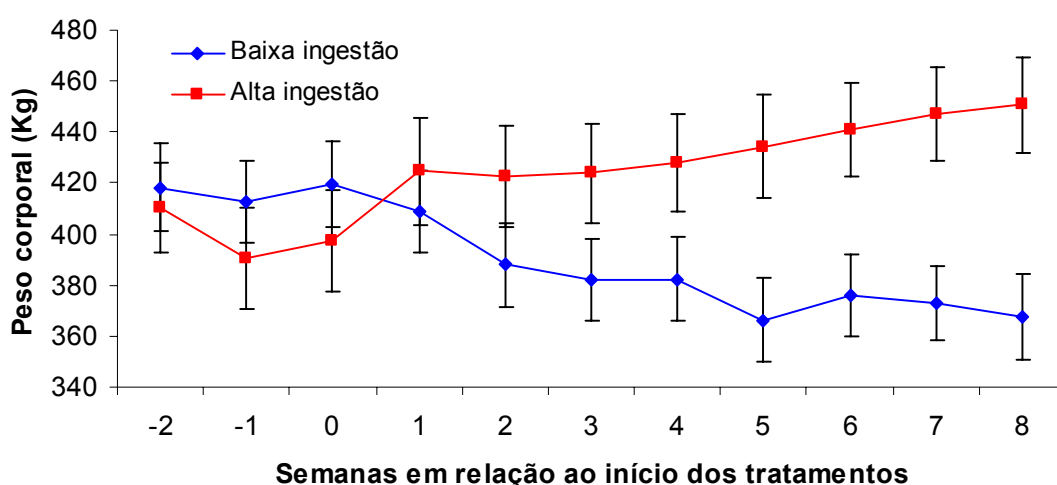


Figura 2. Peso corporal (kg) dos animais (média $\pm$ erro padrão) com baixa ($n = 10$) ou alta ($n = 10$) ingestão alimentar ao longo do período experimental, com duas semanas recebendo dieta de manutenção (-2 e -1) e oito semanas recebendo as dietas experimentais (0 a 8). A partir da terceira semana após o início dos tratamentos, detectou-se diferença ($P < 0,05$) no peso corporal médio entre os grupos.

O ECC (escala de 1 a 5) dos animais durante o período que receberam a dieta de manutenção e as dietas de restrição alimentar e superalimentação está ilustrado na Figura 3. Os animais com baixa ingestão alimentar perderam em média 0,2 pontos de ECC durante o experimento e os animais do grupo de alta ingestão alimentar ganharam em média 1,0 ponto de ECC durante o experimento (Figura 3).

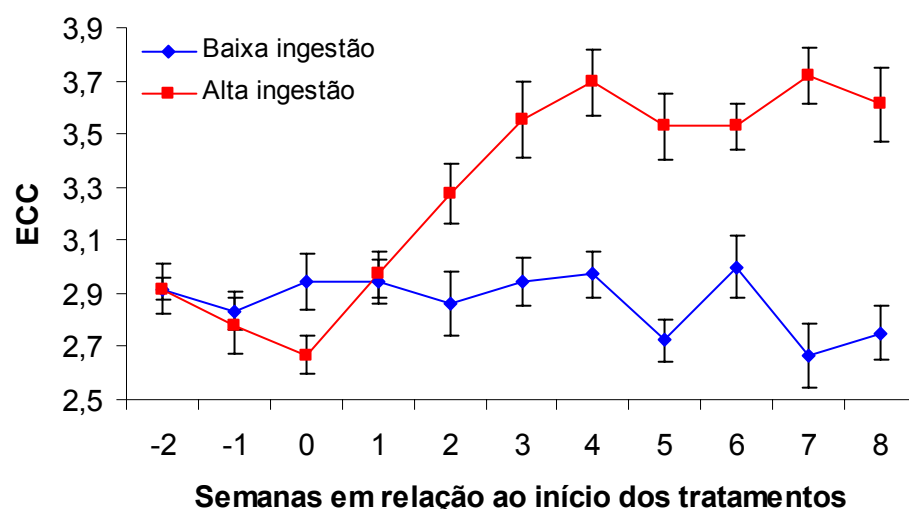


Figura 3. Escore de condição corporal (ECC, escala de 1 a 5; média $\pm$ erro padrão) dos animais com baixa ($n = 10$) ou alta ($n = 10$) ingestão alimentar ao longo do período experimental, com duas semanas recebendo dieta de manutenção (-2 e -1) e oito semanas recebendo as dietas experimentais (0 a 8). A partir da segunda semana após o início dos tratamentos, detectou-se diferença ($P < 0,05$) no ECC médio entre os grupos.

6.2. Folículo ovulatório, corpo lúteo e aspiração folicular

Os dados referentes ao diâmetro do folículo ovulatório, CL, folículos, diâmetro do maior folículo, taxa de recuperação e porcentagem de ovócitos viáveis estão apresentados na Tabela 5.

O diâmetro do folículo ovulatório foi semelhante para os dois grupos, assim como o volume do corpo lúteo no dia 7 do ciclo estral. Quando foi avaliado o número de folículos observados e aspirados, o grupo de alta ingestão alimentar apresentou maior número de folículos médios, grandes e totais, mas o número de folículos pequenos foi semelhante para os dois grupos. O diâmetro do maior folículo, durante as aspirações, foi superior no grupo que recebeu alta ingestão alimentar.

Com relação ao número de ovócitos recuperados, os dois grupos apresentaram resultados semelhantes, assim como a taxa de recuperação. E foi observada uma tendência para os animais que receberam alta ingestão alimentar, a apresentar menor número de ovócitos de qualidade superior.

Tabela 5. Resultados (média $\pm$ erro padrão) de diâmetro do folículo ovulatório, volume do corpo lúteo no Dia 7 do ciclo estral e das variáveis detectadas durante as seis sessões de aspiração folicular (folículos observados e folículos aspirados/vaca/sessão; diâmetro do maior folículo, taxa de recuperação e porcentagem de ovócitos viáveis) em vacas submetidas a baixa (n = 10) ou alta (n = 10) ingestão alimentar.

Variável		Baixa ingestão	Alta ingestão	P
Folículo ovulatório (mm)		12,5 $\pm$ 0,8	12,8 $\pm$ 0,4	0,78
Corpo lúteo (mm ³)		2891,6 $\pm$ 418,2	2469,3 $\pm$ 578,2	0,58
Folículos; n	Diâmetro			
	3 a 5,5 mm	12, 3 $\pm$ 1,1	14,3 $\pm$ 1,5	0,28
	6 a 8,5 mm	1,5 $\pm$ 0,15	2,1 $\pm$ 0,20	0,02
	>9 mm	0,2 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,1	0,005
	Total	14,1 $\pm$ 1,1	17,0 $\pm$ 1,5	0,14
Folículos aspirados; n				
	Diâmetro			
	3 a 5,5 mm	10,1 $\pm$ 0,7	11,8 $\pm$ 1,1	0,29
	6 a 8,5 mm	1,5 $\pm$ 0,2	2,1 $\pm$ 0,2	0,02
	>9 mm	0,2 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,1	0,001
	Total	11,9 $\pm$ 0,8	14,5 $\pm$ 1,2	0,007
Maior folículo; mm		7,8 $\pm$ 0,3	9,3 $\pm$ 0,3	0,005
Ovócitos coletados; n		8,9 $\pm$ 0,8	10,4 $\pm$ 1,8	0,30
Recuperação geral; % (n/n)		74,6 (623/835)	72,0 (732/1017)	0,20
Ovócitos de qualidade superior (G I, II e III); % (n/n)		48,6 (303/623)	44,0 (322/732)	0,08

6.3. Concentrações séricas de estradiol, progesterona, FSH, insulina e IGF-I

Não detectou-se diferença nas concentrações séricas de progesterona (Figura 4) entre os animais dos dois grupos experimentais (Tabela 6). Entretanto, o grupo com baixa ingestão alimentar apresentou concentrações séricas de estradiol antes da ovulação mais altas do que o grupo de alta ingestão (Figura 5; Tabela 6).

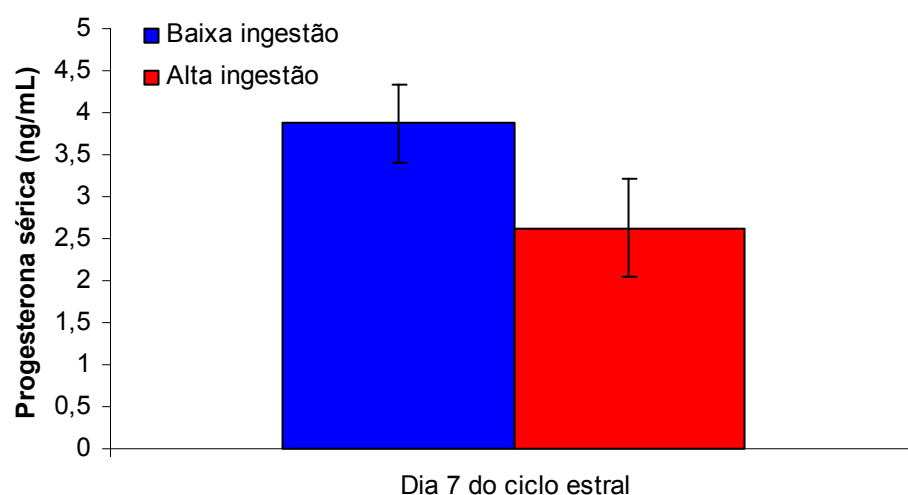


Figura 4. Concentrações séricas de progesterona (ng/mL; média $\pm$ erro padrão) dos animais com baixa (n = 7) ou alta (n = 8) ingestão alimentar no dia 7 do ciclo estral. Não detectou-se diferença ($P = 0,12$) entre os grupos.

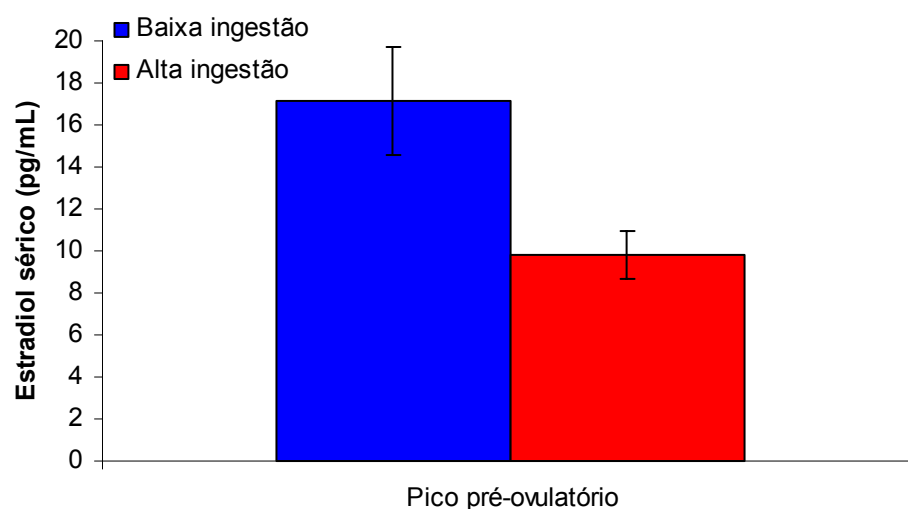


Figura 5. Concentrações séricas de estradiol (pg/mL; média $\pm$ erro padrão) dos animais com baixa (n = 7) ou alta (n = 6) ingestão alimentar no período peri-ovulatório. Houve diferença ($P = 0,03$) entre os grupos.

As concentrações séricas de FSH no período peri-ovulatório (dia do estro e ovulação) também não diferiram entre os tratamentos (Figura 6; Tabela 6), entretanto houve uma tendência ($P = 0,07$) para as vacas do grupo de alta ingestão apresentarem concentração sérica de FSH maior no dia da terceira aspiração (Figura 7; Tabela 6).

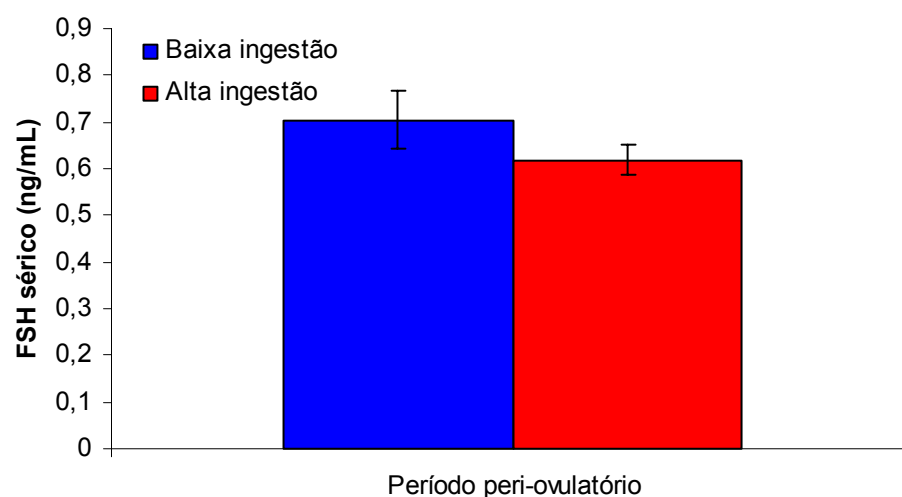


Figura 6. Concentrações séricas de FSH (ng/mL; média $\pm$ erro padrão) dos animais com baixa (n = 7) ou alta (n = 8) ingestão alimentar durante o período peri-ovulatório, anterior às aspirações foliculares. Não detectou-se diferença (P = 0,38) entre os grupos.

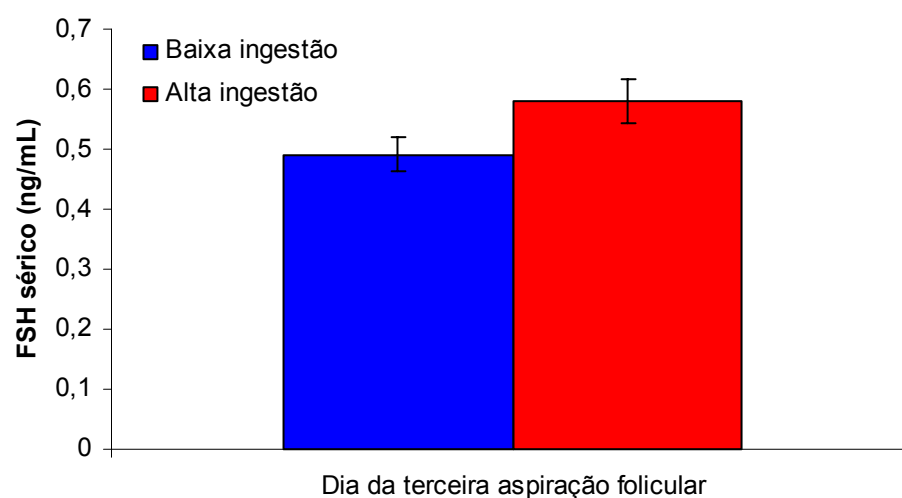


Figura 7. Concentrações séricas de FSH (ng/mL; média $\pm$ erro padrão) dos animais com baixa (n = 10) ou alta (n = 10) ingestão alimentar no momento da terceira aspiração folicular. Houve uma tendência de diferença (P = 0,07) entre os grupos.

Com relação aos resultados das concentrações séricas de IGF-I durante o período peri-ovulatório, não foi observada diferença entre os tratamentos (Figura 8; Tabela 6).

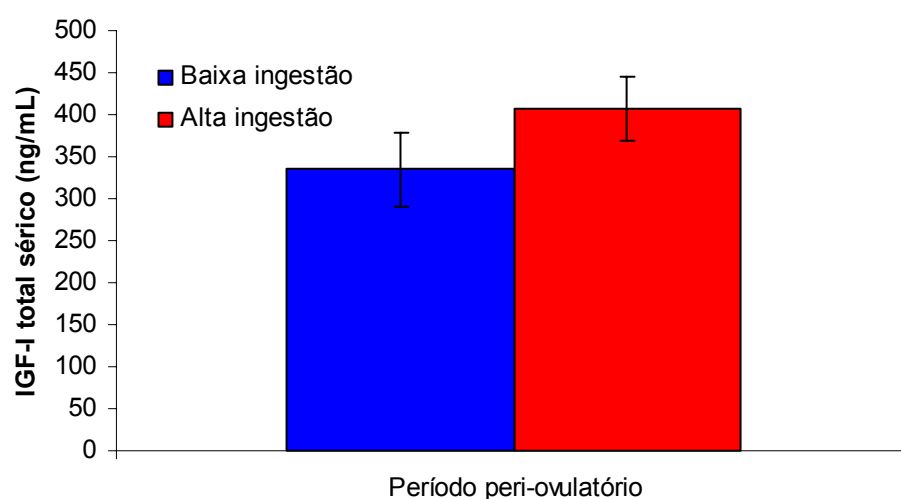


Figura 8. Concentrações séricas de IGF-I total (ng/mL; média $\pm$ erro padrão) dos animais com baixa ($n = 9$) ou alta ($n = 9$) ingestão alimentar durante o período peri-ovulatório, anterior às aspirações foliculares. Não detectou-se diferença ($P = 0,51$) entre os grupos.

As concentrações de insulina no período peri-ovulatório não diferiram entre os dois grupos (Figura 9; Tabela 6), no entanto houve uma tendência ($P = 0,06$) de serem maiores no grupo de alta ingestão alimentar no momento da primeira aspiração (Figura 10; Tabela 6).

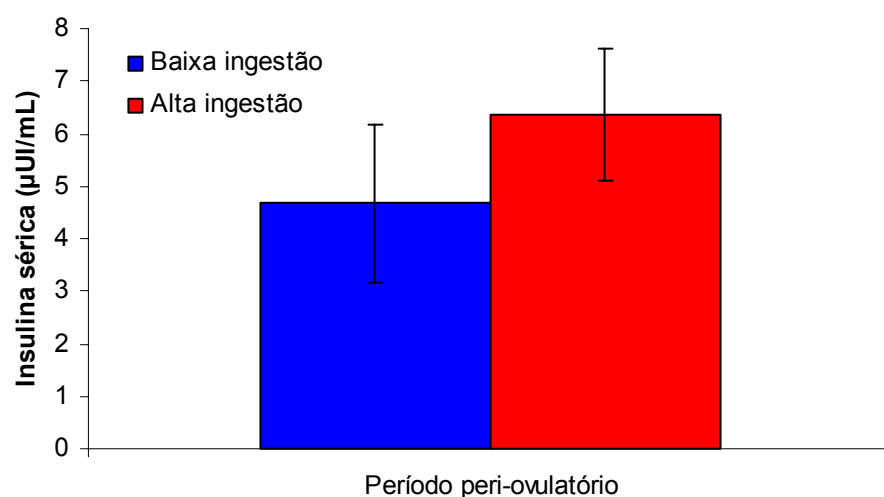


Figura 9. Concentrações séricas de insulina ($\mu\text{UI/mL}$; média $\pm$ erro padrão) dos animais com baixa ($n = 9$) ou alta ($n = 9$) ingestão alimentar durante o período peri-ovulatório, anterior às aspirações foliculares. Não detectou-se diferença ($P = 0,40$) entre os grupos.

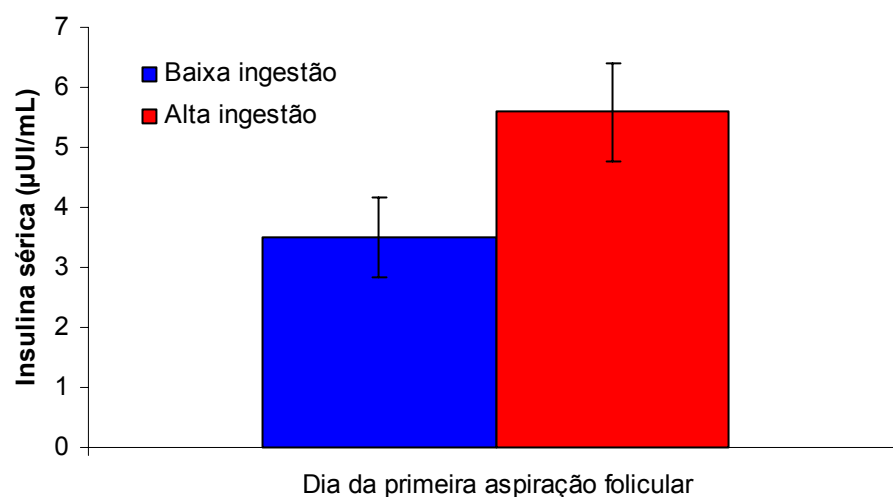


Figura 10. Concentrações séricas de insulina ($\mu\text{UI/mL}$; média $\pm$ erro padrão) dos animais com baixa ($n = 10$) ou alta ($n = 10$) ingestão alimentar no momento da primeira aspiração folicular. Houve uma tendência de diferença ($P = 0,06$) entre os grupos.

Tabela 6. Concentrações séricas (média $\pm$ erro padrão) de hormônios em vacas submetidas a baixa ou alta ingestão alimentar.

	Baixa ingestão	Alta ingestão	P
Progesterona no dia 7 do ciclo estral (ng/mL)	3,9 $\pm$ 0,5 (n=7)	2,6 $\pm$ 0,6 (n=8)	0,12
Pico pré-ovulatório de Estradiol 17 β (pg/mL)	17,2 $\pm$ 2,5 (n=7)	9,8 $\pm$ 1,2 (n=6)	0,03
FSH no período peri-ovulatório (ng/mL)	0,70 $\pm$ 0,08 (n=7)	0,62 $\pm$ 0,04 (n=8)	0,38
FSH no dia da aspiração folicular (ng/mL)	0,49 $\pm$ 0,03 (n=10)	0,58 $\pm$ 0,04 (n=10)	0,07
IGF-I total no período peri-ovulatório (ng/mL)	334,9 $\pm$ 44,0 (n=9)	407,0 $\pm$ 37,2 (n=9)	0,51
Insulina no período peri-ovulatório (μ UI/mL)	4,7 $\pm$ 1,5 (n=9)	6,4 $\pm$ 1,3 (n=9)	0,40
Insulina no dia da aspiração folicular (μ UI/mL)	3,5 $\pm$ 0,7 (n=10)	5,6 $\pm$ 0,8 (n=10)	0,06

6.4. Produção de embriões *in vitro*

A produção de embriões dos animais dos dois diferentes tratamentos foi analisada em relação a dois tipos de ovócitos, classificados como de qualidade superior e inferior. A taxa de clivagem dos ovócitos de qualidade superior ou inferior não diferiu entre os tratamentos (Tabela 7). Da mesma forma, a taxa de embriões (mórulas e blastocistos) e apenas de blastocistos, não foi diferente entre os grupos de baixa ou alta ingestão alimentar (Tabela 7). O número de embriões e de blastocistos oriundos dos ovócitos de diferentes qualidades também não diferiu entre os tratamentos (Tabela 8).

Tabela 7. Taxas de clivagem, de embriões totais (mórulas e blastocistos) e de blastocistos em relação aos ovócitos de qualidade superior, inferior e à soma dos dois observados nos tratamentos de baixa (n = 10 animais) ou alta (n = 10 animais) ingestão alimentar após seis sessões de aspiração ovocitária por vaca com intervalos de 3 ou 4 dias entre as sessões.

	Qualidade do ovócito*	Baixa ingestão	Alta ingestão	P
Clivagem; % (n/n)				
	Superior	68,8 (159/231)	69,8 (178/255)	0,81
	Inferior	39,2 (82/209)	36,4 (96/264)	0,52
	Superior + inferior	54,8 (241/440)	52,8 (274/519)	0,54
Embriões; % (n/n)				
	Superior	45,5 (105/231)	40,0 (102/255)	0,22
	Inferior	13,4 (28/181)	11,7 (31/233)	0,58
	Superior + inferior	30,2 (133/440)	25,6 (133/519)	0,11
Blastocistos; % (n/n)				
	Superior	42,9 (99/231)	37,6 (96/255)	0,24
	Inferior	12,0 (25/209)	10,2 (27/264)	0,54
	Superior + inferior	28,2 (124/440)	23,7 (123/519)	0,11

*Qualidade do ovócito: Superior = ovócitos Grau I, II e III e Inferior = ovócito Grau IV (desnudo, degenerado, expandido, atrésico).

Tabela 8. Média $\pm$ erro padrão da produção de embriões totais e blastocistos/vaca/aspiração com relação aos ovócitos de qualidade superior, inferior e à soma dos dois observados nos tratamentos de baixa (n = 10) ou alta (n = 10) ingestão alimentar após seis sessões de aspiração ovocitária por vaca com intervalos de 3 ou 4 dias entre as sessões.

	Qualidade do ovócito*	Baixa ingestão	Alta ingestão	P
Embriões; n				
	Superior	2,0 $\pm$ 0,6	1,9 $\pm$ 0,5	0,29
	Inferior	0,5 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,3	>0,3
	Superior + inferior	2,4 $\pm$ 0,8	2,5 $\pm$ 0,9	>0,3
Blastocistos; n				
	Superior	1,8 $\pm$ 0,3	1,8 $\pm$ 0,4	>0,3
	Inferior	0,4 $\pm$ 0,2	0,5 $\pm$ 0,3	0,46
	Superior + inferior	2,2 $\pm$ 0,4	2,3 $\pm$ 0,7	>0,3

*Qualidade do ovócito: Superior = ovócitos Grau I, II e III e Inferior = ovócito Grau IV (desnudo, degenerado, atrésico, expandido).

6.5. Expressão gênica dos embriões

Nos blastocistos utilizados para avaliação da expressão gênica, todos os genes avaliados foram expressos nas amostras analisadas (Figura 11).

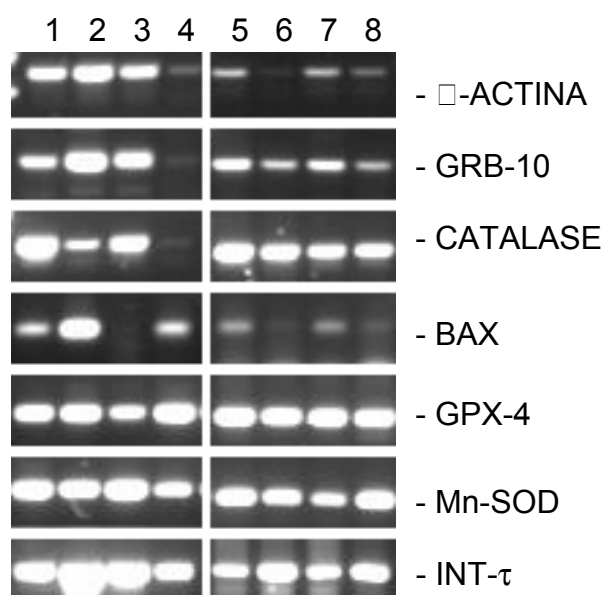


Figura 11. Gel de agarose 1,5% mostrando os produtos amplificados pela RT-PCR, para os genes β -ACTINA, GRB-10 = *growth factor receptor-bound 10*, CATALASE, BAX = B-cell lymphoma protein 2 associated protein X; GPX-4 = glutathione peroxidase 4, MnSOD = magnésio superóxido desmutase e $\text{INF-}\tau$ = interferon tau) em embriões de vacas submetidas a baixa ou alta ingestão alimentar. 1 e 5 = Blastocistos expandidos (Bx) de vacas com alta ingestão; 2 e 6 = Bx de vacas com baixa ingestão; 3 e 7 = Blastocistos (Bl) de vacas com alta ingestão; 4 e 8 = Bl de vacas com baixa ingestão.

Foram utilizados quatro *pools* de embriões de cada tratamento para a avaliação da expressão dos genes estudados, sendo que estavam balanceados em dois estágios de desenvolvimento, Bx e Bl. O gene BAX mostrou-se mais expresso no tratamento de baixa ingestão alimentar em relação à alta ingestão alimentar. Para os genes $\text{INF-}\tau$, CATALASE, MnSOD, GPX-4, GRB-10 não foi observada diferença de expressão entre os tratamentos (Figura 12).

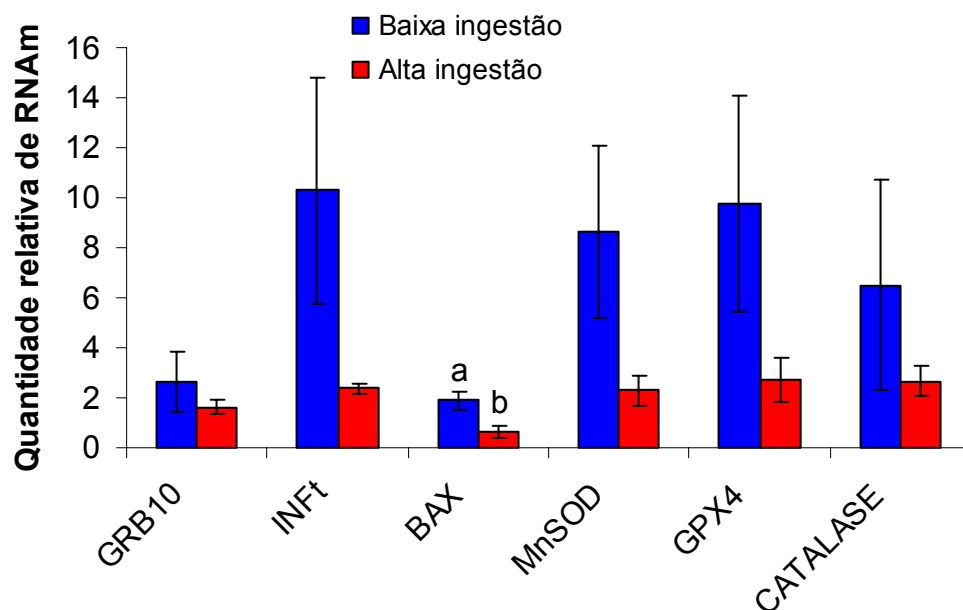


Figura 12. Quantificação (média $\pm$ erro padrão) para os genes MnSOD (magnésio superóxido desmutase), CATALASE, GPX 4 (glutathione peroxidase 4), INF τ (interferon tau), GRB 10 (*growth factor receptor-bound 10*) e BAX (B-cell lymphoma protein 2 associated protein X) em embriões de vacas submetidas a baixa (n = 51) ou alta (n = 65) ingestão alimentar. ^{a,b}Diferença de expressão de um gene específico entre os tratamentos (P < 0,05).

A avaliação de todos os genes agrupados por tratamento, mostrou uma maior expressão gênica global (P < 0,05) nos embriões do grupo de baixa ingestão alimentar (Figura 13).

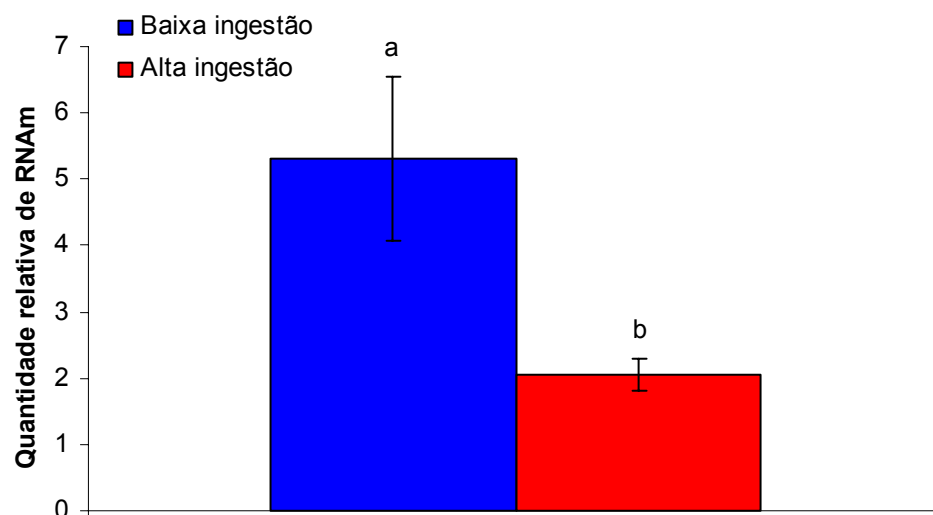


Figura 13. Quantificação (média $\pm$ erro padrão) para os genes agrupados (MnSOD (magnésio superóxido desmutase), CATALASE, GPX-4 (glutathione peroxidase 4), INF τ (interferon tau), GRB-10 (*growth factor receptor-bound 10*) e BAX (B-cell lymphoma protein 2 associated protein X) em embriões de vacas submetidas a baixa (n = 51) ou alta (n = 65) ingestão alimentar. ^{a,b}Diferença entre os tratamentos (P < 0,05).

7. DISCUSSÃO

Os resultados de ganho e perda de peso dos animais que foram submetidos a alta ou baixa ingestão alimentar (Figura 2), principalmente nas primeiras semanas nas dietas experimentais mostraram que os tratamentos resultaram em um acentuado aumento ou perda no peso corporal. Estas mudanças agudas no perfil metabólico dos animais podem ter influência direta no ovário, pois sistemas hormonais que respondem à mudanças na nutrição também afetam a função ovariana. Existem fortes evidências que o fator de ligação entre a nutrição e o folículo são o sistema glicose-insulina, o sistema IGF e a leptina (Scaramuzzi et al., 2006).

Após o período de acentuado ganho ou perda de peso, dependendo do tratamento, que aconteceu durante as primeiras semanas nas dietas experimentais, os animais tiveram menores taxas de ganho e perda de peso. Adicionalmente, a raça Nelore no Brasil é sabidamente bem adaptada para enfrentar condições nutricionais adversas, o que apesar de não ter muito estudo a respeito, pode-se sugerir que nesta raça em especial, os hormônios metabólicos estejam atuando de forma diferenciada na homeostase de energia corpórea e conseqüentemente na reprodução.

Foi avaliado o perfil de alguns hormônios quando os animais estavam há mais de 3 semanas nas dietas experimentais, no período peri-ovulatório. As concentrações séricas de IGF-I total e insulina não foram alteradas neste período. Ao contrário, em novilhas cruzadas (Hereford x Holandês) foi observado aumento de insulina circulante após uma semana de ingestão de 200% da dieta de manutenção (Gong et al., 2002). Nesta mesma categoria animal foi demonstrado aumento de insulina e IGF-I circulantes com 10 dias recebendo dieta altamente energética (Armstrong et al., 2001). Além disso, Gutierrez et al. (1997) descreveram aumento de insulina sem aumento de IGF-I sérico em novilhas recebendo 200% das exigências nutricionais para manutenção após duas semanas na dieta.

Scaramuzzi et al. (2006) relataram que a infusão de glicose em ovelhas provoca um aumento imediato nas concentrações sanguíneas de insulina e leptina, porém sem efeito nas concentrações plasmáticas de IGF-I. Estes autores sugerem com isto, que o IGF-I sozinho não responde a mudanças na dieta por curto prazo,

portanto, os efeitos a curto prazo da nutrição através do sistema IGF no folículo devem ser mediados por outros mecanismos que provavelmente envolvem o sistema insulina-glicose e a leptina.

Já foi demonstrado uma maior taxa de crescimento folicular em animais que ingerem dietas com altos níveis energéticos (Armstrong et al., 2001; Mollo et al., 2007*). No entanto, no presente trabalho, os animais que receberam as dietas de alta e baixa ingestão alimentar, tiveram mesmo tamanho do folículo pré-ovulatório, o que pode ser explicado pelas similares concentrações séricas de insulina e IGF-I entre os dois tratamentos, que são importantes mediadores da estimulação folicular através da nutrição.

Um outro mecanismo fisiológico importante neste processo é o que acontece com mudanças nas concentrações de estradiol circulante, as quais podem estar reduzidas em animais com alta ingestão alimentar como consequência de um aumento na taxa de degradação hepática desse hormônio devido ao aumento no fluxo sanguíneo. Estas mudanças nas concentrações de estradiol podem interferir nas concentrações de FSH, pois é o estradiol quem controla suas concentrações através do feedback negativo (Scaramuzzi et al., 2006). Entretanto, interessante, os animais com alta ingestão mostraram menores concentrações séricas de estradiol, confirmando os prévios estudos, sem alterações nas concentrações séricas de FSH. Diferente do hipotetizado, as menores concentrações de estradiol não foram acompanhadas de diferenças no diâmetro do folículo ovulatório, sugerindo uma maior taxa de degradação hepática desse hormônio ou menor produção. No entanto, o mesmo não foi observado com a progesterona seis dias após a ovulação. Deve-se considerar, entretanto, que pode ter havido um número insuficiente de unidades experimentais no presente estudo que permitisse constatar-se diferença entre os grupos em relação à progesterona circulante, ou mesmo no volume luteal.

As concentrações séricas de insulina foram avaliadas também no início das sessões de aspiração as quais foram maiores ($P = 0,06$) no grupo com alta ingestão. Como já relatado na literatura, este aumento de insulina provoca um aumento no número de folículos pequenos (Gutierrez et al., 1997; Gong et al., 2002).

*Mollo et al. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Universidade de Brasília). Comunicação pessoal, 2007.

No entanto, nosso estudo não observou aumento no número de folículos pequenos, mas ocorreu aumento no número de folículos médios e grandes.

Este aumento de insulina pode ter exercido um efeito na taxa de crescimento folicular, pois durante as aspirações, os animais que foram submetidos à alta ingestão alimentar tinham o diâmetro do maior folículo superior comparado aos animais que estavam sob regime de baixa ingestão alimentar. Outra observação interessante, que também pode estar relacionada ao diâmetro do maior folículo é a concentração circulante de FSH, que tendeu a ser superior ($P = 0,07$) nos animais com alta ingestão alimentar neste mesmo período. Isto pode ser explicado através da influência da nutrição no eixo hipotálamo–hipófise pelas alterações nas concentrações de estradiol de acordo com a dieta, ou seja, com a taxa de degradação deste hormônio, que vai interferir na liberação de FSH (Scaramuzzi et al., 2006).

Foi hipotetizado que os animais submetidos a alta ingestão alimentar iriam apresentar maior número de folículos, acompanhado de qualidade inferior dos ovócitos. Isto está baseado em trabalhos que relataram um efeito prejudicial da superestimulação tanto pela alta concentração de insulina quanto de IGF-I intra-folicular no desenvolvimento do ovócito (Armstrong et al., 2001; Adamiak et al., 2005). De fato, foi observada uma tendência ($P = 0,08$) de redução na porcentagem de ovócitos de qualidade superior no grupo que recebeu alta ingestão alimentar. Apesar disso, não foi observada diferença entre os dois grupos no número de ovócitos coletados e na taxa de recuperação dos mesmos.

Da mesma forma, a taxa de clivagem destes ovócitos foi similar para os dois tratamentos dietéticos, assim como a taxa de embriões e a taxa de blastocisto, tanto para os ovócitos de qualidade superior quanto para os ovócitos de qualidade inferior. Estes resultados mostraram que apesar dos animais com alta ingestão alimentar terem apresentado maior número de folículos, isto não se refletiu em um maior número de ovócitos ou de embriões. Além disso, através da avaliação morfológica, não detectou-se influência na qualidade destes ovócitos e embriões. Ao contrário do encontrado, outros estudos observaram que altos planos nutricionais em ruminantes podem ser prejudiciais à qualidade do ovócito, levando a baixas taxas de desenvolvimento pós-fecundação (Nolan et al., 1998; Armstrong et al., 2001), além de menor número de embriões transferíveis, produzidos *in vivo*, em relação às estruturas recuperados de novilhas de corte superovuladas (Yaakub et

al., 1999). Por outro lado, Nolan et al. (1998) não observaram efeito da dieta fornecida *ad libitum* ou restrita na produção de embriões transferíveis. No entanto, após 24 horas de cultivo uma maior proporção de embriões dos animais com dieta restrita se desenvolveu a blastocisto, além de apresentarem um maior número de células. No presente estudo, os embriões foram retirados do cultivo no Dia 7 para avaliação da expressão gênica. Portanto, não houve possibilidade de avaliar o desenvolvimento em cultivo após este período.

Vale ressaltar que além do efeito da quantidade ingerida da dieta pelos animais, o escore de condição corporal também pode influenciar na qualidade ovocitária e conseqüentemente, na produção de embriões (Adamiak et al., 2005), o que pode diferir entre os diversos trabalhos. Outro ponto importante a ser considerado é a raça dos animais, pois o presente estudo utilizou uma raça ainda pouco pesquisada com relação à influência da nutrição na reprodução. Este fato demonstra claramente a necessidade de mais pesquisas em zebuínos para se determinar interações entre nutrição e reprodução de acordo com diferentes situações de condição metabólica.

Além disso, para se entender os mecanismos pelos quais a dieta estaria interferindo no desenvolvimento embrionário é interessante fazer outras avaliações que se somam às avaliações morfológicas convencionais. Neste estudo, lançou-se mão da análise molecular através da técnica de RT-PCR para avaliação da qualidade embrionária de doadoras de ovócitos submetidas a diferentes níveis de ingestão alimentar.

Dentre os genes analisados, não se observou diferença para os genes INF- τ , GRB-10, CATALASE, MnSOD e GPX-4, sendo que o gene BAX apresentou maior expressão no grupo de restrição alimentar.

Três genes relacionados à qualidade embrionária foram avaliados, o INF- τ , o GRB-10 e o BAX. O INF- τ é responsável pelo reconhecimento materno da prenhez em bovinos (Roberts et al., 1992). Quando novilhas de corte foram alimentadas com dietas isoenergéticas e isoproteicas que produziam níveis diferentes de insulina, de acordo com a produção de propionato ou acetato no rúmen, os embriões coletados com 16 dias de desenvolvimento intra-uterino do grupo com maior produção de insulina produziram um valor 60% a mais de INF- τ

que os embriões do grupo produzindo menos insulina, sem diferença detectável estatisticamente devido à alta variabilidade dos resultados (Mann et al., 2003).

De acordo com Kubisch et al. (2001) a secreção de IFN- τ pelos embriões pode variar com idade e estágio embrionário, com as condições de cultivo as quais eles são submetidos e com a presença de outros embriões no mesmo meio de cultivo.

Os mecanismos pelos quais as alterações na dieta influenciam o processo reprodutivo em geral, dentro disso, a produção e desenvolvimento embrionário, estão relacionados às mudanças no perfil metabólico, as quais modificam alguns fatores importantes que exercem influência desde a foliculogênese até a produção de ovócitos e desenvolvimento dos embriões. Dentre eles se destacam principalmente o hormônio do crescimento (GH), a insulina, os fatores de crescimento semelhante à insulina (IGF) e a leptina (Webb et al., 2004).

Outro gene avaliado foi o GRB-10, que pode ter uma função importante em embriões no estágio pré-implantação, regulando o desenvolvimento embrionário através da regulação dos receptores de insulina e IGF. Já foi observado que a supressão endógena do GRB-10 levou ao aumento nos níveis da proteína IR (receptor de insulina), entretanto, a superexpressão reduziu estes níveis (Ramos et al., 2006). Outro estudo mostrou efeito inibitório do GRB-10 (mGRB-10 $\square$) na proliferação celular mediada pelo IGF-I (Morriane et al., 1997). Além disso, foi demonstrado que o GRB-10, expresso maternalmente, limita o crescimento, possivelmente através da interação direta com a sinalização do IGF-2, que é o maior fator de crescimento placentário e embrionário. Sendo assim, a perda da função do GRB-10 resultou em supercrescimento fetal e placentário (Charalambous et al., 2003). De acordo com estes relatos, pode haver uma estreita relação entre expressão de GRB-10 e o tipo e quantidade de dieta ingerida.

Partindo-se dessas informações relacionadas à função desses genes e considerando-se que as diferenças nas dietas oferecidas aos animais nesse estudo podem ser significativas no sentido de alterar algum parâmetro reprodutivo, esperava-se encontrar diferenças na expressão de genes relacionados à qualidade embrionária no grupo de embriões de animais com a melhor dieta.

O gene BAX está relacionado ao processo de apoptose ou morte celular programada, que tem sido observada em embriões no estágio de pré-implantação em diversas espécies de mamíferos e está presumivelmente envolvida na

eliminação de células anormais ou redundantes (Hardy, 1997; Rubio Pomar et al., 2005). Acredita-se que quando os embriões são cultivados *in vitro* ocorra uma alteração na regulação da produção do BAX. Isto foi observado quando se comparou embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*, avaliando a cinética de desenvolvimento dos mesmos, resultando em transcrição do BAX dois dias antes em embriões cultivados *in vitro* comparados com os embriões cultivados *in vivo* (Gutiérrez-Adán et al., 2004). Makarevich & Markkula (2002) demonstraram através da técnica de Túnel, que avalia células em apoptose, que 87% dos blastocistos bovinos cultivados *in vitro* tiveram reação Túnel positiva em um ou mais blastômeros. O gene BAX tem sido utilizado como marcador de qualidade embrionária (Rizos et al., 2002; Gutiérrez-Adán et al., 2004). Adicionalmente, quando se avalia a relação entre a proteína Bax (pró-apoptótica) e a Bcl-2 (anti-apoptótica; B-cell lymphoma protein 2), que é determinante crítico de sobrevivência ou morte celular, observa-se que nem sempre a alta expressão de BAX pode indicar uma qualidade inferior dos embriões. Yang & Rajamahendran (2002) demonstraram que a expressão da proteína Bcl-2 foi maior que da proteína Bax em ovócitos grau I, embriões de 2-8 células e blastocistos de boa qualidade. Por outro lado, a expressão da proteína Bax foi muito maior em relação à proteína Bcl-2 em ovócitos grau IV e embriões degenerados. Por outro lado, a avaliação da expressão do gene BAX poderia estar indicando qualidade superior dos embriões se aumentada sua expressão juntamente com o gene BCL-2.

Neste estudo observou-se uma maior expressão do BAX nos embriões do grupo de baixa ingestão alimentar. Acredita-se que isto pode ser devido a dois fatores. O primeiro é que estes embriões tenham uma maior capacidade de desenvolvimento com maior número de células e consequentemente maior eliminação de células por apoptose, não sendo isto uma característica ruim desses embriões e sim um evento fisiológico de eliminação de células. Isto está de acordo com os trabalhos de McEvoy et al. (1995), Yaakub et al. (1999) e Nolan et al. (1998) que encontraram embriões de melhor qualidade advindos de animais sob restrição alimentar. Apesar de Nolan et al. (1998) não terem observado diferença no número de embriões transferíveis provenientes de fêmeas com restrição alimentar em relação à alimentação *ad libitum*, a taxa de crescimento dos embriões após 24 horas de cultivo foi maior quando os animais receberam dieta restrita, além de apresentarem maior número de células. Um segundo aspecto seria que por estes

embriões terem uma qualidade e desenvolvimento melhores, o nível global de transcrição nas células estaria aumentado, aumentando também o BAX, e essa hipótese é bem suportada quando se observa o resultado da avaliação de todos os genes agrupados, onde se observou uma maior expressão gênica conjunta no grupo de restrição (Figura 13). Contudo, neste estudo não foram avaliados o número de células e atividade metabólica dos embriões.

Outro aspecto que vale a pena ser considerado é que o tratamento de restrição alimentar pode ter provocado algum tipo de estresse, fazendo com que os ovócitos modificassem seu perfil bioquímico, refletindo positivamente na qualidade dos embriões, no caso aumentando o nível de transcrição global, como uma forma de defesa e estímulo à sobrevivência mostrando sua plasticidade e melhorando assim sua qualidade. Isto está de acordo com Meyer & Silva (1999) que citam que células submetidas ao estresse podem sobreviver ou morrer, na dependência do tipo celular e intensidade do estresse e de outros fatores. Estes autores descrevem que a exposição prévia das células a estresses não letais promove a síntese de proteínas relacionadas ao estresse, aumentando assim os níveis das mesmas dando à célula meios para facilitar a síntese de novas proteínas, que irão substituir aquelas destruídas no estresse metabólico.

Nesta mesma linha de raciocínio, foi avaliado o efeito de um choque subletal (pressão hidrostática) previamente à criopreservação através da vitrificação na capacidade de sobrevivência de blastocistos expandidos de camundongos. Os resultados deste estudo mostraram maior taxa de re-expansão destes embriões estressados comparados aos embriões que não receberam a pressão hidrostática antes do congelamento (4 a 6 horas vs 20 horas) (Pribenszky et al., 2005). Para finalizar este pensamento, ovários de abatedouro quando mantidos por algumas horas antes da obtenção dos ovócitos, observa-se efeito benéfico na competência ovocitária, por simular o início de atresia (Sirard & Blondin, 1996).

Para avaliar a relação entre diferentes tipos de dieta e o estresse oxidativo nos embriões foram avaliados três genes: Mn-SOD, CATALASE e GPX-4. A enzima Mn-SOD está localizada na mitocôndria e tem ação de detoxificação de espécies oxigênio reativas. O H_2O_2 , subproduto de ação da enzima Mn-SOD, é eliminado pela catalase ou GPX (Guérin et al., 2001). A catalase e a GPX-4 são produzidas durante o estresse oxidativo sendo responsáveis pela conversão de radicais livres reativos em H_2O (Edwards et al., 2001). Embriões de novilhas alimentadas com dieta à base

de cevada *ad libitum* tiveram maior expressão do gene Cu/Zn-SOD, enzima importante na proteção contra estresse oxidativo, em relação aos embriões das novilhas que receberam dieta restrita (Wrenzycki et al., 2000). Os autores concluíram, portanto, que uma alta ingestão desta dieta resultou em estresse oxidativo. Contudo, quando outro tipo de dieta foi oferecida *ad libitum* e restrita, à base de polpa de beterraba, este estresse oxidativo não foi observado. Portanto, o tipo e quantidade de dieta fornecida aos animais podem influenciar no nível de estresse oxidativo.

Neste estudo não foi observada expressão diferencial desses três genes individualmente, o que pode significar que os tratamentos não provocaram a produção suficiente de radicais livres para induzir alteração individual significativa na expressão desses genes.

A não detecção de diferenças na expressão individual dos genes INF- τ , GRB-10, CATALASE, MnSOD e GPX-4 entre os tratamentos, pode ser atribuída à grande variação nos níveis de expressão nos embriões (Figura 12), um comportamento comum em estudos de expressão gênica, principalmente em embriões, que sabidamente têm um metabolismo celular acelerado e um comportamento observado também em vários outros experimentos do Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (dados não publicados).

Apesar dos resultados obtidos e dos descritos na literatura, ainda se fazem necessários maiores esclarecimentos sobre a origem dos estímulos responsáveis pelas diferenças no desenvolvimento embrionário de embriões submetidos a diferentes alterações no seu ambiente de cultivo e em diferentes estágios de desenvolvimento. É importante também, a avaliação de como seria a sobrevivência após transferência destes embriões através da taxa de prenhez, para se fazer uma associação entre as análises moleculares e a sobrevivência embrionária. Além disso, se fazem necessários estudos para uma melhor correlação entre estresse celular e sobrevivência embrionária, o que não foi o objetivo deste estudo.

Os genes estudados podem ser importantes marcadores moleculares a serem utilizados para o monitoramento dos sistemas de produção de embriões, desenvolvimento de novos protocolos e para estudos de ciência básica. Análises moleculares vêm se mostrando uma importante ferramenta para se avaliar qualidade

de ovócitos e embriões se somando aos parâmetros de morfologia e taxas de produção de embriões comumente utilizados.

Finalmente, apesar de terem sido avaliados apenas seis genes, o comportamento aumentado no grupo de baixa ingestão alimentar de todos eles em conjunto (Figura 13), aliado ao aumento do gene BAX (Figura 12) e associado à tendência de maior taxa de blastocistos, nos leva a concluir que uma dieta restrita em energia, como a usada neste experimento, influencia positivamente fatores relacionados à qualidade dos ovócitos e conseqüente desenvolvimento embrionário em bovinos.

8. CONCLUSÕES

Alterações na quantidade de matéria seca/energia ingerida pelas fêmeas bovinas podem alterar padrões metabólicos e função reprodutiva, levando a mudanças na dinâmica de crescimento folicular ovariano. Essas alterações hormonais ou metabólicas podem também afetar a qualidade ovocitária e subsequente desenvolvimento embrionário.

Em geral, os efeitos discretos causados pela alta ingestão alimentar, tanto na função ovariana, quanto na qualidade ovocitária e produção *in vitro* de embriões observados em vacas zebus neste estudo contrastam com resultados mais contundentes relatados na literatura em fêmeas taurinas. Isto leva a deduzir que haja diferenças importantes de resposta a alterações na dieta entre as sub-espécies taurina e zebuína, demonstrando, portanto a necessidade da realização de mais estudos relacionados a este tema nas raças *Bos indicus* criadas nos trópicos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMIAK, S.J.; MACKIE, K.; WATT, R.G.; WEBB, R.; SINCLAIR, K.D. Impact of nutrition on oocyte quality: cumulative effects of body composition and diet leading to hiperinsulinemia in cattle. *Biol. Reprod.*, v.73, p.918-926, 2005.

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

BOLT, D.J.; ROLLINS, R. Development and application of a radioimmunoassay for bovine follicles-stimulating hormone. *J. Anim. Sci.*, v.23, p.263-271, 1983.

BOSSIS, I.; WETTEMANN, R.P.; WELTY, S.D.; VIZCARRA, J.A.; SPICER, L. J.; DISKIN, M.G. Nutritionally induced anovulation in beef heifers: ovarian and endocrine function preceding cessation of ovulation. *J. Anim. Sci.*, v.77, p.1536-1546, 1999.

BURATINI JR, J.; PRICE, C.A.; VISINTIN, J.A.; BÓ, G.A. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (BST) on ovarian follicular development in nelore (*Bos indicus*) heifers. *Theriogenology*, v.54, p.421-432, 2000.

BUTLER W.R. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.*, v.60-61, p.449-457, 2000.

CHARALAMBOUS, M.; SMITH, F.M.; BENNETT, W.R.; CREW, T.E.; MACKENZIE, F. Disruption of the imprinted Grb10 gene leads to disproportionate overgrowth by an Igf2-independent mechanism. *Dev. Biol.*, v.100, p.8292-8297, 2003.

CHASE JR, C.C.; KIRBY, C.J.; HAMMOND, A.C.; OLSON, A.C.; LUCY, M.C. Patterns of ovarian growth and development in cattle with a growth hormone receptor deficiency. *J. Anim. Sci.*, v.76, p.212-219, 1998.

CHILLIARD, Y.; DELAVAUD, M.B. Leptin expression in ruminants: Nutritional and physiological regulations in relation with energy metabolism. *Dom. Anim. End.*, v.29, p.3-22, 2005.

COHICK W.S.; ARMSTRONG, J.D.; WHITACRE, M.D.; LUCY, M.C.; HARVEY, R.W.; CAMPBELL, R.M. Ovarian expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF binding proteins, and growth hormone (GH) receptor in heifers actively immunized against GH-releasing factor. *Endocrinology*, v.137, p.1670-1677, 1996.

CORCORAN, D.; FAIR, T.; PARK, S.; RIZOS, D.; PATEL, O.V.; SMITH, G.W.; COUSSENS, P.M.; IRELAND, J.J.; BOLAND, M.P.; EVANS, A.C.O.; LONERGAN, P. Suppressed expression of genes involved in transcription and translation in *in vitro* compared with *in vivo* culture bovine embryos. *Reproduction*, v.131, p.651-660, 2006.

CORRÊA, G.A.; RUMPF, R.; MUNDIM, T.C.D.; FRANCO, M.M.; DODE, M.A.N. Oxygen tension during in vitro culture of bovine embryos: Effect in production and expression of genes relates to oxidative stress. *Anim. Reprod. Sci.*, 2007 (no prelo).

DISKIN, M.G.; MACKEY, D.R.; ROCHE, J.F.; SREENAN, J.M. Effects of nutrition and metabolic status on circulation hormones and ovarian follicle development in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, v.78, p.345-370, 2003.

EDWARDS, J.L.; KING, W. A.; KAWARSKY, S.J.; EALY, A.D. Responsiveness of early embryos to environmental insults: potential protective roles of hsp70 and glutathione. *Theriogenology*, v.55, p.209-223, 2001.

FORTUNE, J.E. The early stages of follicular development activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim. Reprod. Sci.*, v.78, p.135-163, 2003.

FORTUNE, J.E.; RIVERA, G.M.; YANG, M.Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Anim. Reprod. Sci.*, v.82-83, p.109-126, 2004.

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

GONG, J.G.; BRAMLEY, T.; WEBB, R. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: follicular populations and peripheral hormones. *Biol Reprod.*, v. 45, p.941-9, 1991.

GONG, J.G.; ARMSTRONG, D.G.; BAXTER, G.; HOGG, C.O.; GRANSWORTHY, P.C.; WEBB, R. The effect of dietary intake on superovulatory response to FSH in heifers. *Theriogenology*, v.57, p.1591-1602, 2002.

GONG, J.G.; BRAMLEY, T.A.; WEBB, R. The effect of recombinant bovine somatotrophin on ovarian follicular growth and development in heifers. *J. Reprod. Fert.*, v.97, p.247-254, 1993.

GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryos**. Cambridge: CAB International, 1994. 640p.

GUÉRIN, P.; MOUATASSIM, S.E.; MÉNÉZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum. Reprod.*, v.7, p.175-189, 2001.

GUTIERREZ , C.G.; OLDHAM, J.; BRAMLEY, T.A., GONG, J.G.; CAMPBELL, B.K.; WEBB, R. The recruitment of ovarian follicles is enhanced by increased dietary intake in heifers. *J. Anim. Sci.*, v.75, p.1876-1884, 1997.

GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; RIZOS, D.; FAIR, T.; MOREIRA, B.; PINTADO, J.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Effect of speed of development on mRNA expression pattern in early bovine embryos cultured In vivo or in vitro. *Mol. Reprod. Dev.*, v.68, p.441–448, 2004.

HARDY, K. Cell death in the mammalian blastocyst. *Mol Hum. Reprod.*, v.10, p.919–925, 1997.

HOLT, L.J.; SIDDLE, K. Grb10 and Grb14: enigmatic regulators of insulin action- and more? *Biochem. J.*, v.388, p.393-406, 2000.

HOUGHTON, P.L.; LEMENAGER, R.P.; HENDRIX, K. S.; MOSS, G. E; STEWART, T.S. Effects of body composition, pre- and postpartum energy intake and stage of production on energy utilization by beef cows. *J. Anim. Sci.*, v.68, p. 1447-1456,1990.

KUBISCH, H.M.; LARSON, M.A.; EALY, A.D.; MURPHY, C.N.; ROBERTS, R.M. Genetic and environmental determinants of interferon- τ secretion by in vivo- and in vitro-derived bovine blastocysts. *Anim. Reprod. Sci.*, v.66, p.1-13, 2001.

KULICK, L.J.; KOT, K.; WILTBANK, M.C.; GINTHER, O.J. Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. *Theriogenology*, v.52, p.913-921, 1999.

LANGHOUT, D.J.; SPICER, L.J.; GEISERT, R.D. Development of a culture system for bovine granulosa cells: Effects of growth hormone, estradiol, and gonadotropins on cell proliferation, steroidogenesis, and protein synthesis. *J. Anim. Sci.*, v.69, p.3321-3334, 1991.

LONERGAN, P.; FAIR, T.; CORCORAN, D.; EVANS, A.C.O. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology*, v.65, p.137-152, 2006.

MAKAREVICH, A.V.; MARKKULA, M. Apoptosis and Cell Proliferation Potential of Bovine Embryos Stimulated with Insulin-Like Growth Factor I During In Vitro Maturation and Culture. *Biol. Reprod.*, v.66, p.386-392, 2002.

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

MARTIN, G.B.; RODGER, J.; BLACHE, D. Nutritional and environmental effects on reproduction in small ruminants. *Reprod. Fertil. Devel.*, v.16, p.491-501, 2004.

MCSHANE, T.M.; PETERSON, S.L.; MCCRONE, S.; KEISLER, D.H. Influence of food restriction on neuropeptide-Y, pro-opiomelanocortin, and luteinising hormone – releasing hormone gene expression in sheep hypothalmi. *Biol. Reprod.*, v.49, p.831-839, 1993.

MEYER, T.N; DA SILVA, A.L. Resposta celular ao estresse. *Rev. Ass. Med. Brasil.*, v.45, p.181-8, 1999.

MORI, K.; GIOVANNONE, B.; SMITH, R.J. Distinct Grb10 domain requirements for effects on glucose uptake and insulin signaling. *Mol. Cell. Endoc.*, v.230, p.39-50, 2005.

MORRIONE, A.; VALENTINIS, B; RESNICOFF, M; XU, S.; BASERGA, R. The role of mGrb10 α in insulin-like growth factor I - mediated growth. *J. Biol. Chem.*, v. 272, p. 26382–26387, 1997.

MURPHY, M.G.; ENRIGHT, W.J.; CROWE, M.A.; MCCONNELL, K.; SPICER, M.P.; BOLAND, M.P.; ROCHE. Effect of dietary-intake on pattern of growth pf follicles during the estrous-cycle in beef heifers. *J. Reprod. Fert.*, v.92, p.333-338, 1991.

NEIRA, J.A.; TAINTURIER, D.; HARIDON, R.M.L.; MARTAL, J. Comparative IFN- τ secretion after hatching by bovine blastocysts derived *ex vivo* and completely produced *in vitro*. *Reprod. Dom. Anim.*, v.42, p.68-75, 2007.

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

OLIVEIRA, A.T.D.; LOPES, R.F.F.; RODRIGUES, J.L. Gene expression and developmental competence of bovine embryos produced in vitro under varying embryo density conditions. *Theriogenology*, v.64, p.1559-1572, 2005.

PARR, R.A.; DAVIS, I.F.; MILES, M.A.; SQUIRES, T.J. Feed-intake affects metabolic-clearance rate of progesterone in sheep. *Res. in Vet. Sci.*, v.55, p.306-310, 1993a.

PARR, R.A.; DAVIS, I.F.; MILES, M.A.; SQUIRES, T.J. Liver blood-flow and metabolic-clearance rate of progesterone in sheep. *Res. in Vet. Sci.*, v.55, p.311-316, 1993b.

PAULA-LOPES, F.F.; HANSEN, P.J. Apoptosis is an adaptive response in bovine preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, v.295, p. 37–42, 2002.

PRIBENSZKY, C.; MOLNAR, M.; CSEH, S.; SOLTÍ, L. Improving post-thaw survival of cryopreserved mouse blastocysts by hydrostatic pressure challenge. *Anim. Reprod. Sci.*, v.87, p.143-150, 2005.

RAMOS, F.J.; LANGLAIS, P.R.; DERONG, H.; DONG, L.Q.; LIU, F. Grb10 mediates insulin-stimulated degradation of the insulin receptor: a mechanism of negative regulation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, v.290, p.E1262-E1266, 2006.

RIZOS, D.; LONERGAN, P.; BOLAND, M.P.; ARROYO-GARCÍA, R.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; GUTIÉRREZ-ÁDAN. Analysis of differential Messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocystis quality. *Biol. Reprod.*, v.66, p.589-595, 2002.

RIZOS, D.A.; GUTIÉRREZ-ÁDAN, A.; PÉREZ-GARNELO, J. DE LA FUENTE; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol. Reprod.*, v.68, p.236-243, 2003.

ROBERTS, M.R.; CROSS, J.C.; LEAMAN, D.W. Interferons as hormones of pregnancy. *End. Soci.*, v.13, p.432-452, 1992.

RUBIO POMAR, F. J.; TEERDS, K. J.; KIDSON, A.; COLENBRANDER, B.; THARASANIT, T.; AGUILAR, B.; ROELEN, B. A. J. Differences in the incidence of apoptosis between in vivo and in vitro produced blastocysts of farm animal species: a comparative study. *Theriogenology*, v.63, p.2254-2268, 2005.

RUDDOCK, N.T.; WILSON, K.J.; COONEY, M.A.; KORFIATIS, A.; TECIRLIOGLU, R.T.; FRENCH, A.J. Analysis of imprinted messenger RNA expression during bovine preimplantation development. *Biol. Reprod.*, v.70, p.1131-1135, 2004.

SANGSRITAVONG, S.; COMBS, D.K.; SARTORI, R.; ARMENTANO, L.E.; WILTBANK, M.C. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol 17 beta in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, v.85, p.2831-2842, 2002.

SANTOS, J.E.P.; AMSTALDEN, M. Effects of nutrition on bovine reproduction. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, 13., 1998, Atibaia-SP. **Proceedings** ... Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS : Porto Alegre 1998 . v.26, n.1, p.19-89 (Supl.).

SARTORI, R.; HAUGHIAN, J.M.; SHAVER, R.D.; ROSA, G.J.M.; WILTBANK, M.C. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. *J. Dairy Sci.*, v.87, p.905-920, 2004.

SCARAMUZZI, R.J.; CAMPBELL, B.K.; DOWNING, J.A.; KENDALL, N.R.; KHALID, M.; MUNOZ-GUTIÉRREZ, M.; SOMCHIT, A. A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reprod. Nutr. Dev.*, v.46, p.339-354, 2006.

SINCLAIR, K.D.; KURAN, M.; GEBBIE, F.E.; WEBB, R.; McEVOY, T.G. Nitrogen metabolism and fertility in cattle: II. Development of oocytes recovered from heiferes

offered diets differing in their rate of nitrogen release in the rumen. *J. Anim. Sci.*, v.78, p.2670-2680, 2000.

SIRARD, M.A.; BLONDIN, P. Oocyte maturation and IFV in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, v.42, p.417-426, 1996.

SPICER, L.J.; FRANCISCO, C.C. The adipose obese gene product, leptin: evidence of a direct inhibitory role in ovarian function. *Endocrinol.*, v.138, p.3374-3379, 1997.

STOCK, A.E.; FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinology*, v.132, p.1108-1114, 1993.

STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. 3 ed. Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, 1998. 180p.

THIBIER, M. Transfers of both *in vivo* derived and *in vitro* produced embryos in cattle still on the rise and contrasted trends in other species in 2005. Data Retrieval Committee Annual Report. In: IETS Newsletter, v.24, p.12-18, 2006.

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

VASCONCELOS, J.L.M.; SANGSRITAVONG, S.J.; TSAI, S. J.; WILTBANK, M. C. Acute reduction in serum progesterone concentrations after feed intake in dairy cows. *Theriogenology*, v.60, p.795-807, 2003.

VECCHIONE, A.; MARCHESE, A.; HENRY, P.; ROTIN, D.; MORRIONE, A. The Grb10/Nedd4 Complex Regulates Ligand-Induced Ubiquitination and Stability of the Insulin-Like Growth Factor I Receptor. *Mol. Cell. Biol.*, v. 23, p.3362-3372, 2003.

WEBB, R.; GARNSWORTHY, P.C.; GONG, J.G.; ASRMSTRONG, D.G.. Control of follicular interactions and nutritional influences. *J. Anim. Sci.*, v.82 (E. Suppl.), p.E63-E74, 2004.

WRENZYCKI, C.; DE SOUZA, P.; OVERSTROM, E.W.; DUBY, R.T.; HERRMANN, D.; WATSON, A.J.; NIEMANN, H.; O'CALLAGHAN, D.; BOLAND, M.P. Effects of superovulated heifer diet type and quantity on relative mRNA abundances and pyruvate metabolism in recovered embryos. *J. Reprod. Fertil.*, v.118, p.69-78, 2000.

YAAKUB, H.; O'CALLAGHAN, D.O.; BOLAND, M.P. Effect of roughage type and concentrate supplementation on follicle numbers and in vitro fertilization and development of oocytes recovered from beef heifers. *Anim. Reprod. Sci.*, v.55, p.1-12, 1999.

YANG, M.Y.; RAJAMAHENDRAN, R. Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced in vitro. *Anim. Reprod. Sci.*, v.70, p.159-169, 2002.