

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

**INFLUÊNCIA DA INGESTÃO DE MATÉRIA SECA E DA
CONDIÇÃO CORPORAL NA PRODUÇÃO *IN VIVO* DE
EMBRIÕES BOVINOS**

MICHELE RICIERI BASTOS

Botucatu – SP
Junho, 2008

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

**INFLUÊNCIA DA INGESTÃO DE MATÉRIA SECA E DA
CONDIÇÃO CORPORAL NA PRODUÇÃO *IN VIVO* DE
EMBRIÕES BOVINOS**

MICHELE RICIERI BASTOS

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, 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Bastos, Michele Ricieri.

Influência da ingestão de matéria seca e da condição corporal na produção
in vivo de embriões bovinos / Michele Ricieri Bastos. – Botucatu : [s.n.], 2008

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2008.

Orientador: Roberto Sartori Filho

Assunto CAPES: 50504002

1. Bovino (Nelore) - Reprodução

CDD 636.20824

Palavras-chave: Bovino; Condição corporal; Embrião; Nutrição; Superovu-
lação

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

**INFLUÊNCIA DA INGESTÃO DE MATÉRIA SECA E DA
CONDIÇÃO CORPORAL NA PRODUÇÃO *IN VIVO* DE
EMBRIÕES BOVINOS**

MICHELE RICIERI BASTOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA A FACULDADE DE MEDICINA
VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA,
COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU
DE MESTRE EM MEDICINA VETERINÁRIA NA ÁREA DE REPRODUÇÃO
ANIMAL

APROVADA POR:

ROBERTO SARTORI FILHO, Ph.D. (Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia)
ORIENTADOR

JOSÉ BURATINI JUNIOR, Doutor (UNESP/Botucatu)
EXAMINADOR INTERNO

PIETRO SAMPAIO BARUSELLI, Doutor (FMVZ/USP)
EXAMINADOR EXTERNO

Dedico este trabalho:

Aos meus pais,

Jair de Oliveira Bastos e Maria de Fátima Ricieri Bastos

Vocês são muito importantes...

Amo vocês!

Agradecimentos

Aos meus Pais Jair e Fátima, meus exemplos de vida, pelo apoio incondicional e total confiança nas minhas escolhas e no meu trabalho, sem a ajuda de vocês nada disso teria sido realizado e à minha irmã Letícia, obrigada por tudo!!!

Ao orientador Roberto Sartori Filho pelas oportunidades, ajudas imprescindíveis, apoio, confiança, paciência, amizade e pelos inúmeros e valiosos ensinamentos.

À Aline Carvalho Martins pela ajuda incondicional durante todo o experimento.

Aos pesquisadores Alexandre F. Ramos, Rodolfo Rumpf, Eduardo Melo e em especial ao Mauricio M. Franco e à Margot A. N. Dode, pelas colaborações durante os experimentos e por todos os ensinamentos.

Ao Prof. Paulo Mazza e ao Flávio Rocha Alves pela colaboração nas análises estatísticas.

Aos amigos e colegas de trabalho Leonardo Melo, Ligiane Leme, Ester Caixeta, Tatiane Mundim, Monique Guardieiro, Grazieli Marinheiro, Katlen Driessen, Marcos Mollo e José Carvalho Neto pela ajuda durante a execução dos experimentos.

Aos amigos e grandes compaheiros de alojamento Emivaldo (Chivas) e Aline (Baixinha)...muitos finais de semana de trabalho, outros de solidão, muitos outros de estudo...mas companheiro é companheiro sempre!!!

Aos demais amigos que “ganhei” durante todo esse período na Fazenda Sucupira e no Cenargen, vocês são essenciais para tornar a vida longe de casa e da família mais agradável e divertida.

A todos os amigos de Botucatu, em especial à Rosiara, Maria Clara, Jeanne, Hení, Monique e Wangles (não apenas de Botucatu!!!) pelo apoio e companheirismo em todos os momentos e pelos vários bons momentos em Botucatu...saudades!!!

Aos funcionários e amigos da Fazenda Sucupira, sem vocês a execução destes experimentos não seria possível.

À todos os estagiários, pela colaboração e companherismo.

Ao médico veterinário Luiz Henrique Carrijo da Integral Nutrição Animal pelo auxílio na formulação da dieta dos experimentos.

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

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) pelo auxílio financeiro.

À FAPESP pela bolsa de estudo.

Aos Profs. Doutores José Buratini Júnior e Pietro Sampaio Baruselli, componentes da banca examinadora pela disponibilidade e colaboração.

À todos meus sinceros agradecimentos.

Lista de tabelas

Tabela 1-	Porcentagem dos componentes, de MS, de NDT e de PB das dietas experimentais.....	74
Tabela 2-	Resultados (média $\pm$ EPM) da população folicular, corpos lúteos e embriões coletados em vacas recebendo dieta de Manutenção ou com alta ingestão de matéria seca (AIMS).....	77
Tabela 3-	Porcentagem dos componentes, de MS, de NDT e de PB das dietas experimentais.....	95
Tabela 4-	Descrição dos kits utilizados e coeficientes de variação (CV) intra-ensaio obtidos nas dosagens hormonais realizadas.....	101
Tabela 5-	Seqüência dos <i>primers</i> utilizados e tamanhos dos fragmentos amplificados para avaliação dos genes IGF-II, IGF-IIR, INTERFERON- τ , BCL-2, BAX, GRB 10 e GAPDH.....	104
Tabela 6-	Esquema de análise de variância para delineamento fatorial.....	106
Tabela 7-	Esquema de análise de variância para delineamento fatorial (Taxa de eclosão).....	106
Tabela 8-	Esquema de análise de variância para delineamento fatorial com as medidas repetidas no tempo (dias -2, -1, 0, 1, 3, 5, 7, 11 e 13).....	107
Tabela 9-	Esquema de análise de variância para delineamento fatorial com as medidas repetidas no tempo para a variável insulina (dias 0, 7 e 13).....	108
Tabela 10-	Resultados (média) da população folicular (n), corpos lúteos (n) e embriões coletados (n), nos animais com maior ECC submetidos à AIMS (>ECC + AIMS; n = 19) e à Manutenção (>ECC + M; n = 19) e dos animais com menor ECC submetidos à AIMS (<ECC + AIMS, n = 17) e à Manutenção (<ECC + M; n = 17).....	113
Tabela 11-	Número médio de ovócitos não fecundados (NF), mórulas e blastocistos, com respectivas médias, CV e probabilidades, nos	114

animais com maior ECC submetidos à AIMS (>ECC + AIMS; n = 19) e à Manutenção (>ECC + M; n = 19) e dos animais com menor ECC submetidos à AIMS (<ECC + AIMS, n = 17) e à Manutenção (<ECC + M; n = 17).....

- Tabela 12- Concentração de insulina nos dias -2, -1, 0, 1, 3, 5, 7, 11 e 13 em relação ao início da AIMS, com respectivas médias, coeficiente de variação (CV) e probabilidades nos animais com maior ECC submetidos à AIMS (>ECC + AIMS; n = 19) e à Manutenção (>ECC + M; n = 19) e dos animais com menor ECC submetidos à AIMS (<ECC + AIMS, n = 17) e à Manutenção (<ECC + M; n = 17)..... 115
- Tabela 13- Concentração (média ± EPM) de IGF-I (ng/mL), nos dias 0, 7 e 13 em relação ao início da AIMS, nos animais com maior ECC submetidos à AIMS (>ECC + AIMS; n = 19) e à Manutenção (>ECC + Manutenção; n = 19) e nos animais com menor ECC submetidos à AIMS (<ECC + AIMS, n = 17) e à Manutenção (<ECC + Manutenção; n = 17) (P>0,05)..... 119
- Tabela 14- Taxas de eclosão (%) dos embriões com 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 horas de cultivo pós descongelação, com respectivas médias, coeficiente de variação (CV) e probabilidades, produzidos por animais com maior ECC submetidos à AIMS (>ECC + AIMS) e à Manutenção (>ECC + M) e por animais com menor ECC submetidos à AIMS (<ECC + AIMS) e à Manutenção (<ECC + M)..... 124
- Tabela 15- Diâmetro dos embriões viáveis (µm), produzidos por animais com maior ECC submetidos à AIMS (>ECC + AIMS) e à Manutenção (>ECC + M) e por animais com menor ECC submetidos à AIMS (<ECC + AIMS) e à Manutenção (<ECC + M), nas horas 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 do cultivo *in vitro* após a descongelação (média ± EPM)..... 129

Tabela 16- Valores de r das análises de correlação entre a concentração sérica de insulina ($\mu\text{g/mL}$) e o diâmetro dos embriões (μm), entre a taxa de eclosão dos embriões após 96 horas de cultivo pós-descongelação (%) e a concentração sérica de insulina ($\mu\text{g/mL}$), entre expressão relativa de mRNA do gene BAX e a concentração sérica de insulina ($\mu\text{g/mL}$) e entre a expressão relativa de mRNA do gene BAX e o diâmetro dos embriões (μm), $p < 0,05$	155
---	-----

Lista de figuras

Figura 1-	Esquema representativo do delineamento experimental, mostrando o período das dietas experimentais, o protocolo de superestimulação ovariana e os exames ultra-sonográficos. Legenda: D-24 a D15 = dias em relação ao início do protocolo de superestimulação (D0); P4 = implante de progesterona, BE = benzoato de estradiol, FSH = hormônio folículo estimulante; PGF = prostaglandina F2 α , GnRH = hormônio liberador de gonadotrofina; IA = inseminação artificial; US = exame ultra-sonográfico. AIMS = alta ingestão de matéria seca (180% em relação à dieta de manutenção).....	75
Figura 2-	Esquema representativo do delineamento experimental, mostrando o período das dietas experimentais, o protocolo de superestimulação ovariana e os exames ultra-sonográficos. Legenda: D-38 a D15 = dias em relação ao início do protocolo de superestimulação (D0); P4 = implante de progesterona, BE = benzoato de estradiol, FSH = hormônio folículo estimulante; PGF = prostaglandina F2 α , GnRH = hormônio liberador de gonadotrofina; IA = inseminação artificial; US = exame ultra-sonográfico. Dietas: AIMS (alta ingestão de matéria seca) = 180% em relação à dieta de manutenção; > e < ECC = elevado e baixo escore de condição corporal.....	97
Figura 3-	Peso corporal (kg) dos animais (média $\pm$ EPM) com maior ECC submetidos à AIMS (>ECC + AIMS; n = 19) e à Manutenção (>ECC + Manutenção; n = 19) e dos animais com menor ECC submetidos à AIMS (<ECC + AIMS; n = 17) e à Manutenção (<ECC + Manutenção; n = 17) ao longo do período experimental. Não houve diferença (P > 0,10) no peso corporal médio entre os grupos submetidos ou não à AIMS.....	110
Figura 4-	Escore de condição corporal (ECC, escala de 1 a 5) dos animais (média $\pm$ EPM) com maior ECC submetidos à AIMS	

	(>ECC + AIMS; n = 19) e à Manutenção (>ECC + Manutenção; n = 19) e dos animais com menor ECC submetidos à AIMS (<ECC + AIMS, n = 17) e à Manutenção (<ECC + Manutenção; n = 17) ao longo do período experimental. Não houve diferença ($P > 0,10$) no ECC médio entre os grupos submetidos ou não à AIMS.....	111
Figura 5-	Concentração (média $\pm$ EPM) de insulina nos dias -2, -1, 0, 1, 3, 5, 7, 11 e 13 em relação ao início da AIMS, nos animais com maior ECC submetidos à AIMS (>ECC + AIMS; n = 19) e à Manutenção (>ECC + Manutenção; n = 19) e dos animais com menor ECC submetidos à AIMS (<ECC + AIMS, n = 17) e à Manutenção (<ECC + Manutenção; n = 17). Não houve efeito de interação entre dieta e ECC ($P > 0,05$).....	116
Figura 6-	Concentração (média $\pm$ EPM) de insulina nos dias -2, -1, 0, 1, 3, 5, 7, 11 e 13 em relação ao início da AIMS, nos animais com maior (n = 38) e menor (n = 34) ECC, independente da dieta a que estavam submetidos. Houve efeito do ECC, os animais com elevado ECC apresentaram maiores concentrações de insulina nos dias -2, -1, 0, 1, 5, 7, 9 e 13 quando comparados aos animais com baixo ECC ($*P < 0,05$).....	117
Figura 7-	Concentração (média $\pm$ EPM) de insulina nos dias -2, -1, 0, 1, 3, 5, 7, 11 e 13 em relação ao início da AIMS, nos animais que estavam submetidos (n = 36) ou não (n = 36) à AIMS, independente do ECC. Houve efeito da dieta, os animais que estavam submetidos à AIMS apresentaram maiores concentrações de insulina nos dias 5, 7, 9 e 13 quando comparados aos animais que permaneceram com dieta de Manutenção durante todo o período experimental ($*P < 0,05$)....	118
Figura 8-	Concentração (média $\pm$ EPM) de IGF-I, nos dias 0, 7 e 13 em relação ao início da AIMS, nos animais com maior ECC submetidos à AIMS (>ECC + AIMS; n = 19) e à Manutenção	120

	(>ECC + Manutenção; n = 19) e dos animais com menor ECC submetidos à AIMS (<ECC + AIMS, n = 17) e à Manutenção (<ECC + Manutenção; n = 17). Não houve efeito de interação ($P > 0,05$).....	
Figura 9-	Concentração (média $\pm$ EPM) de IGF-I, nos dias 0, 7 e 13 em relação ao início da AIMS, nos animais com maior (n = 38) ou menor (n = 34) ECC, independentes da dieta a que estavam submetidos. Houve efeito do ECC, os animais com maior ECC apresentaram maiores concentrações de IGF-I no dia 13 quando comparados aos animais com menor ECC ($^{a,b}P < 0,05$).....	121
Figura 10-	Concentração (média $\pm$ EPM) de IGF-I, nos dias 0, 7 e 13 em relação ao início da AIMS, nos animais que estavam submetidos (n = 36) ou não (n = 36) à AIMS, independente do ECC. Não houve efeito da dieta ($P > 0,05$).....	122
Figura 11-	Taxa de eclosão (%) dos embriões após a descongelação, avaliada às 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 horas após o início do cultivo in vitro, entre os tratamentos: maior ECC submetido à Manutenção (>ECC + Manutenção) e à AIMS (>ECC + AIMS) e menor ECC submetido à Manutenção (<ECC + Manutenção) e à AIMS (<ECC + AIMS). Não houve efeito de interação entre dieta e ECC sobre a taxa de eclosão dos embriões ($P > 0,05$).....	125
Figura 12-	Taxa de eclosão (%) dos embriões após a descongelação, avaliada às 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 horas após o início do cultivo in vitro pós descongelação, comparando embriões produzidos por animais com maior ECC (>ECC) ou menor ECC (<ECC), independente da dieta. A taxa de eclosão foi maior nos embriões provenientes do grupo com maior ECC em relação à dos embriões produzidos pelo grupo com menor ECC ($^{*}P < 0,05$).....	126
Figura 13-	Taxa de eclosão (%) dos embriões após a descongelação, avaliada às 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 horas após o início	

	do cultivo in vitro, comparando os embriões provenientes de animais submetidos ou não à AIMS, independente do ECC. A taxa de eclosão dos embriões provenientes dos animais que estavam recebendo AIMS foi maior em relação à dos provenientes dos animais que estavam recebendo Manutenção apenas na avaliação realizada ao final das 96 horas de cultivo in vitro (*P < 0,05).....	127
Figura 14-	Diâmetro médio (µm) dos embriões viáveis produzidos por animais com maior ou menor ECC submetidos ou não à AIMS, durante todo o período de cultivo in vitro (mensurações realizadas com 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 horas) após a descongelação (média ± EPM) (P = 0,0001).....	130
Figura 15-	Diâmetro médio (µm) dos embriões viáveis produzidos por animais com maior ou menor ECC, independente da dieta, durante todo o período de cultivo in vitro (mensurações realizadas com 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 horas) após a descongelação (média ± EPM) (P = 0,0001).....	131
Figura 16-	Diâmetro médio (µm) dos embriões viáveis produzidos por animais submetidos ou não a AIMS, independente do ECC, durante todo o período de cultivo in vitro (mensurações realizadas com 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 horas) após a descongelação (média ± EPM) (P = 0,654).....	132
Figura 17-	Gel de agarose 1,5% mostrando os produtos amplificados pela RT-PCR, para os genes GAPDH, BAX, BCL-2, IGF-II, IGF-IIR, GRB-10, INFτ em embriões eclodidos em cultivo in vitro pós-descongelação produzidos por novilhas com maior ou menor ECC, submetidas ou não a AIMS. 1 e 2 = Embriões eclodidos do grupo >ECC + AIMS (n = 16); 3 e 4 = Embriões eclodidos do grupo >ECC + Manutenção (n = 16); 5 e 6 = Embriões eclodidos do grupo <ECC + AIMS (n = 16); 7 e 8 = Embriões eclodidos do grupo <ECC + Manutenção (n = 14).....	134
Figura 18-	Expressão relativa (média ± EPM) de mRNA para o gene BAX em embriões eclodidos em cultivo in vitro pós-descongelação	135

	de novilhas com maior ou menor ECC submetidas ou não a AIMS ($P > 0,05$).....	
Figura 19-	Expressão relativa (média $\pm$ EPM) de mRNA para o gene BAX em embriões eclodidos em cultivo in vitro pós-descongelação de novilhas submetidas ou não a AIMS ($P > 0,05$).....	136
Figura 20-	Expressão relativa (média $\pm$ EPM) de mRNA para o gene BAX em embriões eclodidos em cultivo in vitro pós-descongelação de novilhas com maior ou menor ECC. ^{a,b} Diferença na expressão do gene BAX ($P = 0,0257$).....	137
Figura 21-	Expressão relativa (média $\pm$ EPM) de mRNA para o gene BCL-2 em embriões eclodidos em cultivo in vitro pós-descongelação de novilhas com maior ou menor ECC submetidas ou não a AIMS ($P > 0,05$).....	138
Figura 22-	Expressão relativa (média $\pm$ EPM) de mRNA para o gene BCL-2 em embriões eclodidos em cultivo in vitro pós-descongelação de novilhas submetidas ou não a AIMS ($P > 0,05$).....	139
Figura 23-	Expressão relativa (média $\pm$ EPM) de mRNA para o gene BCL-2 em embriões eclodidos em cultivo in vitro pós-descongelação de novilhas com maior ou menor ECC ($P > 0,05$).....	140
Figura 24-	Expressão relativa (média $\pm$ EPM) de mRNA para o gene IGF-II em embriões eclodidos em cultivo in vitro pós-descongelação de novilhas com maior ou menor ECC submetidas ou não a AIMS ($P > 0,05$).....	141
Figura 25-	Expressão relativa (média $\pm$ EPM) de mRNA para o gene IGF-II em embriões eclodidos em cultivo in vitro pós-descongelação de novilhas submetidas ou não a AIMS ($P > 0,05$).....	142
Figura 26-	Expressão relativa (média $\pm$ EPM) de mRNA para o gene BCL-2 em embriões de novilhas com maior ou menor ECC ($P > 0,05$).....	143
Figura 27-	Expressão relativa (média $\pm$ EPM) de mRNA para o gene IGF-	

	IIR em embriões eclodidos em cultivo in vitro pós-descongelção de novilhas com maior ou menor ECC submetidas ou não a AIMS (P > 0,05).....	144
Figura 28-	Expressão relativa (média ± EPM) de mRNA para o gene IGF-IIR em embriões eclodidos em cultivo in vitro pós-descongelção de novilhas submetidas ou não a AIMS (P>0,05).....	145
Figura 29-	Expressão relativa (média ± EPM) de mRNA para o gene IGF-IIR em embriões eclodidos em cultivo in vitro pós-descongelção de novilhas com maior ou menor ECC (P > 0,05).....	146
Figura 30-	Expressão relativa (média ± EPM) de mRNA para o gene GRB-10 em embriões eclodidos em cultivo in vitro pós-descongelção de novilhas com maior ou menor ECC submetidas ou não a AIMS (P > 0,05).....	147
Figura 31-	Expressão relativa (média ± EPM) de mRNA para o gene GRB-10 em embriões eclodidos em cultivo in vitro pós-descongelção de novilhas submetidas ou não a AIMS (P > 0,05).....	148
Figura32-	Expressão relativa (média ± EPM) de mRNA para o gene GRB-10 em embriões eclodidos em cultivo in vitro pós-descongelção de novilhas com maior ou menor ECC (P > 0,05).....	149
Figura33-	Expressão relativa (média ± EPM) de mRNA para o gene INF- τ em embriões eclodidos em cultivo in vitro pós-descongelção de novilhas com maior ou menor ECC submetidas ou não a AIMS (P > 0,05).....	150
Figura34-	Expressão relativa (média ± EPM) de mRNA para o gene INF- τ em embriões eclodidos em cultivo in vitro pós descongelção de novilhas submetidas ou não a AIMS. ^{a,b} Diferença na expressão do gene INF- τ (P = 0,0236).....	151
Figura35-	Expressão relativa (média ± EPM) de mRNA para o gene INF-	152

	τ em embriões eclodidos em cultivo in vitro pós-descongelação de novilhas com maior ou menor ECC ($P > 0,05$).....	
Figura36-	Quantificação (média $\pm$ EPM) para os genes agrupados (BAX, BCL-2, IGF-II, IGF-IIR, GRB-10 e INF_{τ}) em embriões eclodidos em cultivo in vitro pós descongelação de novilhas com $>$ ou $<$ ECC, submetidas ou não a AIMS. Não houve diferença entre os tratamentos ($P > 0,05$).....	153
Figura37-	Análise descritiva comparando a expressssão relativa de mRNA (média $\pm$ EPM) para os genes BAX e BCL-2 em embriões eclodidos em cultivo in vitro pós descongelação de novilhas com maior ou menr ECC, submetidas ou não a AIMS.....	154

Lista de abreviações

AIMS = alta ingestão de material seca
BAX = B-cell lymphoma protein 2 associated protein x
BCL-2 = B-cell lymphoma protein 2
BE = benzoato de estradiol
BI = blastocisto
Bx = blastocisto expandido
CCOs = complexos *cumulus* ovócitos
cDNA = ácido desoxirribonucleico complementar
Cu/Zn-SOD = cobre/zinco superóxido desmutase
CV = coeficiente de variação
ECC = escore de condição corporal
FSH = hormônio folículo estimulante
g = giros
GAPDH = glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GH = hormônio do crescimento
GPX = glutathione peroxidase
GRB = *growth factor receptor-bound*
GnRH = hormônio liberador de gonadotrofinas
LH = hormônio luteinizante
IFN- τ = interferon τ
IGF = fator de crescimento semelhante à insulina
IGFBPs = proteínas ligadoras de IGF
IGFBPase = enzima que degrada IGFBP
IA = inseminação artificial
IR = receptor de insulina
IRMA = ensaio imunorradiométrico
mg/dL = miligramas/decilitros
mHz = megaHertz
 μ m = micrometros
 μ L = microlitros
mL = mililitros
mm = milímetros

MnSOD = gene magnésio superóxido desmutase

MS = matéria seca

NDT = nutrientes digestíveis totais

NPY = neuropeptídeo Y

NRC = Nutrient requirements of beef cattle

PB = proteína bruta

DPBS = *Dulbecco phosphate buffered saline*

PGF2 α = prostaglandina F2 α

P4 = progesterona

PV = peso vivo

rbST = somatotropina recombinante bovina

rGH = receptor de GH

RIE = radioimunoensaio

RNA_m = ácido ribonucleico mensageiro

RT = enzima transcriptase reversa

RT-PCR = Reação em cadeia da polimerase – Transcriptase reversa

SFB = soro fetal bovino

SOV = superovulação

TE = transferência de embriões

TUNEL = (terminal deoxyribonucleotidyl transferase mediated dUTP_{neck end} labelling)

UI = unidades internacionais

Sumário

Lista de tabelas.....	vi
Lista de figuras.....	ix
Lista de abreviações.....	xvi
Resumo.....	xxi
Abstract.....	xxii
CAPÍTULO I.....	23
1.INTRODUÇÃO.....	24
2.REVISÃO DE LITERATURA.....	27
2.1. Influência da ingestão alimentar no crescimento folicular e na resposta superovulatória de fêmeas bovinas.....	27
2.2. Hormônios Metabólicos.....	30
2.2.1. Hormônio do Crescimento (GH).....	30
2.2.2. Sistema IGF.....	33
2.2.3. Insulina.....	36
2.2.4. Glicose.....	38
2.3. Influência da ingestão alimentar na qualidade ovocitária de fêmeas bovinas.....	39
2.4. Influência da ingestão alimentar na produção in vivo de embriões em fêmeas bovinas superovuladas.....	40
2.5. Influência da ingestão alimentar no padrão de expressão de genes relacionados à qualidade de embriões bovinos.....	43
2.5.1. Genes Bax e Bcl-2.....	45
2.5.2. Genes do sistema IGF.....	47
2.5.3. Gene INF- τ	48
2.5.4. Gene GRB-10.....	48
2.6. Influência da ingestão alimentar na congelabilidade de embriões bovinos produzidos in vivo.....	50
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
CAPÍTULO II.....	66
INFLUÊNCIA DA ALTA INGESTÃO DE MATÉRIA SECA NA RESPOSTA	

SUPEROVULATÓRIA EM VACAS MESTIÇAS

RESUMO.....	67
ABSTRACT.....	68
1.INTRODUÇÃO.....	69
2.OBJETIVO.....	71
3.HIPÓTESE.....	72
4.MATERIAL E MÉTODOS.....	73
4.1. Animais.....	73
4.2.Dietas experimentais.....	73
4.3.Protocolo de superestimulação ovariana.....	74
4.4.Exames ultra-sonográficos.....	75
4.5.Colheita e avaliação embrionária.....	76
4.6.Análise estatística.....	76
5.RESULTADOS.....	77
6.DISSCUSSÃO.....	78
7.CONCLUSÕES.....	81
8.AGRADECIMENTOS.....	82
9.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
CAPÍTULO III.....	87

EFEITO DA CONDIÇÃO CORPORAL E DA INGESTÃO ALIMENTAR SOBRE A RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA E PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA EM NOVILHAS NELORE

RESUMO.....	88
ABSTRACT.....	89
1.INTRODUÇÃO.....	90
2.OBJETIVO.....	92
3.HIPÓTESES.....	93
4.MATERIAL E MÉTODOS.....	94
4.1.Animais.....	94
4.2.Dietas experimentais.....	94

4.3. Protocolo de superestimulação ovariana.....	95
4.4. Exames ultra-sonográficos.....	97
4.5. Colheita e avaliação embrionária.....	98
4.6. Congelação dos embriões.....	98
4.7. Cultivo in vitro dos embriões após descongelação.....	99
4.8. Coletas de sangue e Dosagens hormonais.....	100
4.9. Expressão gênica nos embriões.....	101
4.10. Análise estatística.....	105
5. RESULTADOS.....	109
5.1. Peso corporal e escore de condição corporal.....	109
5.2. Resposta superestimulatória e superovulatória e produção embrionária.....	112
5.3. Concentrações séricas de insulina e IGF-I.....	114
5.4. Desenvolvimento in vitro dos embriões após o descongelamento – Taxa de eclosão.....	123
5.5. Diâmetro dos embriões durante o cultivo in vitro.....	128
5.6. Expressão gênica dos embriões.....	133
6. DISCUSSÃO.....	156
7. CONCLUSÕES	162
8. AGRADECIMENTOS.....	163
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	164

BASTOS, M.R. **Influência da condição corporal e da ingestão de matéria seca, previamente à superovulação, na produção *in vivo* de embriões bovinos.** Botucatu, 2008. 156p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito da condição corporal e/ou da alta ingestão de matéria seca (AIMS) na produção *in vivo* de embriões de fêmeas bovinas superovuladas. Em um primeiro experimento, 14 vacas Simental x Nelore não-lactantes com elevado escore de condição corporal (ECC) foram divididas em grupos de Manutenção=M ou alta ingestão de matéria seca=AIMS. As vacas do grupo AIMS receberam dieta com 180% da manutenção, entre 7 dias antes do início da superovulação (SOV) e o final das aplicações de FSH. O grupo M recebeu dieta de manutenção. O número de folículos recrutados e ovulados não diferiu entre os grupos ($P>0,10$). Entretanto, os números de estruturas totais e embriões viáveis colhidos foram maiores no grupo M ($P<0,05$). Em um segundo experimento avaliou-se a influência do ECC associado ou não da AIMS na produção embrionária em 36 novilhas Nelore. AIMS ocorreu por 14 dias antes do início da SOV. Após colheita, os embriões viáveis foram congelados para posterior cultivo até eclosão. Não houve diferença entre os grupos na população folicular ao início da SOV, na resposta superestimulatória ou superovulatória, nem no número ou qualidade dos embriões colhidos. As novilhas com $<ECC$ apresentaram maiores concentrações séricas de IGF-I, entretanto as com $>ECC$ tiveram insulina mais alta. Os embriões dos animais com $>ECC$ apresentaram diâmetro, taxas de eclosão e expressão relativa de mRNA do gene BAX superiores após cultivo do que os coletados no grupo com $<ECC$. Os resultados conflitantes entre os experimentos e com dados da literatura sugerem haver diferentes respostas à alimentação dependendo da raça ou estado nutricional na produção embrionária.

PALAVRAS-CHAVE: Bovino, nutrição, superovulação, embrião.

BASTOS, M.R. **Influence of body condition score and dry matter intake previously to superovulation on *in vivo* embryo production in cattle.** Botucatu, 2008. 128p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effect of body condition and/or high dry matter intake (flushing) on *in vivo* embryo production in superovulated female cattle. A first experiment used 14 non-lactating Nelore x Simmental cows with a high body condition score (BCS) divided into Maintenance=M or Flushing=F groups. Seven days prior to onset of superovulation (SOV) until the last day of treatment with FSH, group F cows were fed a diet to achieve 180% of maintenance. Group M cows were fed a maintenance diet. The number of recruited or ovulated follicles did not differ between groups ($P>0.10$). However, the total number of embryos/ova and the number of viable embryos recovered were greater in the M group ($P<0.05$). A second study investigated whether differences in BCS, associated or not with nutritional flushing, influence the embryo production in 36 Nelore heifers. Nutritional flushing was conducted during 14 days prior to the onset of SOV. After recovery, viable embryos were frozen to be subsequently cultured until hatching. There was no difference among groups for follicle population at onset of SOV, superstimulatory or superovulatory responses, nor number or quality of recovered embryos. Heifers with <BCS had greater blood concentrations of IGF-I, whereas heifers with >BCS had greater insulin. Embryos collected from >BCS heifers had greater diameter, hatching rates and relative expression of the BAX gene mRNA than the ones recovered from <BCS heifers. The conflicting results between the experiments and also in relation to data from the literature suggest that there are different responses to diets depending on animal breed or nutritional status on embryo production.

KEYWORDS: Bovine, nutrition, superovulation, embryo.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1. INTRODUÇÃO

A pecuária brasileira tem tido uma demanda crescente de animais de elevado mérito genético, o que tem impulsionado o uso de técnicas avançadas de biotecnologia, notadamente aquelas associadas a reprodução animal, tal como a superovulação (SOV) e transferência de embriões (TE). Atualmente, o Brasil é um dos países que mais geram produtos utilizando esta biotecnologia, porém com resultados muito variáveis e aquém do ideal. Há variação individual ao tratamento observada tanto em vacas e novilhas *Bos indicus* (Baruselli et al., 2003) quanto em *Bos taurus* (Sartori et al., 2003, 2004; Martins et al., 2005). Esta variabilidade na resposta das doadoras ao tratamento superovulatório é um dos maiores entraves em programas comerciais de TE (Mapletoft et al., 2002; Nogueira et al., 2002; Barros & Nogueira, 2004) e está relacionada não só aos diferentes protocolos superovulatórios, mas também ao estado nutricional do animal (Yaakub et al., 1999a). Em geral, fêmeas de elevado mérito genético que são utilizadas como doadoras de embriões, geralmente não são submetidas a um manejo nutricional adequado, o que compromete os resultados de TE. Além disso, a relação entre nutrição e reprodução é complexa e as respostas são muito variáveis e inconsistentes (Boland & Lonergan, 2003).

A nutrição influencia diretamente a fertilidade de ruminantes através do suprimento de nutrientes específicos requeridos para o processo de desenvolvimento do espermatozóide e do ovócito, ovulação, fecundação, sobrevivência embrionária e estabelecimento da gestação. Pesquisas recentes envolvendo nutrição e fertilidade de bovinos têm demonstrado efeito da nutrição sobre eventos moleculares e celulares que envolvem a produção de gametas, o desenvolvimento embrionário, o crescimento e a implantação do conceito. Mudanças abruptas na composição ou na quantidade de alimento ingerido podem alterar a função ruminal e a homeostase metabólica com consequências adversas na sobrevivência embrionária (Robinson et al., 2006).

Além das alterações nutricionais, o estado metabólico do animal também está entre os fatores que mais afetam o desempenho reprodutivo da fêmea bovina (Webb et al., 2004). No entanto, os mecanismos fisiológicos específicos através dos quais a dieta influencia a reprodução permanecem pouco

entendidos e ainda precisam ser elucidados (Gong, 2002; Diskin et al., 2003). Diversos estudos discutem a influência da nutrição na fertilidade de ruminantes (Butler, 2000; Gong, 2002; Webb et al., 2004). A ingestão de nutrientes age em vários níveis dentro do eixo hipotálamo-hipófise-gônada e afeta fatores de crescimento de origem sistêmica ou local que controlam direta ou indiretamente a função ovariana e a produção embrionária.

A energia é o nutriente que mais afeta a reprodução de fêmeas bovinas. A ingestão insuficiente de energia está correlacionada a um desempenho reprodutivo insatisfatório, atraso na idade à puberdade, atraso no intervalo da primeira ovulação e cio pós-parto e redução nas taxas de concepção e de prenhez em vacas de corte e de leite (Santos et al., 2004). Por outro lado, vários estudos mostram que dietas altamente energéticas diminuem a resposta aos protocolos de superovulação, diminuem a produção embrionária e alteram a expressão de genes importantes para o desenvolvimento embrionário. O mecanismo pelo qual isto ocorre ainda não está claro, mas acredita-se que esteja relacionado com a produção de ovócitos com qualidade comprometida (Dunne et al., 1999; Yaakub et al., 1999b).

Sugere-se que esse comprometimento ovocitário, seja consequência dos efeitos de mudanças agudas na dieta sobre a função ovariana, os quais são conduzidos por outros fatores sistêmicos que não as gonadotrofinas e por fatores produzidos localmente. Webb et al. (2004) afirmam que influências ambientais, como alterações na dieta, afetam a atividade ovariana alterando as concentrações dos hormônios metabólicos, dentre eles o GH (somatotropina), a insulina, o IGF (fator de crescimento semelhante à insulina) principalmente IGF-I e a leptina e relatam também que a nutrição afeta a expressão de mRNA de componentes do sistema IGF ovariano a fim de regular a sensibilidade/resposta dos folículos às gonadotrofinas.

Além da quantidade energética fornecida nas dietas, o desempenho reprodutivo de vacas também está associado ao escore de condição corporal (ECC) que o animal se encontra (Morrison et al., 1999; Bossis et al., 1999). Este ECC e o nível energético da dieta influenciam, de forma sinérgica ou antagônica, em diversos fatores que regulam o desenvolvimento folicular ovariano e a esteroidogênese, refletindo desta forma, qualitativa e

quantitativamente na produção de embriões (Rhodes et al., 1995; Adamiak et al., 2005).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Influência da ingestão alimentar no crescimento folicular e na resposta superovulatória de fêmeas bovinas

Em ruminantes monovulatórios, o crescimento do folículo primordial uma vez iniciado, continua até que ele se torne atrésico ou prossiga até a ovulação. Os mecanismos precisos que controlam o início e o número de folículos primordiais que iniciam o crescimento ainda não são conhecidos. Estudos têm confirmado que para um folículo primordial atingir o estágio pré-ovulatório leva em torno 90 a 120 dias e sabe-se que esse crescimento contínuo é controlado primariamente por fatores de crescimento locais e por gonadotrofinas (Webb et al., 2004).

O início do desenvolvimento e o crescimento folicular durante toda a fase pré-antral parece ser dependente de fatores de crescimento, nessa fase não existe dependência de gonadotrofinas embora RNAm para receptor de FSH tenha sido detectado em folículos com apenas uma ou duas camadas de células da granulosa (folículos primários), antes mesmo da formação da teca interna (Bao & Garverick, 1998; Webb et al., 2004). Estudos *in vivo* e *in vitro* mostraram que o FSH na fase pré-antral acelera o desenvolvimento, mas não é essencial para que ele ocorra. No entanto, assim que esses folículos atingem o diâmetro de 4,0 mm, ou seja, chegam à fase de recrutamento, eles se tornam dependentes de gonadotrofinas e os fatores de crescimento deixam de ser determinantes e assumem um papel permissivo, já que na ausência de gonadotrofinas os folículos crescem apenas até atingirem o diâmetro de 4,0 mm (Campbell et al., 1995; Gong et al., 1996; Webb et al., 2004). A partir dessa fase (recrutamento) em que os folículos passam a ser dependentes de gonadotrofinas, os fatores de crescimento assumem papel permissivo, apenas auxiliando no crescimento (Webb et al., 2004).

Muitos trabalhos já foram desenvolvidos com o objetivo de aumentar o número de folículos recrutados, já que o “pool” folicular presente na fase de recrutamento é pré-requisito para melhorar a resposta aos protocolos de superovulação e consequentemente melhorar a eficiência reprodutiva dos animais domésticos (Fortune, 2003). A resposta superovulatória pode ser

influenciada por fatores intrínsecos (relacionados ao animal) e extrínsecos (ambiente), dentre eles a nutrição. Até o presente momento, o “flushing” nutricional (curto período de superalimentação) (Gutierrez et al., 1997; Armstrong et al., 2002; Gong et al., 2002) e o uso do rbST (somatotropina bovina recombinante) (Gong et al., 1991; Buratini et al., 2000) mostraram ser os principais fatores capazes de influenciar positivamente o número de folículos recrutados e/ou a resposta aos protocolos de superovulação.

A ingestão de diferentes níveis nutricionais por um período curto de tempo (em média com duração de 21 dias) 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 está associado à maior concentração plasmática de fatores de crescimento, principalmente IGF-I e insulina (Freret et al., 2006). No entanto, Bastos et al. (2007a) trabalharam com novilhas Nelore com alto e baixo escore de condição corporal (ECC), submetidas ao “flushing” nutricional (180% da dieta de manutenção) por 14 dias e não encontraram diferença no número de folículos recrutados em relação ao grupo controle (alto e baixo ECC com dieta de manutenção).

Os fatores de crescimento são de origem sistêmica ou produzidos localmente pelas células da granulosa e da teca e podem agir por mecanismos endócrino, parácrino ou autócrino, dentre eles se destacam o sistema IGF, a insulina, a glicose e o hormônio do crescimento (GH) e acredita-se que estes sofram influências de alterações ambientais, principalmente nutricionais.

Exemplos específicos da influência da ingestão alimentar sobre a função ovariana são as correlações entre o diâmetro do folículo pré-ovulatório e perda de peso em vacas de corte (Rhodes et al., 1995), entre balanço energético negativo e crescimento folicular em vacas de leite no período pós-parto (Beam & Butler, 1997) e o efeito da dieta na competência de desenvolvimento de ovócitos de novilhas (Armstrong et al., 2001).

Foi sugerido por Diskin et al. (2003) que os mecanismos que levam a alterações reprodutivas via eixo hipotálamo-hipófise-gônada e alteram a síntese e liberação de gonadotrofinas, dependem do período de duração da mudança nutricional. Gong (2002) relatou que estudos mais recentes

levantaram a hipótese que os hormônios metabólicos exercem um efeito direto no ovário de fêmeas submetidas a tratamentos com dietas diferenciadas. Ainda relatou que não há relação consistente entre condição nutricional e secreção de gonadotrofinas, uma vez que a nutrição não alterou a secreção de FSH em novilhas que entraram em anestro por restrição alimentar prolongada, assim como em novilhas superalimentadas por um período de três semanas.

No entanto, Wettermann & Bossis (1999) afirmam que dieta ingerida e reserva energética corporal influenciam as concentrações de substratos energéticos e hormônios metabólicos no sangue, os quais devem alterar o eixo hipotálamo-hipófise-gônada e relatam que está estabelecido que o decréscimo na pulsatilidade de LH está associado ao anestro induzido nutricionalmente em vacas, mas o sinal metabólico entre reserva energética corporal e secreção de GnRH e LH ainda não está determinado.

Porém, em relação aos efeitos de mudanças agudas na dieta (que não são suficientes para induzir o anestro) sobre a função ovariana, acredita-se que sejam conduzidos por outros fatores sistêmicos que não as gonadotrofinas e por fatores produzidos localmente. Confirmando, Armstrong et al. (2002) encontraram que alterações nos níveis séricos de insulina e IGF-I induzidas por alterações na quantidade da dieta ingerida, têm efeito direto no potencial esteroidogênico das células da granulosa de folículos pequenos (1,0 a 4,0 mm) de bovinos. A dieta aumentou o número de pequenos folículos, a atividade da aromatase e aumentou também a concentração de hormônios metabólicos. Sugerindo que este seja um possível mecanismo através do qual alterações agudas na dieta podem afetar e, possivelmente, controlar o recrutamento folicular, já que as alterações observadas ocorreram apenas nos folículos pequenos, sem nenhuma alteração nos folículos médios.

Webb et al. (2004) também afirmam que influências ambientais, principalmente alterações agudas na dieta, afetam atividade ovariana sem alterar as concentrações circulantes de gonadotrofinas, mas alteram as concentrações dos hormônios metabólicos, dentre eles o GH, a insulina, o sistema IGF e a leptina e relatam também que a nutrição altera o padrão de expressão gênica (RNAm) dos componentes do sistema IGF ovariano, a fim de regular a sensibilidade/resposta dos folículos às gonadotrofinas, sendo possível também aumentar o número de folículos recrutados e consequentemente,

melhorar a resposta aos programas de superestimulação induzida através do uso de tratamentos hormonais a base de FSH.

No entanto, alguns trabalhos observaram efeito nulo (Bastos et al., 2007a; Freret et al., 2006) ou negativo (Mantovani et al., 1993; Nolan et al., 1998; Yaakub et al., 1999b; Wrenzycki et al., 2000; Siddiqui et al., 2002; Lozano et al., 2003; Adamiak et al., 2005; Bastos et al., 2007b; Mollo et al., 2007) da alta ingestão alimentar sobre o número de folículos recrutados e sobre a produção de ovócitos e de embriões. Alguns autores acreditam que “flushing” nutricional associado a um ECC elevado nos animais pode exercer um efeito deletério sobre o crescimento folicular, maturação ovocitária e produção de embriões, possivelmente devido ao excesso de IGF-I (Webb et al., 2004) e à hiperinsulinemia (Adamiak et al., 2005).

2.2. Hormônios Metabólicos

2.2.1. Hormônio do Crescimento (GH)

O GH tem um papel na regulação da função ovariana, mas os mecanismos exatos da sua ação ainda não estão bem esclarecidos. Sabe-se que restrição nutricional leva ao aumento da concentração de GH plasmático, sendo que seu principal efeito parece ser regular a síntese e liberação de IGF-I hepática, entretanto ainda não foi descartada a possibilidade de o GH ter efeito direto no ovário devido à presença de mRNA para receptores de GH (Gong et al., 1991). No entanto, esse possível efeito direto ainda permanece muito controverso. Lucy et al. (1993) através de RT-PCR detectaram apenas pequenas quantidades de RNAm para receptor de GH expresso em células foliculares e células pequenas do corpo lúteo, mas a presença da proteína (himunoistoquímica) não foi detectada em nenhum desses dois tipos celulares, apenas em células luteais grandes encontraram grande quantidade de receptores de GH.

Em relação ao mecanismo de ação e efeito do GH, Diskin et al. (2003) e Fortune (2003) citam trabalhos (Kirby et al., 1996; Eckery et al., 1997; Kolle et al., 1998; Lucy et al., 1998) nos quais foi detectado mRNA para receptores de GH nos folículos ovarianos e existem evidências de que esses receptores

estão presentes nas células da granulosa, o que possibilitaria uma ação direta do GH no ovário. Diskin et al. (2003) ainda reforçam essa hipótese ao citar que em rebanhos com deficiência na expressão de receptores de GH, as fêmeas são capazes de reproduzir, porém, apresentam menor desempenho, sugerindo, portanto, que o GH não seja essencial para a função reprodutiva, mas que atue também como um facilitador, com o objetivo de melhorar a resposta reprodutiva do rebanho.

Fortune (2003) cita em sua revisão o trabalho de Danilovich et al. (2000) no qual populações de camundongos transgênicos com super-expressão de receptores de GH bovino tiveram aumento no número de folículos pré-antrais e antrais, e camundongos que sofreram nocaute dos receptores de GH tiveram concentrações plasmáticas reduzidas de IGF-I e de mRNA de IGF-I ovariano, sendo difícil concluir, nesse caso, se o efeito do GH na função ovariana foi direto ou indireto. Mas, nesta mesma revisão também cita Bachelot et al. (2002), em cujo trabalho foram usados implantes que elevaram as concentrações séricas de IGF-I para próximo do normal, o que não foi suficiente para restabelecer a taxa normal de ovulação, tanto espontânea quanto estimulada. Sugeriram, portanto, que o efeito do GH na população folicular é independente do efeito do IGF-I, ou seja, que além do GH influenciar a liberação de IGF-I hepático, realmente existe a possibilidade de ocorrer uma ação direta do GH via receptores específicos nos ovários.

Chase et al. (1998) e Bossis et al. (1999) mostraram que a liberação de GH é controlada pela nutrição e pela concentração de IGF-I através de “feed back” negativo. No entanto, a ação do GH na liberação de IGF-I é dependente da presença de insulina. Animais subnutridos apresentam elevadas concentrações de GH, baixas concentrações de insulina e de IGF-I. Isso se deve a uma menor atividade dos receptores hepáticos de GH, que pode ser por menor quantidade ou por menor sinalização do segundo mensageiro. A atividade do receptor é determinada pela insulina. A presença da insulina determina receptores ativos e a ausência leva a diminuição da atividade (Chase et al., 1998). Também foi mostrado por Chase et al. (1998) que bovinos com deficiência de receptores de GH (GHRD) eram associados à condição de miniatura e apresentavam menores concentrações de IGF-I, maiores concentrações de GH e menor número de folículos pequenos presentes no

ovário, comparados ao grupo controle. Concluíram que GH e IGF-I são regulados pela nutrição (maior ou menor concentração de insulina) e têm efeitos diretos na função ovariana e que alterações no GH, rGH e IGF-I associadas à nutrição ocorrem independentemente das gonadotrofinas.

Butler et al. (2003) mostraram que a insulina restaura a responsividade ao GH em vacas de leite com balanço energético negativo induzido pela lactação, por afetar a expressão de IGF-I e de receptores de GH. Trabalharam com infusões de insulina (1,0 µg/kg de peso vivo/hora) e observaram que as concentrações de IGF-I aumentaram continuamente durante as infusões, além disso, encontraram maior expressão hepática de mRNA para receptor de GH e para IGF-I no grupo que recebeu as infusões, em relação ao grupo controle. Concluíram que a hipoinsulinemia observada no período pós-parto em vacas de leite é responsável pela menor expressão hepática de receptores de GH, resultando na não ligação do eixo GH-IGF-I. A restauração da insulina plasmática acima de um nível mínimo, ainda não determinado, é importante para restabelecer a funcionalidade do eixo GH-IGF-I em vacas em lactação ou em outras situações que levam ao balanço energético negativo.

Confirmando a hipótese, Gong (2002) mostrou a importância da insulina e do sistema IGF como mediadores do GH no crescimento folicular inicial, ao relatar que novilhas tiveram o número de folículos pequenos aumentados com o aumento da insulina e do IGF-I, mas o mesmo não ocorreu quando apenas o GH foi aumentado. Além disso, citou que concentrações de IGF e insulina de novilhas tratadas com GH agiram em sinergismo com as gonadotrofinas, estimulando a proliferação de células da granulosa em folículos pequenos, mas não em médios e grandes, sendo consistente com observações prévias de que o GH aumenta a população somente de folículos pequenos. De acordo com Gutierrez et al. (1997) estudos *in vitro* mostraram que GH, insulina e IGF-I estimulam a proliferação e esteroidogênese de células da granulosa de bovinos.

A expressão hepática de receptores de GH e de IGF-I respondem agudamente ao “status” nutricional e fisiológico em que os animais se encontram. Está bem estabelecido que a quantidade de receptores de GH presentes no fígado apresenta correlação positiva com as concentrações plasmáticas de IGF-I e com os níveis nutricionais. A inabilidade do GH

estimular a síntese e liberação hepática de IGF-I durante o período de balanço energético negativo é chamada de “resistência ao GH”, e é consequência da hipoinsulinemia presente nesse período. Esta hipoinsulinemia causa “down regulation” dos receptores de GH, logo esses animais apresentam elevadas concentrações séricas de GH, porém as concentrações de IGF-I são drasticamente reduzidas (Butler et al., 2003).

2.2.2. Sistema IGF

Os IGFs são fatores de crescimento semelhante à insulina ou somatomedinas, que são produzidos e secretados primariamente pelo fígado em resposta ao estímulo do GH podendo ou não estar associados à nutrição (Diskin et al., 2003), principalmente às concentrações séricas de insulina. Os receptores de GH são encontrados em diversos tecidos, porém o fígado é o local de maior abundância. A quantidade desses receptores presentes no fígado é dependente da presença de insulina e eles determinam os níveis circulantes de IGF-I (Butler et al., 2003).

Os IGFs atuam como mediadores na maioria das ações promotoras de crescimento do GH e são polipeptídeos de cadeia única com homologia estrutural da pró-insulina. Eles regulam a proliferação e a diferenciação de vários tipos celulares e têm efeitos metabólicos semelhantes à insulina. No entanto, diferentemente da insulina, são produzidos pela maioria dos tecidos e têm capacidade de atuar por via endócrina, assim como por mecanismos parácrino e/ou autócrino (Hafez & Hafez, 2004).

O sistema IGF é complexo e composto por IGF-I e IGF-II, por dois tipos de receptores (tipo-I e II), por seis proteínas ligadoras à IGF que são as IGFBP-1, -2, -3, -4, -5 e -6 e por enzimas de inativação (IGFBPase) das IGFBPs. Não existe especificidade para receptor, porém quando IGF se liga ao receptor tipo II não desencadeia o sinal à célula, por ser inativo. As proteínas ligadoras de baixo peso molecular (IGFBP-2, -4 e -5) apresentam maior afinidade pelos IGFs impedindo que estes se liguem aos receptores. A função das IGFBPases é degradar as IGFBPs possibilitando maior biodisponibilidade de IGF (livre) para se ligar aos receptores (Fortune et al., 2004). O IGF-I, potente agente mitogênico, estimula a diferenciação e proliferação celular e atua de maneira

sinérgica com o FSH na esterodogênese, aumentando a atividade da P450 aromatase (Echternkamp et al., 1994).

Webb et al. (2004) afirmaram que esses fatores produzidos localmente têm papel importante no estágio inicial do desenvolvimento folicular e citam que as células da granulosa de folículos pré-antrais expressam mRNA de ambos IGFBP-2 e receptor tipo I de IGF. Dessa forma, qualquer alteração nos componentes do sistema IGF pode afetar potencialmente o desenvolvimento folicular. Entretanto, ainda existem muitas contradições devido à grande variedade de dados publicados, os quais demonstram tanto a presença quanto a ausência de mRNA de IGF-I nas células da granulosa. Echternkamp et al. (1993) comentam que apesar de o fígado ser a maior fonte de IGF-I mensurável na circulação, RNAm de IGF-I também foi identificado no tecido ovariano de ratos, bovinos, suínos e ovinos. Da mesma forma, dados revisados por Bao & Garverick (1998) e por Fortune et al. (2001) mostraram que Yuan et al. (1997) encontraram expressão de IGF-I (células da granulosa) e -II (células da teca) em pequenos folículos antrais (ainda não recrutados), folículo subordinado e dominante. Além disso, Yuan et al. (1998) e Chadrashekar et al. (2004) também mostraram que a maioria dos folículos não recrutados apresentavam expressão de mRNA para IGFBP-2, sugerindo que o destino dos folículos que possuem mRNA para IGFBP-2 seja a atresia.

No entanto, Ginther et al. (2001) afirmam que somente folículos acima de 9,0 mm de diâmetro expressam mRNA para IGF-I e Armstrong et al. (2001) não detectaram mRNA de IGF-I nem em células da granulosa nem em células da teca. Já o IGF-II tem sido claramente detectado apenas em células da teca de folículos antrais (Yuan et al., 1997; Bao & Garverick, 1998; Webb et al., 2004).

Os efeitos dos IGFs no desenvolvimento de folículos pré-antrais têm variado de acordo com o sistema de cultivo, mas a estimulação foi conseguida quando doses de insulina próximas da fisiológica foram utilizadas. Além disso, baseados nos experimentos desenvolvidos por Elvin & Matzuk (1998), já foi claramente demonstrada a importância dos IGFs para os estágios iniciais do desenvolvimento folicular, pois o nocaute do gene levou a um comprometimento severo da foliculogênese pré-antral e antral inicial em camundongos (revisado por Buratini, 2006).

Ginther et al. (2001), Rivera et al. (2001) e Fortune et al. (2004) mostraram que também há um forte envolvimento do sistema IGF na seleção do folículo dominante e que alterações no sistema IGF folicular são determinantes críticos no estabelecimento da dominância folicular.

Buttler (2000) afirma que os níveis plasmáticos de IGF-I estão diretamente relacionados com o “status” nutricional e que a presença de IGF-I é fator crítico no desenvolvimento folicular. Vacas de leite no período pós-parto que desenvolveram um folículo dominante capaz de ovular apresentavam os níveis de IGF-I 40-50% mais altos durante as duas primeiras semanas comparadas com os níveis presentes nas vacas com folículos não ovulatórios. Além do mais, concentração plasmática de estradiol foi altamente correlacionada com os níveis plasmáticos de IGF-I. Sugerindo que alterações sistêmicas nas concentrações de IGF-I e IGFBPs também afetam suas concentrações no fluido folicular. Afirma também que, durante o período de balanço energético negativo inicial, a habilidade do folículo para produzir suficiente estradiol para a ovulação parece depender da biodisponibilidade de insulina e IGF-I plasmática e de alterações no perfil do balanço energético.

No entanto, Landau et al. (2000) mostraram que as concentrações plasmáticas de insulina e IGF-I decrescem à medida que a deficiência nutricional leva o animal ao anestro, mas em contraste com a insulina, que é sistêmica e chega ao ovário pela circulação, o IGF-I também é produzido localmente no ovário e sua concentração no fluido folicular não é afetada pela condição nutricional. Dessa forma os autores sugerem que a concentração sérica de insulina parece ser o principal sinal nutricional para os centros cerebrais que regulam a secreção de GnRH.

Gutierrez et al. (1997), trabalharam com novilhas superalimentadas e não observaram diferença nas concentrações séricas de IGF-I em relação às novilhas que receberam dieta de manutenção, indicando que IGF-I extra-ovariano (sangue periférico) não altera o desenvolvimento folicular. Mas a biodisponibilidade de IGF-I provavelmente é alterada no fluido folicular. Foi sugerido que maiores concentrações de insulina induzida por alteração nos níveis nutricionais diminuiu a expressão de IGFBPs intraovarianas, aumentando a biodisponibilidade dos IGFs (Armstrong et al., 2001).

No entanto, mais pesquisas ainda são necessárias para o entendimento de como as IGFBPs regulam a ação dos IGFs no desenvolvimento folicular, mesmo sabendo que o “status” nutricional pode alterar a quantidade e a espécie de IGFBP na circulação periférica (Citado por Gong et al., 2002). Webb et al. (2004) afirmam que mudanças induzidas pelo manejo nutricional na concentração circulante de insulina e no sistema IGF são importantes para o recrutamento folicular e citam que pequenos folículos de novilhas superalimentadas tiveram uma redução significativa nos níveis de mRNA de IGFBP-2 e -4, aumentando a biodisponibilidade de IGF. Este provavelmente é um fator crítico determinante do controle do desenvolvimento folicular pré-antral.

2.2.3. Insulina

A insulina é secretada pelas células β do pâncreas e tem papel central no metabolismo corporal, além de sua ação anabólica, também atua como sinal do “status” energético para o sistema nervoso central. Estudos com cultivo *in vitro* de células hipotalâmicas têm mostrado que a insulina pode estimular a liberação de GnRH, sendo também necessária para a pulsatilidade normal de LH. No ovário, receptores de insulina estão amplamente distribuídos nas células da granulosa, da teca e estroma ovariano. Concentrações fisiológicas de insulina provavelmente são necessárias para a esteroidogênese folicular normal, sob ação do FSH, além de atuar como um potente estimulador da mitose (Bossis et al., 1999 ; Buttler et al., 2004). Concentrações de insulina em torno de 100ng/ml estimulam a expressão de mRNA e a atividade da P450 aromatase, além de aumentar a secreção de estradiol (Silva & Price, 2002).

Estudos têm demonstrado a importância da insulina como um sinal mediando os efeitos de alterações agudas na dieta ingerida sobre a dinâmica folicular em bovinos. O decréscimo na fertilidade de vacas de leite com balanço energético negativo no período pós-parto foi associado ao decréscimo nas concentrações de IGF-I e insulina. Concentrações séricas de insulina apresentam variações diurnas, mas também ocorre variação durante o ciclo estral, com significativo aumento durante o período pré-ovulatório. O estradiol é forte candidato como mediador dessas alterações, pois o aumento das

concentrações séricas de insulina ocorre paralelo ao aumento do estrógeno associado ao desenvolvimento do folículo dominante. Foi mostrado que o estrógeno estimula ambos a expressão de mRNA para insulina como também sua secreção pelo pâncreas (Webb et al., 2004).

Além de a insulina atuar como um sinal do “status” energético para o sistema nervoso central, ela também sinaliza o fígado, e sua presença determina a expressão hepática de mRNA para receptor de GH e para IGF-I. Portanto, acredita-se que a insulina é a base que permite a atuação do eixo GH-IGF-I (Butler et al., 2003).

Trabalhos com novilhas taurinas de corte mostraram que a superalimentação por um curto período (máximo de três semanas) aumentou as concentrações séricas de insulina, que conseqüentemente aumentou o número de folículos recrutados, melhorando a resposta superovulatória (Gutiérrez et al., 1997; Gong et al., 2002). No entanto, trabalhos com vacas aneloradas (Martins et al., 2007) e novilhas Nellores (Mollo et al., 2007) superalimentadas (1,7 da dieta de manutenção) apesar de apresentarem maiores concentrações séricas de insulina, não houve aumento no número de folículos recrutados nas vacas, e inesperadamente, as novilhas superalimentadas apresentaram menor número de folículos quando comparadas aos animais do grupo sob restrição alimentar (0,7 da dieta de manutenção).

O atraso na primeira ovulação é comum no período pós-parto em vacas com elevado mérito genético para produção de leite e está associado com menores concentrações circulantes de insulina (Buttler, 2000; Webb et al., 2004). Dietas destinadas a aumentar as concentrações circulantes de insulina podem acelerar a primeira ovulação pós-parto. Para confirmar, Gong (2002) relata que vacas de leite de alta produção que receberam dieta energética (que eleva os níveis de insulina) nos primeiros 50 dias de lactação aceleraram a primeira ovulação pós-parto e diminuíram o intervalo parto/primeiro serviço/concepção. Além disso, quando a dieta foi fornecida durante os 100 primeiros dias de lactação ocorreu aumento na taxa de concepção ao primeiro serviço e reduziu o número de serviços por concepção. Também foi citado que infusão de insulina aumentou tanto o diâmetro do folículo dominante quanto a

taxa de ovulação em novilhas de corte sob restrição alimentar (Webb et al., 2004).

Landau et al. (2000) demonstraram que animais que recebem tratamento nutricional por um curto período apresentaram, além de alterações nas concentrações séricas de insulina, alterações nas concentrações de glicose e insulina no ambiente folicular. Afirmam que houve diferença nas concentrações de insulina e glicose entre folículos pré-ovulatórios e subordinados, ou seja, a dieta afetou a insulina dos folículos pré-ovulatórios, mas não dos folículos subordinados e a concentração da insulina atingiu concentração máxima próximo do estro, sugerindo que nesta fase folicular a insulina parece ser ainda mais importante.

León et al. (2004) trabalharam com novilhas de corte com baixo ECC e as submeteram a superalimentação para ganho médio de peso de 1,0 kg/cabeça/dia e observaram que houve aumento de IGF-I quando o ECC aumentou e que este aumento ocorreu quando o ECC estava entre 2 e 4 (escala de 1 a 10), porém a partir do ECC 4 as concentrações de IGF-I atingiram um platô. Em relação à insulina, observaram que as novilhas apresentaram um certo grau de resistência à insulina e citam que animais com elevado ECC apresentaram hiperglicemia, hiperinsulinemia e resistência à insulina e que também foi reportado que tecido adiposo produz resistina, uma proteína que causa resistência à insulina e sua secreção é “*up-regulated*” com o aumento do tecido adiposo.

2.2.4. Glicose

A glicose parece ser um sinal metabólico gerando informação para o controle da secreção de GnRH. De acordo com sua biodisponibilidade, ela age dentro do sistema nervoso central na detecção de sítios periféricos para o GnRH e modula, de forma indireta, a secreção de LH. A biodisponibilidade de glicose influencia ambos os centros tônico e pré-ovulatório de liberação de GnRH, ou seja, a glicose modula a liberação de GnRH e indiretamente também modula a de LH. Animais com hipoglicemia apresentaram atraso no início da liberação de LH, mas a infusão de glicose restaurou o tempo normal da liberação de LH induzida pelo estrógeno (Diskin et al., 2003).

Bossis et al. (1999) afirmam que animais submetidos à restrição nutricional apresentam reduzidas concentrações de glicose, no entanto, essas alterações provavelmente têm um pequeno impacto direto na função ovariana, pois estudos *in vitro* indicam que apesar de a glicose ser necessária para a esteroidogênese máxima, a concentração pode variar de 25 a 75 mg/dL sem alterar seus efeitos estimulatórios.

No entanto, em relação ao efeito direto da glicose no eixo hipotálamo-hipófise-gônada, Bossis et al. (1999) confirmaram os dados de Diskin et al. (2003), pois relataram que mudanças nas concentrações de glicose devem influenciar a função hipotalâmica-hipofisária, uma vez que a infusão sistêmica de glicose em vacas lactantes em anestro aumentou a frequência de pulsos e a concentração de LH sérico durante tratamento com GnRH. Além disso, a concentração de glicose foi positivamente correlacionada com a dieta ingerida e com a frequência de pulsos de LH em novilhas pré-púberes.

2.3. Influência da ingestão alimentar na qualidade ovocitária de fêmeas bovinas

Embora se saiba que a manifestação final do efeito deletério da nutrição inadequada sobre a fertilidade seja a mortalidade embrionária, ainda não está totalmente elucidado se a nutrição afeta a qualidade embrionária por alterar a capacidade de desenvolvimento dos ovócitos ou por causar mudanças durante o desenvolvimento embrionário, além das possíveis alterações no ambiente uterino (Boland & Lonergan, 2003; Nolan et al., 1998). Alguns estudos recentes têm estabelecido que a produção embrionária é determinada pela qualidade intrínseca do ovócito, enquanto o ambiente pós-fecundação determina a qualidade e capacidade de desenvolvimento dos embriões, independente da origem do zigoto (Rizos et al., 2002; Rubio Pomar et al., 2005).

Como dados da literatura fazem crer que a nutrição pode afetar todo o processo de foliculogênese, acredita-se que ocorra alterações nos ovócitos quanto à sua qualidade. Boland et al. (2001) citaram que dados da literatura já mostraram que o excesso de ingestão alimentar reduz a resposta superovulatória e a produção embrionária, além de alterar o padrão de expressão de genes relacionados ao desenvolvimento embrionário. Porém os

mecanismos desses efeitos não estão claros, mas todos sugerem que a qualidade dos ovócitos produzidos seja comprometida.

McEvoy et al. (1995) trabalhando com ovelhas concluíram que ovelhas com ingestão energética restrita a 0,6 vezes a dieta de manutenção produziam ovócito com maior capacidade de desenvolvimento *in vivo* e *in vitro* do que ovelhas alimentadas com 2,3 vezes a dieta de manutenção.

Confirmando os efeitos deletérios, Adamiak et al. (2005) mostraram efeito negativo da hiperinsulinemia na qualidade dos ovócitos e esta hiperinsulinemia foi provocada por ingestão de altos níveis nutricionais acompanhada de elevado escore de condição corporal, mostrando que os efeitos dependem não só da quantidade de dieta ingerida, mas também da condição corporal dos animais.

No entanto, num estudo com novilhas de corte submetidas a alta e baixa ingestão alimentar, não foi encontrado efeito da dieta sobre a qualidade morfológica dos ovócitos, nem sobre a capacidade de desenvolvimento *in vitro* desses ovócitos. Porém, quando foi avaliada a taxa de desenvolvimento de embriões coletados *in vivo* e cultivados *in vitro* por 24 horas, foi observado que os embriões coletados de novilhas submetidas à restrição alimentar se desenvolveram melhor comparados aos do grupo com dieta *ad libitum*. Sugerindo que a dieta não afetou a morfologia ovocitária, mas sim sua capacidade de desenvolvimento pós-fecundação (Nolan et al., 1998).

2.4. Influência da ingestão alimentar na produção *in vivo* de embriões em fêmeas bovinas superovuladas

Sabe-se que produção e qualidade embrionária devem ser consideradas para uma melhor eficiência da técnica de transferência de embriões (Rubio Pomar et al., 2005). Porém, resposta superovulatória e consequente produção de uma doadora de embriões sofre grande influência do estado ovariano, o qual é influenciado por diversos fatores, dentre eles a nutrição. Vale ressaltar que o tipo e/ou quantidade da dieta fornecida aos animais antes de iniciar os programas de superestimulação tem forte influência sobre a resposta superovulatória e qualidade embrionária (Yaakub et al., 1999b).

Há controvérsias na literatura quanto ao efeito dos níveis energéticos ou quantidade de MS ingerida na resposta a protocolos de superovulação. Alguns trabalhos detectaram efeitos positivos da alta ingestão alimentar na população folicular e número de ovulações (Gutierrez et al., 1997; Gong et al., 2002), outros não detectaram efeito (Bastos et al., 2007a) e outros detectaram um efeito contrário (Mantovani et al., 1993; Nolan et al., 1998; Yaakub et al., 1999b; Wrenzycki et al., 2000; Siddiqui et al., 2002; Lozano et al., 2003; Mollo et al., 2007). Esses estudos estão descritos mais detalhadamente a seguir.

Independente do efeito da quantidade da dieta ingerida sobre a resposta superovulatória parece ser consenso que o excesso nutricional tem um efeito deletério na qualidade dos embriões produzidos (Nolan et al., 1998; Yaakub et al., 1999b; Lozano et al., 2003), e que a redução da ingestão alimentar por um período de tempo limitado previamente à superovulação pode melhorar a qualidade destes embriões (Santos & Sá Filho, 2006). Essa redução de ingestão, entretanto, quando empregada após a IA pode ocasionar um efeito negativo sobre a taxa de sobrevivência embrionária (Dunne et al., 1999). Nesse estudo, foi observada queda de 30% na taxa de sobrevivência embrionária nos dias 14 a 16 de gestação de novilhas taurinas de corte, quando a dieta foi reduzida de 200 para 80% dos valores necessários à manutenção, imediatamente após a IA.

Gutierrez et al. (1997) concluíram que, a alta ingestão de (matéria seca) MS por duas semanas foi associada a um número maior de folículos pequenos recrutados durante a primeira onda do ciclo estral. Em seguida, Gong et al. (2002) desenvolveram um trabalho complementar para avaliar o efeito do aumento nutricional na resposta aos protocolos de superovulação em novilhas taurinas e comprovaram que a alta ingestão alimentar por um período de três semanas aumentou o número de pequenos folículos e de ovulações em relação ao grupo controle. Neste estudo, entretanto, não foram apresentados resultados de produção de embriões.

Dois estudos (Yaakub et al., 1999b; Wrenzycki et al., 2000) avaliaram o efeito do tipo e da quantidade de concentrado sobre a superovulação e a produção de embriões. Os tratamentos consistiam em dois concentrados, um à base de cevada e outro à base de polpa cítrica e de beterraba, com consumo *ad libitum* ou restrito. Os autores observaram que as novilhas que receberam

quantidade restrita de concentrado produziram um número maior de embriões e estes foram de qualidade superior em relação às novilhas com dieta *ad libitum*. Da mesma forma, Mantovani et al. (1993) reportaram que, o aumento na ingestão de concentrado de 3,0 kg para ingestão *ad libitum* em novilhas de corte taurinas reduziu a resposta superovulatória e a produção de embriões de qualidade superior. Ainda, nos estudos de Yaakub et al. (1999b) e Wrenzycki et al. (2000), novilhas alimentadas com polpa cítrica e de beterraba produziram mais embriões transferíveis após superovulação em relação às alimentadas com cevada. Bastos et al. (2007b) não encontraram diferença no número de folículos recrutados e ovulados entre vacas de corte mestiças com elevado ECC alimentadas com dieta de manutenção em relação às com alta ingestão alimentar, iniciada sete dias antes do início do protocolo de superovulação. Este estudo detectou, entretanto, um maior número de estruturas totais e embriões viáveis coletados nos animais do grupo de manutenção.

Trabalhando com novilhas de corte taurinas, Nolan et al. (1998) detectaram um número maior de folículos superestimulados, após aplicação de FSH, nos animais com baixa ingestão alimentar em relação aos de alta ingestão. Apesar disso, não observaram diferença entre os grupos no número de corpos lúteos e de embriões coletados ou transferíveis. Neste mesmo estudo, foi encontrado que após 24 horas de cultivo *in vitro* dos embriões coletados, uma maior proporção de embriões desenvolveu ao estágio de blastocisto. Além disso, o número de células presentes nestes blastocistos foi superior nas novilhas que estavam sob restrição alimentar. Similarmente, Mollo et al. (2007) observaram que novilhas da raça Nelore confinadas e submetidas à restrição alimentar (0,7 x M) apresentaram respostas superestimulatórias e superovulatórias maiores do que novilhas submetidas à alta ingestão alimentar (*ad libitum*). Além disso, o número de embriões coletados também foi superior no grupo de baixa ingestão.

Negrão et al. (1997) concluíram que a produção de embriões transferíveis aumenta à medida que o consumo energético diminui. Em ovelhas (McEvoy et al., 1995; Lozano et al., 2003) ou novilhas superovuladas (O'Callaghan & Boland, 1999; Yaakub et al., 1999b), o fornecimento de alta quantidade de alimento acarretou em redução do desenvolvimento embrionário. Da mesma forma, Wrenzycki et al. (2000) demonstraram que em

novilhas de corte superovuladas um aumento na ingestão de concentrado de 3,0 kg por dia para *ad libitum* reduz o número de ovulações e propicia poucos embriões de boa qualidade. O tipo da dieta fornecida antes da superovulação também afeta a resposta superovulatória e a qualidade embrionária.

Segundo Siddiqui et al. (2002), um nível nutricional que limite o ECC em 2,5 a 3,0 (escala de 1 a 5) em vacas zebus antes de um tratamento de superovulação, seria melhor do que um alto nível nutricional. Em concordância, Adamiak et al. (2005) acreditam que o efeito do nível nutricional sobre as qualidades ovocitária e embrionária é dependente do ECC inicial da fêmea bovina. Entretanto, Bastos et al. (2007a) não encontraram diferença na resposta superovulatória, produção e qualidade embrionária em novilhas da raça Nelore com alto ou baixo ECC submetidas ou não ao “flushing” nutricional por 14 dias, antes da superovulação.

2.5. Influência da ingestão alimentar no padrão de expressão de genes relacionados à qualidade de embriões bovinos

A morfologia é comumente utilizada como um critério de seleção embrionária. Notadamente, diferenças na viabilidade embrionária foram observadas quando embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* de mesma qualidade morfológica foram avaliados (Rubio Pomar et al., 2005). Existe uma clara diferença entre as taxas de concepção observadas entre embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*, mesmo quando são usados embriões de alta qualidade morfológica (Rubio Pomar et al., 2005).

Anormalidades detectadas no padrão de transcrição dos embriões bovinos produzidos *in vitro*, quando comparado aos produzidos *in vivo*, podem explicar a reduzida qualidade 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 comparados aos *in vivo* é devido a deficiência do “maquinário” associado com a transcrição e tradução. A expressão de genes em embriões é alterada em diferentes condições de cultura, que influenciam o potencial desenvolvimento

durante a pré-implantação e o desenvolvimento fetal (Corcoran et al., 2006; Sagirkaya et al., 2006).

Da mesma forma, diversos autores afirmam que o ambiente de cultura pós-fecundação pode ter um efeito drástico no padrão de expressão de RNAm de muitos genes importantes para o desenvolvimento embrionário (Lonergan et al., 2006) e podem explicar a diferença na qualidade de cada embrião (Rizos et al., 2002). Rizos et al. (2002) demonstraram que a cultura de zigotos bovinos produzidos *in vitro* no oviduto de ovelhas pode aumentar drasticamente a sua criotolerância a um nível similar àquela de embriões produzidos *in vivo*. Paralelamente Yasseen et al. (2001) observaram que os embriões bovinos respondem a alterações ambientais, muito precocemente no desenvolvimento, através da modificação na síntese de RNAm específicos.

Essas observações sugerem que paralelo à caracterização morfológica, métodos adicionais são necessários para um correto prognóstico do potencial de desenvolvimento e do resultado de prenhez. Dentre esses métodos existem as técnicas não-invasivas, como o teste de criotolerância, e testes metabólicos, assim como técnicas invasivas que envolvem a análise da expressão de proteínas e genes e a detecção de apoptose (Rubio Pomar et al., 2005). Estudos empregando o método da reação em cadeia polimerase transcriptase reversa (RT-PCR) têm revelado diferenças entre a relativa abundância de alguns genes transcritos, importantes para o desenvolvimento, entre embriões bovinos produzidos *in vitro* e *in vivo* (Rizos et al., 2002).

Segundo Rizos et al. (2002) alterações observadas na expressão de RNAm podem estar diretamente relacionadas com a qualidade dos blastocistos. 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 alterações no padrão de expressão gênica podem ser usadas como marcadores moleculares para diferenciar populações de embriões produzidos por doadoras submetidas a diferentes regimes nutricionais.

Determinados genes estão descritos na literatura como possíveis marcadores para qualidade embrionária, dentre eles pode-se destacar: Bax (pró-apoptótico), Bcl-2 (anti-apoptótico), genes do sistema IGF (estimulam o

desenvolvimento embrionário, fetal e placentário), Mn-SOD (age contra o estresse oxidativo), IFN- τ (reconhecimento materno da gestação) e GRB-10 (controle do crescimento embrionário, fetal e placentário).

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.

2.5.1. Genes Bax e Bcl-2

A apoptose, uma forma programada de morte celular, 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). Além do importante papel no desenvolvimento do animal e na homeostase celular, também age como um mecanismo de controle de qualidade, o qual remove células que estão danificadas, não funcionais, extraviadas ou supranumerárias (Paula-Lopes & Hansen, 2002).

Estudos têm mostrado que membros da família dos genes Bcl-2 desempenham papel importante na regulação da apoptose. Pelo menos 15 membros da família do gene Bcl-2 foram identificados em mamíferos e categorizados em 2 sub-grupos, o anti-apoptótico (Bcl-2, Bcl-w, Bcl-xL, A1, Mcl-1) e o pró-apoptótico (Bax, Bak, Bok, Bik, Blk, Hrk, BNIP3, Bin, Bad, Bid e Bcl-xs). Já foi demonstrado que a razão de Bcl-2 e Bax é o determinante crítico tanto da sobrevivência quanto da morte celular. Quando o Bax está *overexpressed* nas células a apoptose é acelerada. Os autores encontraram que a expressão da proteína do gene Bcl-2 foi significativamente maior do que a expressão da proteína do Bax em oócitos grau I e embriões de boa qualidade (de 2 a 8 células e blastocistos). Em contraste, a expressão de proteínas do Bax foi muito maior do que a expressão de proteínas do Bcl-2 em oócitos grau IV e embriões degenerados (Yang & Rajamahendran, 2002).

Yang & Rajamahendran (2002) observaram que a expressão de Bcl-2 foi maior em embriões e oócitos de boa qualidade, baixa em embriões fragmentados e dificilmente detectada em oócitos desnudos. Contrariamente, a expressão de Bax foi observada em todos os tipos de oócitos e embriões com maior expressão nos oócitos desnudos. Adicionalmente, Rizos et al. (2003) afirmam que a expressão do gene Bax pode representar um usual marcador para qualidade de blastocistos. Isso implica que a relação de Bcl-2 e Bax pode ser usada como indicador da tendência para apoptose ou sobrevivência dos embriões. Foi proposto que a propensão a apoptose é continuamente contra balanceada nas células por genes que estimulam a sobrevivência e proliferação celulares. Sob indução de estímulo apropriado a célula ativa ou pára a repressão de produtos gênicos responsáveis pelo controle do mecanismo suicida.

As condições de cultivo podem ter um efeito substancial no grau de apoptose nos embriões como tem sido demonstrado para várias espécies, como humanos, ratos, bovinos, eqüinos, ovinos e suínos (Rubio Pomar et al., 2005). Rizos et al. (2002) observaram que a expressão do gene Bax foi maior nos embriões produzidos *in vitro* (meio SOF) quando comparada com a expressão em outros meios de cultivo e com embriões produzidos *in vivo*. No entanto, Sagirkaya et al. (2006) relataram que o número médio de células, a porcentagem de células apoptóticas por blastocistos e a expressão gênica não diferiu entre os blastocistos produzidos *in vivo* e *in vitro*. Rubio Pomar et al. (2005) detectaram baixos níveis de apoptose em ambos os blastocistos produzidos *in vivo* e *in vitro* em todas as espécies. Em geral, todos os blastocistos examinados exibiram baixa incidência de apoptose provavelmente devido ao fato de que apenas blastocistos de alta qualidade morfológica foram usados neste experimento. Nos embriões equinos produzidos *in vivo* e *in vitro* poucas células apresentaram sinais de apoptose, embora diferenças tenham sido observadas em relação a ocorrência de danos na membrana, fragmentação nuclear e núcleo contendo fragmento de DNA. A porcentagem de núcleos exibindo fragmentação nuclear foi significativamente maior nos blastocistos bovinos e suínos produzidos *in vitro* comparados com àqueles *in vivo*.

Martins et al. (2006) trabalhando com vacas aneloradas tratadas com alto ou baixo nível de ingestão alimentar, encontraram maior expressão global dos genes avaliados (Bax, IFN- τ , GRB-10, GPX-4, Mn-SOD e Catalase), além de maior expressão do gene Bax nos embriões produzidos *in vitro*, provenientes das doadoras sob regime de baixa ingestão alimentar e sugeriram que dieta restrita em energia influenciou positivamente os fatores relacionados à qualidade ovocitária e consequentemente, o desenvolvimento embrionário em bovinos.

2.5.2. Genes do sistema IGF

Os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) melhoram a proliferação celular, a mitose e a atividade dos hormônios esteróides. Evidências indicam que desempenham um papel importante no desenvolvimento embrionário precoce. A partir de alguns estudos Yasseen et al. (2001) consideraram a possibilidade de os IGFs atuarem fator de sobrevivência embrionária. A expressão de transcritos da família dos IGFs foi detectada em uma grande variedade de espécies (Yasseen et al., 2001).

As concentrações de RNAm para IGF-II, IGF-IIR e IGF-IR parecem seguir um padrão similar a maioria dos genes expressados durante a maturação oocitária em que eles aumentaram, indicando que a maturação pode depender de um aumento de RNAm desse genes. Após a maturação, as concentrações desses IGFs diminuíram gradualmente até ocorrer a ativação do genoma embrionário, no estágio de 8 a 16 células. Após isso, as concentrações de RNAm para IGF-II, IGF-IIR e IGF-IR aumentaram até o estágio de blastocisto eclodido. Esse aumento pode indicar um importante papel dos fatores de crescimento da família IGF no alongamento do embrião. Os transcritos de IGF-I não foram detectados em nenhum estágio do desenvolvimento pre-implantação. No entanto, tem sido mostrado que o IGF-I previne a apoptose em embriões de coelhos em estágio de desenvolvimento inicial e age como fator de sobrevivência (Yasseen et al., 2001).

A síndrome do bezerro grande é observada em bovinos e ovinos, principalmente quando são gestações de embriões produzidos *in vitro* ou clonados e diferenças no padrão de expressão gênica do embrião parecem

estar envolvidas neste fenômeno. Fetos bovinos produzidos *in vitro*, com 63 dias de idade, apresentavam maior expressão de IGF-II, quando comparados aos produzidos *in vivo*. Metilação e níveis de expressão de IGF-IIR foi reduzida em 30-60% no plasma, fígado e músculo em fetos com supercrescimento, avaliados no terço médio da gestação, em relação ao grupo controle (citado por Lazzari et al., 2002).

2.5.3. Gene INF- τ

A proteína INF- τ , exclusivamente secretada pelas células do trofotoderma, é o agente primário responsável pelo reconhecimento materno da gestação em bovinos (Roberts et al., 1992). Exerce efeito anti-luteolítico por atenuar a pulsatilidade e a secreção de PGF2 α pelo endométrio uterino. Em bovinos o embrião começa a expressar INF- τ quando o blastocisto se forma, sugerindo que a produção de INF- τ está fortemente relacionada com a formação da blastocela.

Muitos estudos desenvolvidos tiveram como objetivo correlacionar a quantidade de INF- τ que é secretada pelo blastocisto com sua qualidade morfológica, mas os resultados ainda são inconclusivos. Já foi observado um maior nível de expressão de INF- τ em blastocistos produzidos *in vitro* na ausência de soro fetal bovino (SFB), o que seria consistente com a hipótese de que níveis desse transcrito são maiores em embriões de boa qualidade, sugerindo que o gene INF- τ seja utilizado como marcador molecular da qualidade embrionária (Rizos et al., 2003).

No entanto, Neira et al. (2007) já observaram que embriões de qualidade excelente ou boa tiveram maior produção de INF- τ comparados aos embriões de pior qualidade, mostrando que a produção do INF- τ pode ser um indicador de qualidade embrionária.

2.5.4. Gene GRB-10

A proteína intracelular GRB-10 (growth factor receptor-bound protein) é membro da família das proteínas adaptadoras que também inclui o GRB-7 e

GRB-14. Estudos com cultivo de células mostraram que o GRB-10 ativa receptores tirosina kinase, tais como, receptores de insulina, receptor tipo I de IGF, receptores de fator de crescimento epidermal (EGF) e fator de crescimento de hepatócito (c-Met). No entanto, se o GRB-10 age positivamente ou negativamente sinalizando as células ainda não está determinado (Charalambous et al., 2003). Estas proteínas adaptadoras podem se ligar a diversos receptores proteína kinase ou a proteínas intracelulares e mediar a ligação destas proteínas aos receptores e parecem ter função em diversos processos celulares, incluindo regulação do crescimento e metabolismo, apoptose e migração celular, além da regulação dos sinais dos receptores de insulina e IGF (Holt & Siddle, 2005).

GRB-10 parece ter maior afinidade com os receptores de insulina e receptores tipo I de IGF. No entanto, existe contradição entre os dados encontrados na literatura em relação ao efeito estimulatório ou inibitório do GRB-10 (Vecchione et al., 2003; Holt & Siddle, 2005). Através de estudos com super-expressão de GRB-10 encontraram inibição do crescimento celular estimulado por IGF, mas não por insulina (Holt & Siddle, 2005). Morrione et al. (1997) também observaram efeito inibitório do GRB-10 (mGrb10 α) na proliferação celular mediada pelo IGF-I. Já Vecchione et al. (2003) mostraram e citaram trabalhos com efeito inibitório sobre a proliferação celular estimulada tanto por IGF quanto por insulina. Por outro lado, apenas O'Neill et al. (1996) encontraram efeito estimulatório na sinalização de IGF e insulina, trabalhando com variações do GRB-10 humano. Dessa forma, pode-se observar que ainda não está estabelecido se existe uma interação diferencial com os receptores de insulina e IGF, o que resultaria em uma regulação seletiva (Holt & Siddle, 2005).

Além da inibição da atividade kinase do IR por ligação direta ao IR (receptor de insulina), o GRB-10 também regula negativamente a sinalização da insulina por estimular a degradação do seu receptor. Uma vez que, a supressão endógena do GRB-10 levou ao aumento da proteína IR, e a super-expressão reduziu estes níveis, não alterando quantidades de RNAm de IR, mostrando que a modulação via GRB-10 é pós traducional e não transcricional (Ramos et al., 2006).

Vecchione et al., 2003 mostrou que o GRB-10 atua como adaptador ligando a proteína Nedd4 ao receptor de IGF, mediando, portanto a ubiquitinação deste receptor, sendo outra forma de inibir a sinalização do receptor de IGF que estimularia o crescimento.

Muitos genes “imprinted” têm papel significativo no crescimento fetal e placentário e na diferenciação. Alteração e desregulação dos genes “imprinted” levam ao supercrescimento do feto e da placenta durante a gestação, especialmente em produtos da clonagem por apresentarem um padrão de expressão gênica diferente dos embriões produzidos *in vitro* ou *in vivo* (Ruddock et al., 2003).

O GRB-10 é um gene paternalmente “imprinted” (repressão seletiva da expressão do mRNA de um dos genitores) (Ruddock et al., 2004), portanto é expresso maternalmente e foi sugerido que em humanos é um gene candidato para a síndrome “Silver-Russell”, caracterizada por crescimento retardado, pré e pós-natal (Vecchione et al., 2003). GRB-10 está expresso na maioria dos tecidos e em todos os estágios embrionários (2, 4, 8 e 16-32 células, mórula, blastocisto (D7) e blastocisto expandido (D9), além de ovócitos maduros em bovinos (Ruddock et al., 2004).

Charalambous et al. (2003) mostraram que o GRB-10 limitou o crescimento placentário e embrionário, devido a interação direta com o receptor tipo I de IGF e impediu a sinalização do IGF-II, que é o maior fator de crescimento do embrião e da placenta e a perda da função do GRB-10 resultou em super-crescimento destes.

2.6. Influência da ingestão alimentar na congelabilidade de embriões bovinos produzidos *in vivo*

A criopreservação é um procedimento lento que expõe o embrião a várias fases de congelação pela ação de fatores físicos, químicos e biológicos. Esses fatores podem causar lesão na zona pelúcida, membrana ou citoesqueleto celular e distúrbios metabólicos. Tais defeitos celulares levam à perda do controle celular e eventualmente, à morte por apoptose ou necrose (Citato por Lapatarova et al., 2006).

Os bovinos e suínos possuem normalmente embriões com maiores quantidades de gotas de lipídios, ao contrário de humanos e roedores. Essas gotas de gordura, presentes nos ovócitos, fornecem energia durante a fecundação e para o desenvolvimento embrionário inicial. Além disso, são importantes na maturação ovocitária, fecundação e desenvolvimento embrionário e possuem influência na sensibilidade à congelação de embriões, devido a mudanças causadas na membrana lipídica (Kikuchi et al., 2002), sendo esta uma possível explicação para a maior sensibilidade dos embriões bovinos à criopreservação.

Apesar disso, a criopreservação de embriões é largamente usada na transferência comercial de embriões provenientes de vacas taurinas, pois nesta classe animal as taxas de sobrevivência dos embriões criopreservados/descongelados são próximas dos embriões transferidos a fresco (Hasler, 2001). Entretanto, a criopreservação convencional de embriões zebuínos é problemática, não apresentando resultados similares àquela com embriões taurinos. De fato, diversos estudos relataram diferenças marcantes na resposta à criopreservação de embriões coletados de doadoras taurinas versus zebuínas, sendo que os de zebuínas são menos resistentes ao processo de criopreservação (Zanenga, 1993). Dentre as diferenças observadas entre embriões de vacas holandesas e Nelore, destaca-se a maior quantidade de lipídeos intracelulares nos embriões taurinos (Visintin et al., 2002), que pode estar relacionada com a melhor congelabilidade dos embriões observada nesta subespécie. Por outro lado, foi demonstrado que embriões de vacas mestiças produzidos *in vitro* que têm menor resistência à criopreservação, possuem um maior volume ocupado por gotas de lipídeo quando comparados a embriões produzidos *in vivo* por superovulação em vacas holandesas (28,4% versus 6,7%) (Pegoraro et al., 2004). Portanto, há controvérsias em relação à ultra-estrutura embrionária e congelabilidade de embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*, além do possível efeito da nutrição e estado metabólico da doadora na qualidade morfológica e criotolerância dos embriões produzidos.

Embriões acima de quatro células possuem concentrações maiores de ácidos graxos insaturados, como ácidos linoléico e oléico, em relação ao saturado. A concentração de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa

(ácido aracdônico e ácido decosahexaenóico) tendeu ser mais elevada em embriões de desenvolvimento avançado e de alta qualidade (Haggarty et al., 2006). Entretanto, o quanto a composição lipídica e a criotolerância dos embriões se deve à raça das doadoras e o quanto se deve à alimentação e estado nutricional do animal no momento da SOV ainda não está definido.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AMSTALDEN, M.; GARCIA, M.R.; WILLIAMS, S.W.; STANKO, R.L.; NIZIELSKI, S.E.; MORRISON, C.D.; KEISLER, D.H.; WILLIAMS, G.L. Leptin gene expression, circulating leptin, and luteinizing hormone pulsatility are acutely responsive to short-term fasting in prepubertal heifers: relationships to circulating insulin and insulin-like growth factor I. *Biol. Reprod.*, v.63, p.127-133, 2000.

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

ARMSTRONG, D.G.; MCEVOY, T.G.; BAXTER, G.; ROBINSON, J.J.; HOGG, C.O.; WOAD, K.J.; WEBB, R. Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production in vitro: associations with the ovarian insulin-like growth factor system. *Biol. Reprod.*, v.64, p.1624-32, 2001.

BAO, B.; GARVERICK, H.A. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: A review. *J. Anim. Sci.*, v.76, p.1903-1921, 1998.

BARASH, I.A.; CHEUNG, C.C.; WEIGLE, D.S.; REN, H.; KABIGTING, E.B.; KUIJPER, J.L.; CLIFTON, D.K.; STEINER, R.A. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology*, v.137, p.3144-3147, 1996.

BARROS, C.M.; NOGUEIRA, M.F.G. SOV em zebuínos de corte. In: 10. Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada. Londrina, p. 212-222, 2004.

BARUSELLI, O.S.; MARQUES, M.O.; REIS, E.L.; NASSER, L.F.T.; SILVA, R.C.P.; MENEGATTI, J.A.; VALENTIN, R.; SANTOS, I.C.C. Adequação da dose de FSH (Folltropin-v) em protocolos de superovulação de vacas nelore (*Bos taurus indicus*) com inseminação artificial em tempo fixo (SOTF). In: XVII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 2003, Fortaleza. *Acta Sci. Vet.*, 2003. p. 244-245.

BASTOS, M.R.; MARTINS, A.C.; MELO, L.F.; CARRIJO, L.H.D.; RUMPF, R.; SARTORI, R. Efeito da condição corporal e da ingestão alimentar sobre a resposta superovulatória e produção embrionária em novilhas nelore. *Acta Sci. Vet.*, v.35(supl), p.1243, Resumo, 2007.

BASTOS, M.R.; RAMOS, A.F.; DRIESSEN, K.; MARTINS, A.C.; RUMPF, R.; SARTORI, R. Efeito do “flushing” nutricional sobre a resposta superovulatória em vacas mestiças. *Acta Sci. Vet.*, v.35(supl), p.1242, Resumo, 2007.

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

BOELHAUVE, M.; SINOWATZ, F.; WOLF, E.; PAULA-LOPES, F.F. Maturation of bovine oocytes in the presence of leptin improves development and reduces apoptosis of in vitro-produced blastocysts. *Biol. Reprod.*, v.73, p.737-744, 2005.

BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Effects of nutrition on fertility in dairy cows. *Advances in dairy technology*, v.15, p. 19-33, 2003.

BOLAND, M.P.; LONERGAN, P.; O'CALLAGHAN, D. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology and oocyte and embryo development. *Theriogenology*, v.55, p.1323-1340, 2001.

BOSSIS, I.; WETTEMANN, R.P.; WELTY, S.D.; VIZCARRA, J.; SPICER, L.J. Nutritionally induced anovulation in beef heifers: ovarian and endocrine function

during realimentation and resumption of ovulation. *Biol. Reprod.*, v.62, p.1436-1444, 1999.

BURATINI Jr, J. Foliculogênese em bovinos. *Biotechnology da Reprodução em Bovinos (2º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada)*. Londrina, 2006.

BURATINI Jr, J.; PRICE, C.A.; VISINTIN, J.A.; BO, 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.421-431, 2000.

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

BUTLER, W.R.; MARR, A.L.; PELTON, S.H.; RADCLIFF, R.P.; LUCY, M.C. Insulin restores GH responsiveness during lactation-induced negative energy balance in dairy cattle: effects on expression of IGF-I and GH receptor 1A. *J. Endocrinol.*, v.176, p.205-217, 2003.

BUTLER, S.T.; PELTON, S.H.; BUTLER, W.R. Insulin increases 17 β -estradiol production by the dominant follicle of the first postpartum follicle wave in dairy cows. *Reproduction*, v.127, p.537-545, 2004.

CAMPBELL, B.K.; SCARAMUZZI, R.J.; WEBB, R. Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. *J. Reprod. Fertil.*, v.49, p.335-350, 1995.

CHANDRASHEKAR, V.; ZACZEK, D.; BARTKE, A. The consequences of altered somatotropic system on reproduction. *Biol. Reprod.*, v.71, p.17-27, 2004.

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. *Develop. Biol.*, v.100, p.8292-8297, 2003.

CHASE Jr, C.C.; KIRBY, C.J.; HAMMOND, A.C.; OLSON, T.A.; 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.; DELAVAL, C.; BONNET, M. Leptin expression in ruminants: Nutritional and physiological regulations in relation with energy metabolism. *Dom. Anim. Endocrinol.*, v.29, p.3-22, 2005.

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.

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.345-70, 2003.

DUNNE, L.D.; DISKIN, M.G.; BOLAND, M.P.; O'FARRELL, K.J.; SREENAN, J.M. The effect of pre- and post-insemination plane of nutrition on embryo survival in beef heifers. *Anim. Sci.*, v.69, p.411-17, 1999.

ECHTERNKAMP, S.E.; HOWARD, H.J.; ROBERTS, A.J.; GRIZZLE, W.T. Relationships among concentrations of steroids, insulin-like growth factor –I and insulin-like growth factor binding protein in ovarian follicular fluid of beef cattle. *Biol. Reprod.*, v.51, p.971-981, 1994.

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.; EVANS, A.C.O.; TURZILLO, A.M. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biol. Reprod.*, v.65, p.648-654, 2001.

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.783-94, 2006.

GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; BERGFELT, D.R.; DONADEU, F.X.; KOT, K. Follicle selection in monovular species. *Biol. Reprod.*, v.65, p.638-647, 2001.

GONG, J.G.; ARMSTRONG, D.G.; BAXTER, G.; HOGG, C.O.; GARNSWORTHY, 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. Influence of metabolic hormones and nutrition on ovarian follicle development in cattle: practical implications. *Dom. Anim. Endocrinol.*, v.23, p.229-41, 2002.

GONG, J.G.; CAMPBELL, B.K.; BRAMLEY, T.A.; GUTIERREZ, C.G.; PETERS, A.R.; WEBB, R. Suppression in the secretion of follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Biol. Reprod.*, v.55, p.68-74, 1996.

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.941-949, 1991.

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

HAFEZ, E.S.S.E.; HAFEZ, B. Foliculogênese, maturação ovocitária e ovulação. In: Reprodução Animal. Barueri-SP: Manole, 7.ed., p.69, 2004.

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

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

HOUSEKNECHT, K.L.; PORTOCARRERO, C.P. Leptin and its receptors: regulators of whole-body energy homeostasis. *Dom. Anim. Endocrinol.*, v.15, p.457-475, 1998.

KIKUCHI, K.; EKWALL, H.; TIENTHAI, P.; KAWAI, Y.; NOGUCHI, J.; KANEKO, H.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Morphological features of lipid droplet transition during porcine oocyte fertilisation and early embryonic development to blastocyst in vivo and in vitro. *Zygote*, v.10, p.355–366, 2002.

LANDAU, S.; BRAW-TAL, R.; KAIN, M.; BOR, A.; BRUCKENTAL, I. Preovulatory follicular status and diet affect the insulin and glucose content of follicles in high-yielding dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.*, v.64, p.181-197, 2000.

LAPATAROVA, M.; CECH, S.; HOLY, L.; DOLEZEL, R. The effect of vitrification in pulled straws on pregnancy rates after transfer of *in vivo* produced bovine embryos. *Vet. Med.*, v.51, n.9, p.454-460, 2006.

LAZZARI, G.; WRENZYCKI, C.; HERMANN, D.; DUCHI, R.; KUIP, T.; NIEMANN, H.; GALLI, C. Cellular and molecular deviations in bovine in vitro-

produced embryos are related to the large offspring syndrome. *Biol. Reprod.*, v.67, p.767-775, 2002.

LÉON, H.V.; HERNANDÉZ-CÉRON, J.; KEISLER, D.H.; GUTIERREZ, C.G. Plasma concentrations of leptina, insulin-like growth factor and insulin in relation to changes in body condition score in heifers. *J. Dairy Sci.*, v.82, p.445-451, 2004.

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.

LOZANO, J.M.; LONERGAN, P.; BOLAND, M.P.; O'CALLAGHAN, D. Influence of nutrition on the effectiveness of superovulation programmes in ewes: effect on oocyte quality and post-fertilization development. *Reproduction*, v.125, p.543-53, 2003.

LUCY, M.C.; COLLIER, R.J.; KITCHELL, M.L.; DIBNER, J.J.; HAUSER, S.D.; KRIVI, G.G. Immunohistochemical and nucleic acid analysis of somatotropin receptor populations in the bovine ovary. *Biol. Reprod.* V.48, p.1219-1227, 1993.

MANTOVANI, R.; ENRIGHT, W.J.; KEANE, M.G.; ROCHE, J.F.; BOLAND, M.P. Effect of nutrition on follicle stimulating hormone (FSH) on superovulatory response in beef heifers. Proc 9th AETE, p.234, Abstract, 1993.

MAPLETOFT, R.J.; STEWARD, K.B.; ADAMS, G.P. Recent advances in the superovulation in cattle. *Reprod. Nutr. Dev.*, v.42(6), p.601-611, 2002.

MARTINS, A.C.; MOLLO, M.R.; BASTOS, M.R.; GUARDIEIRO, M.M.; SARTORI, R. Concentrações séricas de hormônios reprodutivos e metabólicos em vacas azebuadas submetidas à baixa ou alta ingestão alimentar. *Acta Sci. Vet.* v.35(supl), p.1026, Resumo, 2007.

MARTINS, A.C.; RAMOS, A.F.; MOLLO, M.R.; PIVATO, I.; CAMARA, J.U.; CARRIJO, L.H.D.; DRIESSEN, K.; RUMPF, R.; SARTORI, R. Influência da alta ou baixa ingestão alimentar na produção in vitro de embriões bovinos. *Acta Sci. Vet.*, v.34(supl), p.290, Resumo, 2006.

MARTINS, C.M.; MARQUES, M.O.; SILVA, R.C.P.; BARUSELLI, P.S. Adequação do protocolo de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo em *Bos taurus*. Tese de mestrado, 2005.

MCEVOY, T.G.; ROBINSON, J.J.; AITKEN, R.P.; FINDLAY, P.A.; PALMER, R.M.; ROBERTSON, I. Dietary-induced suppression of pre-ovulatory progesterone concentrations in superovulated ewes impairs the subsequent in vivo and in vitro development of their ova. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 39, p.89-107, 1995.

MOLLO, M.R.; RUMPF, R.; MARTINS, A.C.; CARRIJO, L.H.D.; SAUERESSIG, M.G.; SARTORI, R. Produção de embriões em novilhas nelore superovuladas submetidas à baixa ou alta ingestão alimentar. *Acta Sci. Vet.*, v.35(supl), p.1241, Resumo, 2007.

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.6382–26387, 1997.

MORRISON, D.G.; SPITZER, J.C.; PERKINS, J.L. Influence of prepartum body condition score change on reproduction in multiparous beefs cows calving in moderate body condition. *J. Anim. Sci.*, v.77, p.1048-1054, 1999.

NEGRÃO, S.; NIBART, M.; HUMBLLOT, P. Negative effects of overfeeding on superovulatory response and embryo production in dairy heifers. Proc 13th Scient Meet AETE, Lyon, Abstract, 1997.

NEIRA, J.A.; TAINURIER, 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.

NOGUEIRA, M.F.G.; BARROS, B.J.P.; TEIXEIRA, A.B.; TRINCA, L.A.; D'OCCHIO, M.J.; BARROS, C.M. Embryo recovery and pregnancy rates after the delay of ovulation and fixed time insemination in superstimulated beef cows. *Theriogenology*, v.57, p.1625-34, 2002.

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.1263-74, 1998.

O'CALLAGHAN, D.; BOLAND, M.P. Nutritional effects on ovulation, embryo development and the establishment of pregnancy in ruminants. *Anim. Sci.*, v.68, p.299-314, 1999.

O'NEILL, T.J.; ROSE, D.W.; PILLAY, T.S.; HOTTA, K.; OLEFSKY, J.M.; GUSTAFSON, T.A. Interaction of a GRB-IR splice variant (a human GRB-10 homolog) with the insulin and insulin-like growth factor I receptor. *J. Biol. Chem.*, v.271, p.22506-22513, 1996.

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

PEGORARO, L.M.C.; BARROS, S.; SINOWATZ, F.; PALMA, G.A.; SAALFELD, M.H.; COSCIONI, A.C.; CASTRO, L.A.S.; ROCHA, N.E.M.; ABRANTES, V.; ANGHINONI, L. Lipidic content in Jersey blastocysts compared with Hostein and IVP embryos. In: IETS 2004 Annual Conference and Symposia, Portland. *Reprod. Fertil. Devel.*, v.268-268, 2004.

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.

RHODES, F.M.; FITZPATRICK, L.A.; ENTWISTLE, K.W.; DE'ATH, G. Sequential changes in ovarian follicular dynamics in bos indicus heifers before and after nutritional anoestrous. *J. Reprod. Fertil.* v.104, p.41-9, 1995.

RIVERA, G.M.; CHANDRASEKHER, Y.A.; EVANS, A.C.O.; GIUDICE, L.C.; FORTUNE, J.E. A potencial role for insuluin-like growth factor binding protein-4 proteolysis in the establishment of ovarian follicular dominance in cattle. *Biol. Reprod.*, v.65, p.102-111, 2001.

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.

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

ROBINSON, J.J.; ASHWORTH, C.J.; ROOKE, J.A.; MITCHELL, L.M.; MCEVOY, T.G. Nutrition and fertility in ruminant livestock. *Anim. Feed Sci. Technol.* v.126, p.259-276, 2006.

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.

SAGIRKAYA, H.; MISIRLIOGLU, M.; KAYA, A.; FIRST, N.L.; PARRISH, J.J.; MEMILI, E. Developmental and molecular correlates of bovine preimplantation embryos. *Reproduction*, v.131, p.895-904, 2006.

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.; CERRI, R.L.A.; BALLOU, M.A.; HIGGINBOTHAM, G.E.; KIRK, J.H. Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of holstein dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.*, v.80, p.31-45, 2004.

SANTOS, J.E.P.; SÁ FILHO, M.F. Nutrição e reprodução em bovinos. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, Londrina, v.2, p.30-54, 2006.

SARTORI, R.; SOUZA, A.H.; GUENTHER, J.N.; CARAVIELLO, D. GEIGER, L.N.; SCHENK, J.; WILTBANK, M.C. Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially inseminated with X-sorted or unsorted sperm. *Anim. Reprod.* v.1, n.1, p.86 – 90, 2004.

SARTORI, R.; SUAREZ-FERNANDEZ, C.A.; MONSON, R.L.; GUENTHER, J.N.; ROSA, G.J.M.; WILTBANK, M.C. Improvement in recovery of embryos/ova using a shallow uterine horn flushing technique in superovulated Holstein heifers. *Theriogenology*, v.60, n.7, p.1319 – 1330, 2003.

SIDDIQUI, M.A.R.; SHAMSUDDIN, M.; BHUIYAN, M.M.U.; AKBAR, M.A.; KAMARUDDIN, K.M. Effect of feeding and body condition score on multiple

ovulation and embryo production in zebu cows. *Reprod. Dom. Anim.*, v.37, p.37-41, 2002.

SILVA, J.M.; PRICE, C.A. Insulin and IGF-I are necessary for FSH-induced cytochrome P450 aromatase but not cytochrome P450 side-chain cleavage gene expression in oestrogenic bovine granulosa cells in vitro. *J. Endocrinol.*, v.174, p.499-507, 2002.

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.

VISINTIN, J.A.; MARTINS, J.F.P.; BEVILACQUA, E.M.; MELLO, M.R.B.; NICÁCIO, A.C.; ASSUMPÇÃO, M.E.O.A. Cryopreservation of *Bos taurus* vs. *Bos indicus* embryos: Are they really different? *Theriogenology*, v.57, p.345-359, 2002.

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

WETTEMANN, R.P.; BOSSIS, I. Energy intake regulates ovarian function in beef cattle. In: Proceedings of the American Society of Animal Science, p.1-10, 1999.

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.18, p.69-78, 2000.

YAAKUB, H.; O'CALLAGHAN, D.; O'DOHERTY, J.V.; HYTTEL, P. Effect of dietary intake on follicle numbers and oocyte morphology in unsuperovulated and superovulated ewes. *Theriogenology*, v.47, p.182, Resumo, 1997.

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, 1999a.

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

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.

YASEEN, M.A.; WRENZYCKI, C.; HERMANN, D.; CARNAWATH, J.W.; NIEMANN, H. Changes in the relative abundance of mRNA transcripts for insulin-like growth factor (IGF-I and IGF-II) ligands and their receptors (IGF-IR/IGF-IIR) in preimplantation bovine embryos derived from different in vitro systems. *Reproduction*, v.122, p.601-610, 2001.

YUAN, W.; BAO, B.; GARVERICK, H.A.; YOUNGQUIST, R.S.; LUCY, M.C. Follicular dominance in cattle is associated with divergent patterns of ovarian gene expression for insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-II and IGF binding protein-2 in dominant and subordinate follicles. *Dom. Anim. Endocrinol.*, v.15, p.55-63, 1998.

ZANENGA, C.A. Freezing on zebu embryos – Development and viability. In: X Congresso Brasileiro de Reprodução Animal. Belo Horizonte, MG, Brasil, 1993.

CAPÍTULO II

INFLUÊNCIA DA ALTA INGESTÃO DE MATÉRIA SECA NA RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA EM VACAS MISTIÇAS

“Trabalho enviado à revista Ciência Animal Brasileira”

INFLUÊNCIA DA ALTA INGESTÃO DE MATÉRIA SECA NA RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA EM VACAS MISTIÇAS

**Michele Ricieri Bastos^{1,2}, Alexandre Floriani Ramos¹, Katlen Driessen^{1,3},
Aline Carvalho Martins^{1,2}, Rodolfo Rumpf^{1,3}, Roberto Sartori^{1,2,3}**

¹Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 70770-900, Brasília-DF, Brasil.

²FMVZ-UNESP, 186018-000, Botucatu-SP, Brasil. ³FAV-UnB, 70910-970,
Brasília-DF, Brasil.

sartori@cenargen.embrapa.br

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito da alta ingestão de matéria seca (AIMS) sobre a resposta superovulatória de vacas Nelore x Simental. Quatorze vacas não lactantes, com escore de condição corporal (ECC) igual a 4,0 (escala de 1 a 5) foram divididas aleatoriamente em dois grupos (Manutenção=M ou alta ingestão de matéria seca=AIMS). Entre 7 dias antes do início da superovulação (SOV) até o final das aplicações de FSH, as vacas do grupo AIMS receberam dieta com 180% da manutenção. O grupo M recebeu dieta de manutenção. Sete dias após a IA, os embriões foram colhidos e avaliados. Quarenta dias após, os tratamentos foram invertidos e uma nova SOV foi realizada. Para comparação entre os grupos, utilizou-se o teste t pareado. Os resultados estão apresentados em média $\pm$ erro padrão. O número de folículos recrutados detectados por ultra-sonografia ($19,6 \pm 1,8$ e $16,4 \pm 2,0$) e ovulados ($15,0 \pm 1,6$ e $13,0 \pm 1,6$) não diferiu entre os grupos M e AIMS, respectivamente ($P > 0,10$). Entretanto, os números de estruturas totais ($14,1 \pm 2,3$ e $9,5 \pm 1,5$) e embriões viáveis ($10,1 \pm 2,1$ e $6,7 \pm 1,5$) coletados foram maiores no grupo M ($P < 0,05$). Conclui-se que, nas condições desse estudo, AIMS previamente à SOV pode comprometer a produção embrionária em vacas de elevado ECC.

PALAVRAS-CHAVE: Bovinos, nutrição, superovulação, embrião.

ABSTRACT

Influence of high dry matter intake on the superovulatory response of crossbred cows

This study investigated the effect of high dry matter intake (Flushing) on the superovulatory response of crossbred Nelore x Simmental cows. Fourteen non-lactating cows, with a mean body condition score (BCS) of 4.0 (scale from 1 to 5) were randomly assigned into two groups (Maintenance=M or Flushing=F). Seven days prior to onset of superovulation (SOV) until the last day of treatment with FSH, group F cows were fed a diet to achieve 180% of maintenance. Group M cows were fed a maintenance diet. Seven days after AI, embryos were collected and evaluated. Forty days later, the treatment groups were inverted and another SOV was realized. Variables were compared by paired t test and data are presented as mean $\pm$ SEM. The number of recruited (19.6 ± 1.8 and 16.4 ± 2.0) and ovulated (15.0 ± 1.6 and 13.0 ± 1.6) follicles detected by ultrasonography did not differ between the M and F groups, respectively ($P > 0.10$). However, the total number of embryos/ova (14.1 ± 2.3 and 9.5 ± 1.5) and the number of viable embryos (10.1 ± 2.1 and 6.7 ± 1.5) recovered were greater in group M ($P < 0.05$). Under the conditions of this study, we conclude that nutritional flushing previously to SOV may compromise embryo production in cows with high BCS.

KEYWORDS: Bovine, nutrition, superovulation, embryo.

1. INTRODUÇÃO

Um dos maiores entraves dos programas comerciais de transferência de embriões (TE) é a grande variação individual ao tratamento superestimulatório (Mapletoft et al., 2002; Nogueira et al., 2002; Barros & Nogueira, 2004), observada tanto em vacas e novilhas *Bos indicus* (Baruselli et al., 2003) quanto em *Bos taurus* (Sartori et al., 2003, 2004). A variabilidade na resposta ovariana está relacionada aos diferentes protocolos de superovulação (SOV), mas também ao estado nutricional do animal (Yaakub et al., 1999). Em geral, fêmeas de elevado mérito genético, que são utilizadas como doadoras de embriões, não estão sob um manejo nutricional adequado, o que compromete os resultados de TE.

Além das alterações nutricionais, o escore de condição corporal (ECC) e o nível energético da dieta, também estão entre os fatores que mais afetam o desempenho reprodutivo da fêmea bovina (Webb et al., 2004). Estes podem influenciar de forma sinérgica ou antagônica, diversos fatores que regulam o desenvolvimento folicular ovariano e a esteroidogênese, refletindo quali e quantitativamente na produção de embriões (Rhodes et al., 1995; Adamiak et al., 2005).

Dessa forma, pode-se afirmar que a resposta superovulatória pode ser influenciada por fatores intrínsecos (relacionados ao animal) e extrínsecos (ambiente), dentre eles a nutrição (Webb et al., 2004). Trabalhos que foram desenvolvidos com o objetivo de aumentar o número de folículos recrutados mostraram que a população folicular presente na fase de recrutamento é pré-requisito para melhorar a resposta aos protocolos de SOV e, conseqüentemente, melhorar a eficiência reprodutiva dos animais domésticos (Fortune, 2003). Até o presente momento, o “flushing” nutricional (curto período de superalimentação) (Gutierrez et al., 1997; Armstrong et al., 2002; Gong et al., 2002) e o uso do rbST (somatotropina bovina recombinante; Gong et al., 1991; Buratini et al., 2000) mostraram ser os principais fatores capazes de influenciar positivamente o número de folículos recrutados e/ou a resposta aos protocolos de SOV.

Embora o aumento da ingestão energética por períodos curtos ou prolongados possa alterar o perfil dos hormônios metabólicos, principalmente

IGF-I e insulina, e afetar o desenvolvimento folicular (Armstrong et al., 2001), o período mínimo necessário para que este aporte energético tenha efeito sobre o número de folículos recrutados ainda precisa ser determinado.

2. OBJETIVO

Avaliar a influência da alta ingestão de matéria seca (AIMS) a partir de sete dias antes do início e durante a superestimulação ovariana com FSH, sobre a resposta superestimulatória, superovulatória e produção embrionária, em vacas mestiças F1 Nelore x Simental.

3. HIPÓTESE

Vacas alimentadas com dieta balanceada e recebendo acima de 180% da dieta de manutenção por sete dias antes do início da SOV apresentam uma melhor resposta superovulatória.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizadas 14 vacas não lactantes, mestiças F1 Nelore x Simental, com idade entre 5 e 6 anos, peso médio de 500,0 kg e ECC 4,0 (escala de 1 a 5; Houghton et al., 1990). Todas as vacas passaram por exame ginecológico antes do início do experimento e encontravam-se sem alterações reprodutivas detectáveis.

4.2. Dietas experimentais

As vacas foram divididas aleatoriamente em dois grupos experimentais (Manutenção e AIMS) e mantidas em sistema de pastejo com *Brachiaria decumbens*, mineralização adequada e água à vontade. Três semanas antes do início da SOV, as vacas passaram a receber uma dieta de adaptação a fim de evitar complicações ruminais durante o experimento devido ao aporte nutricional. Durante essa adaptação, os animais permaneceram em um piquete com pouca oferta de gramíneas e com suplementação à base de silagem de milho e fonte protéica à base de NNP, em níveis próximos aos de manutenção. Sete dias antes do início da SOV as vacas foram transferidas para piquetes sem gramíneas e passaram a ser alimentadas exclusivamente com dieta balanceada, sal mineral e água à vontade. A dieta do grupo Manutenção foi ajustada para 100% das necessidades diárias de manutenção, totalizando uma ingestão de 2,03% do peso vivo (PV) por dia. O grupo AIMS recebeu uma dieta ajustada para 180% em relação à manutenção (ingestão total de 3,65% do PV/dia). O encerramento da AIMS coincidiu com a última aplicação de FSH, totalizando 11 dias de duração.

Após esse período as vacas do grupo AIMS retornaram à dieta de manutenção até o momento da coleta dos embriões e após as coletas, todas as vacas retornaram ao sistema de pastejo em *Brachiaria decumbens*, com suplementação mineral adequada e água à vontade. Quarenta dias após, foi realizada uma outra rodada do experimento, e os tratamentos foram invertidos, ou seja, o grupo Manutenção passou a ser o grupo AIMS e vice-versa.

As porcentagens dos componentes da dieta, de matéria seca (MS), dos nutrientes digestíveis totais (NDT) e de proteína bruta (PB) oferecidas estão ilustradas na Tabela 1.

Tabela 1. Porcentagem dos componentes, de MS, de NDT e de PB das dietas experimentais.

Componentes	% na dieta	% de MS	% de NDT	% de PB
Feno de coast-cross	36,7	85,0	50,0	10,0
Silagem de milho	18,0	25,0	62,8	7,5
Milho moído	24,4	90,0	80,0	9,0
Farelo de trigo	12,4	90,0	70,0	14,0
Concentrado*	8,5	90,0	65,0	22,0
Média total	-	37,9	62,4	11,5

*Boião PPU – Integral Nutrição Animal, Goiânia-GO, Brasil.

4.3. Protocolo de superestimulação ovariana

Três dias após início do fornecimento das dietas experimentais (Manutenção ou AIMS), todas as vacas foram sincronizadas com dispositivo intra-vaginal de progesterona (P4; DIB, Sintex S.A., Argentina) e 2,0 mg de benzoato de estradiol (BE; Ric-BE, Syntex S.A., Argentina) e foram superovuladas com FSH seguindo o protocolo de TE em tempo fixo descrito na Figura 1. Cada vaca recebeu oito injeções de FSH im a cada 12 horas em doses decrescentes, utilizando uma dose total de 250 UI de FSH (Pluset, Calier, S.A., Barcelona, Espanha) e 0,150 mg de prostaglandina F2 α (PG F2 α ; D-Cloprostenol; Prolise; ARSA S. R. L., Buenos Aires, Argentina) simultânea à sexta e sétima aplicação de FSH. Doze horas após a última aplicação de FSH, a ovulação foi induzida com 0,05 mg de GnRH (Acetato de Gonadorelina; Gestran Plus; ARSA S. R. L., Buenos Aires, Argentina). Doze e 24 horas após a indução da ovulação as vacas foram inseminadas artificialmente com sêmen congelado de uma mesma partida de um mesmo touro e os embriões foram coletados sete dias após a injeção para indução da ovulação. Após a colheita,

as vacas receberam 0,150 mg de PGF2 α (D-Cloprostenol; Prolise) e retornaram ao pasto.

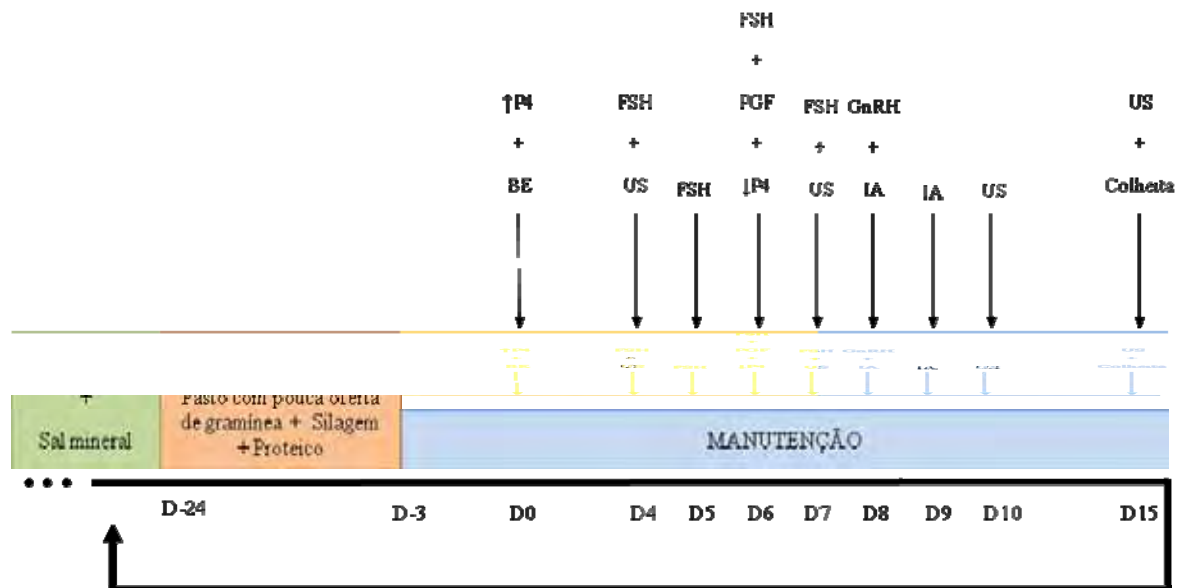


Figura 1. Esquema representativo do delineamento experimental, mostrando o período das dietas experimentais, o protocolo de superestimulação ovariana e os exames ultra-sonográficos. Legenda: D-24 a D15 = dias em relação ao início do protocolo de superestimulação (D0); P4 = implante de progesterona, BE = benzoato de estradiol, FSH = hormônio folículo estimulante; PGF = prostaglandina F2 α , GnRH = hormônio liberador de gonadotrofina; IA = inseminação artificial; US = exame ultra-sonográfico. AIMS = alta ingestão de matéria seca (180% em relação à dieta de manutenção).

4.4. Exames ultra-sonográficos

Exames ultra-sonográficos ovarianos foram realizados no ato da primeira e da última aplicação de FSH, e 2 e 7 dias após a indução da ovulação (Figura 1). Na avaliação realizada no dia da primeira aplicação de FSH, foram contados apenas folículos pequenos (3,0 a 5,0 mm de diâmetro) e na avaliação do dia da última aplicação de FSH e 2 dias após a indução da ovulação foram contados apenas os folículos com diâmetro $\geq$ 6,0 mm.

Os exames ultra-sonográficos foram realizados por um único operador, utilizando um aparelho de ultra-som em tempo real (Aloka SSD-500 V;

Corometrics Medical Systems Inc., Wallingford, CT, USA) com transdutor linear trans-retal de 7,5 MHz.

4.5. Colheita e avaliação embrionária

Para realização das colheitas dos embriões, as vacas foram contidas em tronco individual e foi realizada anestesia peridural com 4,0 mL de lidocaína 2,0%. Foi realizada a técnica de colheita dupla, relatada por Castro Neto et al. (2005), na qual o balão do catéter de Foley foi posicionado o corpo uterino justaposto ao óstio cranial da cérvix e foram utilizados em média 1000 mL de Dulbecco Phosphate Buffered Saline (DPBS) por animal. Após a lavagem uterina, o útero foi preenchido com DPBS e o catéter mantido no local com sua abertura lacrada com uma presilha de filtro de coleta. Em seguida, as vacas foram soltas e retornaram ao tronco 20 minutos depois, para a remoção do DPBS que estava no útero e para a realização de um segundo lavado com um volume extra de 500 mL de DPBS. O material recuperado do útero foi colhido em filtro de 75 µm com devida identificação para cada animal e transportado para o laboratório, onde os embriões foram resgatados e avaliados em estereomicroscópio (Zeiss – Stemi SV6, Holanda). Os embriões foram classificados segundo o grau de desenvolvimento e qualidade, de acordo com o manual da International Embryo Transfer Society (IETS; Stringfellow & Siedel, 1999). Embriões de graus 1 a 3 foram considerados viáveis.

4.6. Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o “cross-over”, onde todos os animais participaram de todos os grupos. Todas as variáveis apresentaram homoscedasticidade pelo teste de Cochran e distribuição normal pelo teste de Lilliefors, exceto o número de corpos lúteos, que sofreu transformação logarítmica passando a ter distribuição normal. Para comparar as variáveis entre os grupos, utilizou-se o teste t pareado. Os resultados estão apresentados sob a forma de média $\pm$ erro padrão da média.

5. RESULTADOS

Não houve diferença entre os grupos experimentais Manutenção e AIMS ($P > 0,10$) quanto ao número de folículos recrutados na onda folicular sincronizada, quanto à resposta superestimulatória (número de folículos no final do tratamento com FSH) e resposta superovulatória (número de corpos lúteos). No entanto, o número de estruturas totais e, conseqüentemente, o número de embriões viáveis foi maior ($P \leq 0,05$) no grupo Manutenção comparado ao grupo AIMS (Tabela 2).

Tabela 2. Resultados (média $\pm$ EPM) da população folicular, corpos lúteos e embriões coletados em vacas recebendo dieta de Manutenção ou com alta ingestão de matéria seca (AIMS).

	Manutenção (n = 14)	AIMS (n = 14)
Folículos de 3 a 5 mm (início do FSH); n	19,5 $\pm$ 1,8	16,4 $\pm$ 2,0
Folículos $\geq$ 6 mm (final do FSH); n	17,6 $\pm$ 1,8	18,9 $\pm$ 2,6
Corpos lúteos; n	15,0 $\pm$ 1,6	13,0 $\pm$ 1,6
Estruturas totais; n	14,1 $\pm$ 2,3 ^a	9,5 $\pm$ 1,8 ^b
Embriões viáveis; n	10,7 $\pm$ 2,1 ^a	6,7 $\pm$ 1,5 ^b

^{a,b}Diferença entre os grupos ($P < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

Trabalhos desenvolvidos com novilhas cruzadas (Hereford x Holandês) demonstraram que o fornecimento de AIMS (200%) por um curto período de tempo (2 ou 3 semanas) foi capaz de aumentar o número de folículos recrutados (Gutierrez et al., 1997; Gong et al., 2002) e, conseqüentemente, melhorou a resposta aos protocolos de superovulação a base de FSH (Gong et al., 2002). No entanto, alguns trabalhos observaram efeito nulo (FrereT et al., 2006) ou negativo (Mantovani et al., 1993; Nolan et al., 1998; Yaakub et al., 1999b; Wrenzycki et al., 2000; Siddiqui et al., 2002; Lozano et al., 2003; Adamiak et al., 2005; Mollo et al., 2007) da alta ingestão alimentar sobre o número de folículos recrutados e sobre a produção de ovócitos e de embriões. No presente trabalho, utilizando 7 dias de fornecimento da AIMS antes do início da SOV, não foi observado diferença entre os tratamentos Manutenção e AIMS quanto ao número de folículos recrutados, resposta superestimulatória e superovulatória.

O efeito positivo da alta ingestão sobre a população folicular normalmente é atribuído ao aumento das concentrações circulantes de IGF-I e, principalmente, insulina. Ambos atuam como potentes estimuladores da proliferação de células da granulosa e da esteroidogênese em bovinos, além de aumentar a resposta ovariana às gonadotrofinas (Webb et al., 2004). No entanto, a insulina responde de forma mais aguda às alterações na dieta do que o IGF-I (Webb et al., 2004). Até o presente momento, o período mínimo de AIMS em que se detectou diferença nas concentrações de insulina e de IGF-I foi de 10 dias, mas não se sabe se esta diferença já estava presente antes, uma vez que não foram feitas dosagens prévias (Armstrong et al., 2001). Com base nos resultados de Armstrong et al. (2001), o presente estudo optou por aumentar a ingestão alimentar por apenas 7 dias antes do início do protocolo de SOV, a fim de determinar se esse período de AIMS seria suficiente para elevar o número de folículos recrutados e, conseqüentemente, a resposta superovulatória, de forma que também resultasse em menor ganho de peso dos animais durante o tratamento e menor custo. No entanto, 7 dias de AIMS, antes do início da SOV, não foi suficiente para alterar a população de folículos recrutados no início de uma onda. O fato de não ter sido encontrada diferença

no número de folículos recrutados na onda sincronizada, possivelmente ocorreu pela necessidade de um maior período de tempo de fornecimento de AIMS ou pelo elevado ECC dos animais utilizados neste experimento. De fato, Adamiak et al. (2005) detectaram diferença na função ovariana de vacas somente após 9 semanas do início do fornecimento das dietas experimentais (alta e baixa ingestão). Além disso, observaram que os animais hiperinsulinêmicos (fêmeas com elevado ECC e submetidas à alta ingestão alimentar) apresentaram menor número de folículos totais no ovário e menor número de ovócitos maturados e blastocistos produzidos após cultivo *in vitro*.

Com relação à produção embrionária, o fornecimento de AIMS por 7 dias antes e mais 4 dias durante a superestimulação ovariana reduziu o número de estruturas totais e embriões viáveis coletados. Apesar de a insulina e o IGF-I não terem sido dosados neste trabalho, acredita-se que 7 dias de AIMS seja suficiente para alterar a concentração circulante destes hormônios, principalmente a de insulina, devido ao efeito negativo sobre a produção embrionária, observado neste trabalho. Dados publicados sugerem que a AIMS associada a um elevado ECC nos animais possa exercer um efeito deletério sobre a maturação ovocitária e produção de embriões, possivelmente devido ao excesso de IGF-I (Webb et al., 2004) e à hiperinsulinemia (Adamiak et al., 2005), o que pode ter ocorrido neste experimento, por ter sido trabalhado com animais com ECC médio igual a 4,0. Além disso, a AIMS até o final da SOV pode ter exercido efeito deletério sobre os ovócitos, já que não foi encontrada diferença no número de ovulações, mas sim no número de embriões viáveis entre os grupos.

Corroborando os resultados negativos observados sobre a produção e qualidade embrionária nos animais submetidos à AIMS, Yaakub et al. (1999) e Wrenzycki et al. (2000) mostraram que novilhas que receberam quantidade restrita de concentrado produziram maior número de embriões e de qualidade superior quando comparadas a novilhas que receberam dieta à vontade. Similarmente, trabalhos com novilhas de corte taurinas (Mantovani et al., 1993) e com novilhas da raça Nelore (Mollo et al., 2007) observaram que o número de embriões coletados foi superior no grupo de baixa ingestão alimentar.

Dessa forma, acredita-se que o efeito positivo da AIMS sobre população folicular, resposta superovulatória e produção embrionária seja dependente do

estado metabólico em que o animal se encontra no momento em que a dieta é fornecida. Siddiqui et al. (2002), sugeriram que um nível nutricional que limite o ECC em 2,5 a 3,0 (escala de 1 a 5) em vacas zebus antes de um tratamento de superovulação, seja melhor do que um alto nível nutricional. Em concordância, Adamiak et al. (2005), além de mostrarem efeito negativo da hiperinsulinemia na qualidade dos ovócitos, sugeriram que o efeito do nível nutricional sobre as qualidades ovocitária e embrionária é dependente do ECC inicial da fêmea bovina. Outra possibilidade a ser considerada, é que estes animais estavam a pasto antes do experimento e, durante parte do experimento, ficaram totalmente confinados com dieta exclusivamente no cocho. Portanto não se pode descartar a possibilidade de o confinamento destes animais, mesmo que apenas com dieta de adaptação e manutenção, ter resultado no efeito semelhante ao esperado com a AIMS e, após o período de adaptação, quando passaram a receber a dieta de alta ingestão, este aporte energético, tenha sido excessivo para estes animais.

7. CONCLUSÕES

Nas condições do presente estudo, a alta ingestão de matéria seca por 7 dias antes da emergência da onda folicular e 4 dias durante a SOV, totalizando 11 dias, não foi capaz de alterar a função ovariana, quanto ao número de folículos recrutados, resposta superestimulatória e superovulatória. Entretanto, o número de estruturas colhidas, bem como de embriões viáveis teve efeito contrário ao esperado, provavelmente, devido ao efeito deletério da AIMS associada ao elevado ECC dos animais sobre a qualidade ovocitária.

8. AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo auxílio financeiro e à FAPESP pela concessão de bolsa; à Integral Nutrição Animal pelo fornecimento de seus produtos para alimentação dos animais.

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. **Biology of Reproduction**, v.73, p.918-26, 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. **Biology of Reproduction**, v.64, p.1624-32, 2001.

BARROS, C.M.; NOGUEIRA, M.F.G. SOV em zebuínos de corte. In: **10. Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada. Londrina**, p. 212-22, 2004.

BARUSELLI, P.S.; MARQUES, M.O.; REIS, E.L.; NASSER, L.F.T.; SILVA, R.C.P.; MENEGATTI, J.A.; VALENTIN, R.; SANTOS, I.C.C. Adequação da dose de FSH (Folltropin-v) em protocolos de superovulação de vacas nelore (*Bos taurus indicus*) com inseminação artificial em tempo fixo (SOTF). **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31(supl), p.244-45. 2003.

BURATINI Jr, J.; PRICE, C.A.; VISINTIN, J.A.; BO, 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.421-31, 2000.

CASTRO NETO, A.S.; SANCHES, B.V.; BINELLI, M.; SENEDA, M.M.; PERRI, S.H.; GARCIA, J.F. Improvement in embryo recovery using double uterine flushing. **Theriogenology**, v.63, p.1249–1255, 2005.

FORTUNE, J.E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v.78, p.135-63, 2003.

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.783-94, 2006.

GONG, J.G.; ARMSTONG, D.G.; BAXTER, G.; HOGG, C.O.; GARNSWORTHY, 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.; WEBB, R. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: Follicular populations and peripheral hormones. **Biology of Reproduction**, v.45, p.941-49, 1991.

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

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. **Journal of Animal Science**, v.68, p.1447-56, 1990.

LOZANO, J.M.; LONERGAN, P.; BOLAND, M.P.; O`CALLAGHAN, D. Influence of nutrition on the effectiveness of superovulation programmes in ewes: effect on oocyte quality and post-fertilization development. **Reproduction**, v.125, p.543-53, 2003.

MANTOVANI, R.; ENRIGHT, W.J.; KEANE, M.G.; ROCHE, J.F.; BOLAND, M.P. Effect of nutrition on follicle stimulating hormone (FSH) on superovulatory response in beef heifers. **Proc 9th AETE**, p.234, Abstract, 1993.

MAPLETOFT, R.J.; STEWARD, K.B.; ADAMS, G.P. Recent advances in the superovulation in cattle. **Reproduction, Nutrition and Development**, v.42, p.601-11, 2002.

MOLLO, M.R.; RUMPF, R.; MARTINS, A.C.; CARRIJO, L.H.D.; SAUERESSIG, M.G.; SARTORI, R. Produção de embriões em novilhas nelore superovuladas submetidas à baixa ou alta ingestão alimentar. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35(supl), p.1241, Resumo, 2007.

NOGUEIRA, M.F.G.; BARROS, B.J.P.; TEIXEIRA, A.B.; TRINCA, L.A.; D'OCCHIO, M.J.; BARROS, C.M. Embryo recovery and pregnancy rates after the delay of ovulation and fixed time insemination in superstimulated beef cows. **Theriogenology**, v.57, p.1625-34, 2002.

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.1263-74, 1998.

RHODES, F.M.; FITZPATRICK, L.A.; ENTWISTLE, K.W.; DE'ATH, G. Sequential changes in ovarian follicular dynamics in bos indicus heifers before and after nutritional anoestrous. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.104, p.41-9, 1995.

SARTORI, R.; SUÁREZ-FERNÁNDEZ, C.A.; MONSON, R.L.; GUENTHER, J.N.; ROSA, G.J.M.; WILTBANK, M.C. Improvement in recovery of embryos/ova using a shallow uterine horn flushing technique in superovulated Holstein heifers. **Theriogenology**, v.60, p.1319-30, 2003.

SARTORI, R.; SOUZA, A.H.; GUENTHER, J.N.; CARAVIELLO, D. GEIGER, L.N.; SCHENK, J.; WILTBANK, M.C. Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially inseminated with X-sorted or unsorted sperm. **Animal Reproduction**, v.1, p.86-90, 2004.

SIDDIQUI, M.A.R.; SHAMSUDDIN, M.; BHUIYAN, M.M.U.; AKBAR, M.A.; KAMARUDDIN, K.M. Effect of feeding and body condition score on multiple ovulation and embryo production in zebu cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v.37, p.37-41, 2002.

STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. (ed.). **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. 3ª edição. Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões. Biblioteca do Congresso, 1999.

WEBB, R.; GARNSWORTHY, P.C.; GONG, J.G.; ASRMSTRONG, D.G. Control of follicular interactions and nutritional influences. **Journal of Animal Science**, v.82(Supl), 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. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.18, p.69-78, 2000.

YAAKUB, H.; O'CALLAGHAN, D.O.; BOLAND, M.P. Effect of type and quantity of concentrates on superovulation and embryo yield in beef heifers. **Theriogenology**, v.51, p.1259-66, 1999.

CAPÍTULO III

**EFEITO DA CONDIÇÃO CORPORAL E
DA INGESTÃO ALIMENTAR SOBRE A
RESPOSTA**

**SUPEROVULATÓRIA E PRODUÇÃO
EMBRIONÁRIA EM NOVILHAS NELORE**

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito do escore de condição corporal (ECC) e/ou da alta ingestão de matéria seca (AIMS) na produção *in vivo* de embriões de novilhas Nelore superovuladas. Foram utilizadas 36 novilhas com menor ($2,7 \pm 0,1$; $n=17$) ou maior ($3,7 \pm 0,1$; $n=19$) ECC (escala de 1 a 5). Cada grupo foi subdividido em Manutenção ou AIMS (180% da dieta de manutenção), formando quatro subgrupos experimentais: <ECC + Manutenção (<M), <ECC + AIMS (<A), >ECC + Manutenção (>M), >ECC + AIMS (>A). A AIMS ocorreu por 14 dias antes do início da superovulação (SOV). Após colheita, os embriões viáveis foram congelados para posterior cultivo até eclosão. O número de folículos $\geq 3\text{mm}$ no início da SOV ($56,4 \pm 6,0$; $55,1 \pm 4,5$; $54,3 \pm 6,9$ e $48,2 \pm 4,8$) e o número de ovulações ($11,8 \pm 1,4$; $10,3 \pm 1,6$; $13,4 \pm 1,3$ e $12,4 \pm 1,4$) não diferiu entre os grupos >M, >A, <M e <A, respectivamente ($P>0,10$). Também não houve diferença entre os tratamentos quanto ao número de estruturas totais coletadas ($7,4 \pm 1,2$; $6,6 \pm 1,3$; $8,5 \pm 1,4$ e $8,5 \pm 1,0$) ou embriões viáveis ($3,5 \pm 0,7$; $3,6 \pm 1,0$; $4,4 \pm 0,7$ e $3,9 \pm 0,8$). As novilhas com <ECC apresentaram maiores concentrações séricas de IGF-I, entretanto as com >ECC tiveram insulina mais alta. Os embriões dos animais com >ECC apresentaram diâmetro, taxas de eclosão e expressão relativa de mRNA do gene BAX superiores após cultivo do que os coletados no grupo com <ECC. Nas condições deste experimento, ECC ou AIMS não influenciaram a resposta superovulatória ou produção embrionária nas novilhas da raça Nelore. No entanto, embriões produzidos por animais com >ECC apresentaram-se mais criotolerantes.

PALAVRAS-CHAVE: Nutrição, superovulação, embrião, *Bos taurus indicus*.

ABSTRACT

Effect of body condition and feed intake on the superovulatory response and embryo production in Nelore heifers

The aim of the present study was to investigate the effect of body condition score (BCS) and/or nutritional flushing on *in vivo* embryo production in superovulated Nelore heifers. Thirty-six heifers with lower (2.7 ± 0.1 ; $n=18$) or higher (3.7 ± 0.1 ; $n=18$) BCS (scale from 1 to 5) were used. Each group was subsequently divided into Maintenance or Flushing (180% of maintenance). Therefore, four subgroups were formed: <BCS + maintenance (<M), <BCS + flushing (<F), >BCS + maintenance (>M), and >BCS + flushing (>F). Nutritional flushing was conducted during 14 days prior to the onset of superovulation (SOV). After recovery, viable embryos were frozen to be subsequently cultured until hatching. The number of follicles $\geq 3\text{mm}$ at the onset of SOV (56.4 ± 6.0 ; 55.1 ± 4.5 ; 54.3 ± 6.9 and 48.2 ± 4.8) and the number of ovulations (11.8 ± 1.4 ; 10.3 ± 1.6 ; 13.4 ± 1.3 and 12.4 ± 1.4) did not differ among the groups >M, >F, <M, or <F, respectively ($P > 0.10$). Moreover, no difference was detected among treatments in relation to total number of embryos/ova (7.4 ± 1.2 ; 6.6 ± 1.3 ; 8.5 ± 1.4 and 8.5 ± 1.0) or number of viable embryos (3.5 ± 0.7 ; 3.6 ± 1.0 ; 4.4 ± 0.7 and 3.9 ± 0.8) recovered. Heifers with <BCS had greater blood concentrations of IGF-I, whereas heifers with >BCS had greater insulin. Embryos collected from >BCS heifers had greater diameter, hatching rates and relative expression of the BAX gene mRNA than the ones recovered from <BCS heifers. Under the conditions of this experiment, BCS or nutritional flushing did not influence superovulatory response or embryo production in Nelore heifers. However, embryos produced from >BCS animals presented better cryotolerance.

KEYWORDS: Nutrition, superovulation, embryo, *Bos taurus indicus*.

1. INTRODUÇÃO

Um dos maiores entraves dos programas comerciais de transferência de embriões (TE) é a grande variação individual ao tratamento superestimulatório (Mapletoft et al., 2002; Nogueira et al., 2002; Barros & Nogueira, 2004), observada tanto em vacas e novilhas *Bos indicus* (Baruselli et al., 2003) quanto em *Bos taurus* (Sartori et al., 2003, 2004). A variabilidade na resposta ovariana está relacionada aos diferentes protocolos de superovulação (SOV), mas também à nutrição e ao estado nutricional do animal (Yaakub et al., 1999). Em geral, fêmeas de elevado mérito genético, que são utilizadas como doadoras de embriões, não estão sob um manejo nutricional adequado, o que compromete os resultados de TE.

Nutrição está entre os fatores que mais afetam o desempenho reprodutivo de fêmeas bovinas, mas os mecanismos específicos pelos quais a dieta influencia a reprodução ainda permanecem pouco entendidos (Gong, 2002; Diskin et al., 2003). Webb et al. (2004) afirmam que influências ambientais, como alterações na dieta, afetam a atividade ovariana alterando as concentrações dos hormônios metabólicos, dentre eles o GH (somatotropina), a insulina, o IGF (fator de crescimento semelhante à insulina) principalmente IGF-I e a leptina e relatam também que a nutrição afeta a expressão de mRNA de componentes do sistema IGF ovariano a fim de regular a sensibilidade/resposta dos folículos às gonadotrofinas e podem influenciar quali e quantitativamente a produção embrionária.

A hipótese de que hormônios metabólicos sofrem influência da nutrição e exercem efeito direto no ovário, principalmente no desenvolvimento folicular inicial, é reforçada por Webb et al. (2004) quando afirmam que mudanças induzidas pelo manejo nutricional na concentração circulante de insulina e no sistema IGF são importantes para o recrutamento folicular e desenvolvimento embrionário, e citam que pequenos folículos de novilhas superalimentadas tiveram uma redução significativa nos níveis de mRNA de IGFBP-2 e -4, regulando a biodisponibilidade de IGF. Este provavelmente é um fator crítico no controle do desenvolvimento folicular pré-antral.

Além disso, o escore de condição corporal (ECC) em que as fêmeas se encontram no momento da superalimentação também parece ter influência na

produção de embriões. Um estudo recente (Adamiak et al., 2005) demonstrou que os efeitos da alimentação com diferentes níveis nutricionais sobre a qualidade de ovócitos de vacas doadoras para produção in vitro de embriões (PIV) são dependentes da condição corporal do animal. Dados publicados sugerem que o “flushing” nutricional associado a um ECC elevado nos animais pode exercer um efeito deletério sobre a maturação ovocitária e produção de embriões, possivelmente devido ao excesso de IGF-I (Webb et al., 2004) e à hiperinsulinemia (Adamiak et al., 2005). Em excesso, a insulina parece ser prejudicial por causar uma “down regulation” dos receptores GLUT dos embriões, esses receptores são os transportadores de glicose, substrato essencial para a sobrevivência embrionária, para dentro das células do embrião, a diminuição desses receptores resulta em aumento da apoptose nas células embrionárias (Augustin et al., 2003).

Acredita-se que o entendimento dos mecanismos que regulam o início do crescimento dos folículos e o desenvolvimento embrionário é a chave para melhorar a eficiência reprodutiva dos animais domésticos (Fortune, 2003). Até o presente momento, apenas o “flushing” nutricional (curto período de superalimentação; Gutierrez et al., 1997; Gong et al., 2002) e o uso do bST (somatotropina bovina; Gong et al., 1991; Buratini et al., 2000) se mostraram capazes de influenciar positivamente o número de folículos recrutados e/ou a resposta aos protocolos de SOV. Mas em relação ao efeito nutricional sobre a produção embrionária pouco se conhece e os resultados, além de controversos, estão aquém do ideal.

2. OBJETIVO

Avaliar a influência da condição corporal associada ou não à alimentação com AIMS na resposta superovulatória, taxa de fecundação, quantidade e qualidade de embriões coletados e congelabilidade desses embriões e expressão de genes relacionados à qualidade embrionária em novilhas da raça Nelore.

3. HIPÓTESES

Novilhas com baixo ECC alimentadas com dieta balanceada e recebendo 180% da dieta de manutenção antes do início da SOV apresentam uma melhor resposta superovulatória, produzem embriões com maior expressão de genes relacionados à qualidade e têm um aumento mais abrupto e significativo nas concentrações séricas de IGF-1.

Novilhas com alto ECC alimentadas com dieta balanceada e recebendo 180% da dieta de manutenção antes do início da SOV produzem menor número de embriões viáveis.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Trinta e seis novilhas da raça Nelore, com idade média de 36 a 48 meses que estavam com alto ($n = 19$) e baixo ($n = 17$) ECC, respectivamente foram utilizadas no experimento. Apresentavam peso corporal de $457,2 \pm 10,0$ kg e $378,4 \pm 12,0$ kg, respectivamente para o grupo de elevado e baixo ECC. Todas as novilhas passaram por exame ginecológico antes do início do projeto.

4.2. Dietas experimentais

As novilhas estavam divididas em dois grupos, um com elevado ECC e outro com baixo ECC. As novilhas de cada grupo (alto e baixo ECC) foram subdivididas, aleatoriamente, em subgrupos de Manutenção e AIMS, como a AIMS por sete dias antes da primeira aplicação de FSH da SOV não surtiu resultados favoráveis (avaliado no experimento do capítulo 1), neste experimento a AIMS foi realizada por 14 dias prévios ao tratamento de superestimulação. Após a subdivisão, foram formados quatro grupos experimentais: Baixo ECC + Manutenção (<ECC+Manutenção), Baixa ECC + AIMS (<ECC+AIMS), Alta ECC + Manutenção (>ECC+Manutenção), Alta ECC + AIMS (>ECC+AIMS).

As novilhas que estavam no grupo Manutenção receberam deita de manutenção (100%) ajustada de acordo com o peso do grupo, ou seja, manutenção para o grupo com elevado e baixo ECC (com ingestão total de 2,03% do PV). As novilhas do grupo AIMS receberam dieta com 180% da manutenção e também foi ajustada ao peso do grupo de elevado e baixo ECC (ingestão total de 3,65% do PV). A alimentação era feita exclusivamente com a dieta experimental, com sal mineral e água à vontade e durante todo o experimento os animais não tiveram acesso a pasto.

Todas as novilhas receberam dieta de manutenção por 4 semanas antes do início do experimento (dieta de adaptação) e após o término da primeira réplica permaneceram com dieta de manutenção até o início da segunda réplica. Na segunda réplica os grupos foram invertidos. Os animais do grupo

Manutenção passaram para o grupo AIMS e vice-versa, porém o cross-over foi realizado apenas dentro dos grupos experimentais de maior e menor ECC, ou seja, os animais de maior ECC permaneceram nesse grupo até o final do experimento, da mesma forma, os animais de menor ECC também permaneceram assim durante todo o período experimental.

Além disso, o peso e o escore de condição corporal (ECC) (escala de 1 a 5; Houghton et al., 1990) foram avaliados semanalmente. Como as dietas eram fornecidas em quantidade proporcional a média de peso corporal do grupo, estas foram reformuladas semanalmente, apesar de a variação de peso corporal ter sido discreta (não significativa) dentro de cada grupo experimental durante todo o período do experimento, essa correção foi mantida.

A porcentagem dos componentes da dieta, de matéria seca (MS), dos nutrientes digestíveis totais (NDT) e de proteína bruta (PB) oferecida estão ilustrados na Tabela 3.

Tabela 3. Porcentagem dos componentes, de MS, de NDT e de PB das dietas experimentais.

Componentes	% na dieta	% de MS	% de NDT	% de PB
Feno coast-cross	36,7	85,0	50,0	10,0
Silagem milho	18,0	25,0	62,8	7,5
Milho moído	24,4	90,0	80,0	9,0
Farelo de trigo	12,4	90,0	70,0	14,0
Concentrado*	8,5	90,0	65,0	22,0
Média total	-	37,9	62,4	11,5

*Boião PPU – Integral Nutrição Animal, Goiânia-GO, Brasil.

4.3. Protocolo de superestimulação ovariana

Quatorze dias após início das dietas experimentais (Manutenção ou AIMS), todas as novilhas foram sincronizadas com dispositivo intra-vaginal de progesterona (P4; DIB, Sintex S.A., Argentina) e 2,0 mg de benzoato de estradiol (BE; Ric-BE, Tecnopec, Brasil) e foram superovuladas com FSH seguindo o protocolo de transferência de embriões em tempo fixo descrito na

Figura 2. Cada novilha recebeu oito injeções de FSH im a cada 12 horas em doses decrescentes, utilizando uma dose total de 150 UI de FSH (Pluset, Calier, S.A. Barcelona, Espanha) e 0,150 mg de prostaglandina - $\text{PGF}_{2\alpha}$ (D-Cloprostenol; Veteglan, Calier, S.A. Barcelona, Espanha), simultânea à sexta e sétima aplicação de FSH. Doze horas após a última aplicação de FSH, a ovulação foi induzida com 0,05 mg de GnRH (Acetato de Gonadorelina; Gestran Plus; ARSA S. R. L. Buenos Aires, Argentina). Doze e 24 horas após a indução da ovulação as novilhas foram inseminadas artificialmente com sêmen congelado de uma mesma partida e um mesmo touro e os embriões foram coletados sete dias após a injeção para indução da ovulação. Após a colheita dos embriões, as novilhas foram tratadas com 0,150 mg de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (D-Cloprostenol; Veteglan, Calier, S.A. Barcelona, Espanha) e permaneceram recebendo a dieta de manutenção, ajustada de acordo com o peso do grupo, ou seja, manutenção para o grupo com elevado e baixo ECC. Vinte dias após, uma nova SOV foi realizada e os tratamentos foram invertidos, ou seja, as novilhas que haviam recebido alimentação com AIMS passaram para o grupo Manutenção e vice-versa.

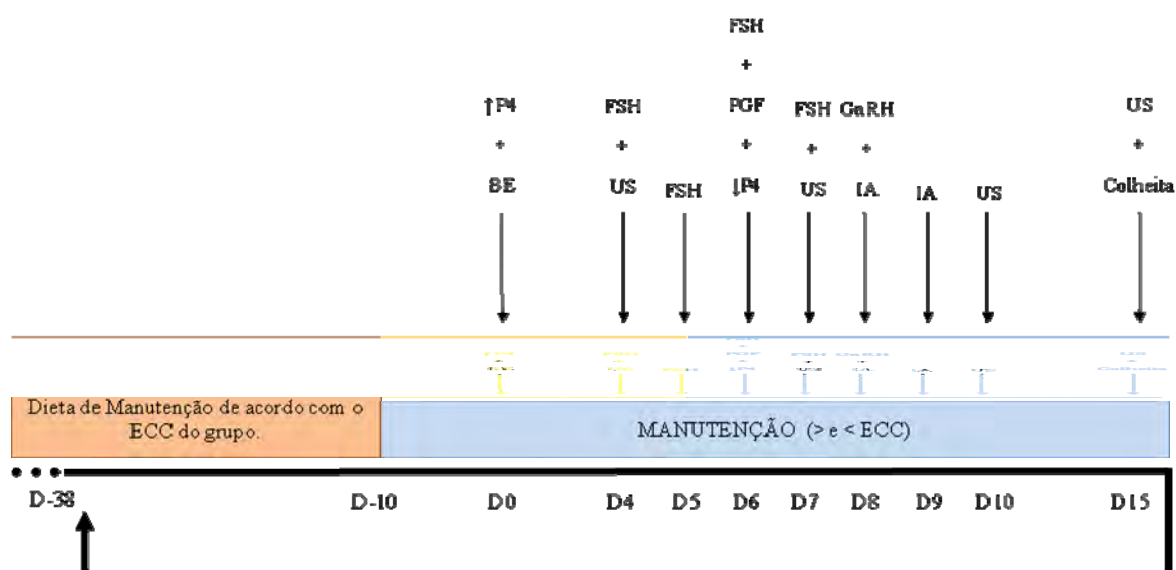


Figura 2. Esquema representativo do delineamento experimental, mostrando o período das dietas experimentais, o protocolo de superestimulação ovariana e os exames ultra-sonográficos. Legenda: D-38 a D15 = dias em relação ao início do protocolo de superestimulação (D0); P4 = implante de progesterona, BE = benzoato de estradiol, FSH = hormônio folículo estimulante; PGF = prostaglandina F2 α , GnRH = hormônio liberador de gonadotrofina; IA = inseminação artificial; US = exame ultra-sonográfico. Dietas: AIMS (alta ingestão de matéria seca) = 180% em relação à dieta de manutenção; > e < ECC = elevado e baixo escore de condição corporal.

4.4. Exames ultra-sonográficos

Exames ultra-sonográficos ovarianos foram realizados no ato da primeira e da última aplicação de FSH, e 2 e 7 dias após a indução da ovulação (Figura 2). Na avaliação realizada no dia da primeira aplicação de FSH, foram contados apenas folículos pequenos (3,0 a 5,0 mm de diâmetro) e na avaliação do dia da última aplicação de FSH e 2 dias após a indução da ovulação foram contados apenas os folículos com diâmetro $\geq$ 6,0 mm.

Os exames ultra-sonográficos foram realizados por um único operador, utilizando um aparelho de ultra-som em tempo real (Aloka SSD-500 V; Corometrics Medical Systems Inc., Wallingford, CT, USA) com transdutor linear trans-retal de 7,5 MHz.

4.5. Colheita e avaliação embrionária

Para realização das colheitas dos embriões, as vacas foram contidas em tronco individual e foi realizada anestesia peridural com 4,0 mL de lidocaína 2,0%. Foi realizada a técnica de colheita dupla, relatada por Castro Neto et al. (2005), na qual o balão do catéter de Foley foi posicionado no corpo uterino justaposto ao óstio cranial da cérvix e foram utilizados em média 1000 mL de Dulbecco Phosphate Buffered Saline (DPBS) por animal. Após a lavagem uterina, o útero foi preenchido com DPBS e o catéter mantido no local com sua abertura lacrada com uma presilha de filtro de coleta. Em seguida, as vacas foram soltas e retornaram ao tronco 20 minutos depois, para a remoção do DPBS que estava no útero e para a realização de um segundo lavado com um volume extra de 500 mL de DPBS. O material recuperado do útero foi colhido em filtro de 75 µm com devida identificação para cada animal e transportado para o laboratório, onde os embriões foram resgatados e avaliados em estereomicroscópio (Zeiss – Stemi SV6, Holanda). Os embriões foram classificados segundo o grau de desenvolvimento e qualidade, de acordo com o manual da International Embryo Transfer Society (IETS; Stringfellow & Siedel, 1999). Embriões de graus 1 a 3 foram considerados viáveis.

4.6. Congelação dos embriões

Os embriões viáveis colhidos (grau 1 e 2) foram congelados com etilenoglicol (Ethylene Glycol Freeze Plus with 0.1M sucrose, Bioniche, Pullman, WA) em nitrogênio líquido usando o protocolo clássico, com curva de resfriamento de -0.5°C/min, temperatura final de -32°C e Seeding a -6°C.

Após classificação dos embriões quanto ao grau de desenvolvimento e qualidade, os embriões grau 1 e 2 passaram por oito banhos no meio de manutenção-Holding (Tqc Holdind Plus; Bioniche, Pullman, WA) e em seguida passaram por dois banhos em gotas com etilenglicol, foram envasados em palhetas de 0,25 ml, sendo que permaneceram no máximo 10 minutos imersos em etilenoglicol antes de iniciar a congelação (estabilização e a curva).

As palhetas foram previamente identificadas com número da doadora, tratamento, número de embriões colocados na palheta, estágio de

desenvolvimento e grau de qualidade. Após o envase dos embriões, seguiram para a máquina de congelação TK 3000 (TK 3000 SE; Nutricell, Campinas-SP), que já estava estabilizada a -6°C . Antes de iniciar a curva de congelação, as palhetas permaneceram por 10 minutos estabilizando a -6°C , porém após 2 minutos dessa estabilização, foi realizado o *Seeding* (indução da cristalização) e após esses 10 minutos, iniciou-se a curva padrão de congelação ($-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$), atingindo uma temperatura no final da curva de -32°C . Após o término da curva as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido e armazenadas em botijões com nitrogênio líquido.

4.7. Cultivo *in vitro* dos embriões após descongelação

Para o cultivo *in vitro* dos embriões após descongelamento, utilizou-se gotas com o meio de cultivo de fluido sintético de oviduto (SOF, Nutricell, Campinas, SP, Brasil) com co-cultivo de células do cumulus imaturas. As gotas foram preparadas por pelo menos 24 horas antes do descongelamento e foram mantidas em estufa a 39°C e 5% de CO_2 em ar para formação do tapete celular no fundo da placa e estabilização do meio. Cada placa continha quatro gotas de $200\ \mu\text{L}$ de meio de cultivo SOF, cobertas com óleo mineral. Cultivou-se mórulas e blastocistos separadamente, segundo cada tratamento (>ECC+AIMS, >ECC+Manutenção, <ECC+AIMS, <ECC+Manutenção), devidamente identificados, colocando em média 18 embriões por gota.

Para a descongelação, os embriões foram retirados do nitrogênio líquido, mantidos em temperatura ambiente por 5 segundos e imersos em água aquecida a 30°C por 20 segundos. Após a descongelação, os embriões de cada palheta passaram por um banho de 30 segundos em solução 1:1 de Etilenoglicol (Ethylene Glycol Freeze Plus com 0,1 M de sucrose, Bioniche, Pullman, WA) e Meio Holding (Tqc Holdind Plus; Bioniche, Pullman, WA), em seguida por três banhos seqüenciais em Meio Holding, e por último, um banho em meio SOF. Logo após, foram transferidos para a gota de cultivo preparada anteriormente, sendo então mantidos em estufa a 39°C e 5% de CO_2 em ar.

O tempo total de cultivo *in vitro* foi de 96 horas, para avaliação das taxas de re-expansão e eclosão. As avaliações morfológicas foram realizadas a cada 12 horas completadas do início do cultivo. Em cada avaliação, os embriões de

todas as gotas foram mensurados através do programa Motic Images Plus 2.0 por meio de uma objetiva fotográfica acoplada à lupa Stem Zeiss SV-6. Todos os embriões que já se encontravam eclodidos no final de cada avaliação eram lavados em solução de PBS modificado (ausente de soro fetal bovino, antibiótico, cálcio e magnésio) e congelados individualmente a -80°C para posterior análise da expressão de genes relacionados à qualidade embrionária através da técnica de RT-PCR semi-quantitativo.

Às 96 horas, última avaliação, todos os embriões restantes, eclodidos ou não, foram lavados em solução de PBS modificado (ausente de soro fetal bovino, antibiótico, cálcio e magnésio) e congelados individualmente a -80°C para posterior análise da expressão de genes relacionados à qualidade embrionária através da técnica de RT-PCR semi-quantitativo.

Após 96 horas de cultivo *in vitro* a criotolerância dos embriões foi morfológicamente avaliada, baseada no desenvolvimento *in vitro* destes embriões após a descongelação, que está representada pela taxa de eclosão dos embriões. A taxa de eclosão é a porcentagem dos embriões que eclodiram durante todo o período de cultivo, em relação ao número total de embriões de cada tratamento que iniciaram o cultivo.

4.8.Colheitas de sangue e dosagens hormonais

Foram colhidas amostras de sangue para dosagem dos hormônios insulina e IGF-I total. As colheitas foram realizadas durante todo o período de AIMS, iniciando dois dias antes do início da AIMS e continuaram por dois dias consecutivos após o início desta, a partir desse momento as colheitas passaram a ser realizadas em dias alternados até o último dia da AIMS, totalizando dez amostras de sangue por animal. O sangue foi colhido por punção da veia jugular com tubos de Vacutainer e foi centrifugado a 1600 g por 15 min logo após a colheita. O soro foi então congelado a -20°C, para posteriormente ser analisado para dosagem de insulina através de radioimunoensaio (RIE) e IGF-I através de ensaio imunorradiométrico (IRMA).

Os kits utilizados para cada ensaio e os respectivos coeficientes de variação (CV) estão descritos na Tabela 4. As dosagens de insulina foram realizadas nos dias -2, -1, 0, 1, 3, 5, 7, 11 e 13 em relação ao início da AIMS.

As dosagens de IGF-I foram realizadas nos dias 0, 7 e 13 em relação ao início da AIMS.

Tabela 4. Descrição dos kits utilizados e coeficientes de variação (CV) intra-ensaio obtidos nas dosagens hormonais realizadas.

Ensaio	Kit	CV intra-ensaio (%)
Insulina	Coat-a-Count Insulin, DPC-Medlab (TKIN5)	4,8
IGF-I total	DSL-5600 IRMA Active™	5,7

4.9. Expressão gênica nos embriões

Após a descongelação e o cultivo *in vitro* dos embriões, os embriões que eclodiram em até no máximo 96 horas, passaram por banhos em solução de PBS modificado (ausente de soro fetal bovino, antibiótico, cálcio e magnésio) e congelados individualmente a -80°C em tubos eppendorf de 0,2 mL com 0,2 µL de PBS modificado, onde permaneceram até a extração do RNA.

Foram formados oito pools de dois embriões eclodidos para cada tratamento (>ECC+AIMS, >ECC+Manutenção, <ECC+AIMS, <ECC+Manutenção), destes oito pools, quatro deles foram formados por embriões que estavam no estágio de mórula antes do cultivo *in vitro* e os outros quatro pools foram de blastocistos. Apenas o tratamento <ECC+Manutenção ficou com quatro repetições com um único embrião, pois a taxa de eclosão desde tratamento foi mais baixa e não teve embrião suficiente para fechar as oito repetições com dois embriões cada.

Os embriões foram submetidos à avaliação da expressão dos genes INF- τ , BAX, BCL-2, IGF-2, IGF-2R e GRB-10 através da técnica de RT-PCR semi-quantitativo. O gene GAPDH foi utilizado como controle constitutivo.

Para a extração do RNA total foi utilizado Trizol Reagent (Invitrogen™) e o Kit Micro Fast Track 2.0 (Invitrogen™) seguindo as recomendações do fabricante, mas com modificações. Os embriões a serem avaliados foram

descongelados em gelo, centrifugados e então foi acrescentado 50 μ L de Trizol.

Posteriormente, foi adicionado 10 μ L de clorofórmio e colocado no vortex por 15 segundos, foi feito repouso de 2 minutos em temperatura ambiente. Após o repouso, o tubo contendo o material foi centrifugado a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C, sendo retirado o sobrenadante, transferindo-o para outro tubo. Foi adicionado 1U de DNase (Promega®) e permaneceu a 37°C por 30 minutos. Logo após foi adicionado 510 μ L de PBS RNase free.

A solução obtida foi transferida para o tubo com oligo (dT) celulose (fornecido pelo kit). Os tubos foram colocados no vortex, com agitação na velocidade 5, a temperatura ambiente por 20 minutos e após foram centrifugados a 4000 x g por 5 minutos em temperatura ambiente.

O sobrenadante da resina foi removido, permanecendo apenas o pellet de oligo (dT) celulose.

Lavagem do Oligo (dT):

O pellet de oligo (dT) foi ressuspensionado em 1,3 mL de tampão de ligação, centrifugado a 4000g por 5 minutos em temperatura ambiente. O tampão de ligação foi removido, permanecendo apenas o pellet. Esse passo de lavagem foi repetido por mais quatro vezes.

Após as lavagens, a resina foi ressuspensionada em 300 μ L de tampão de ligação e a amostra foi transferida para uma coluna com um tubo de minicentrífuga acoplado (fornecido pelo kit) e centrifugada a 4000 x g por 15 segundos em temperatura ambiente. Esse passo foi repetido por mais três vezes.

Foi adicionado 200 μ L de tampão de lavagem “Low Salt” e gentilmente, o pellet foi ressuspensionado e centrifugado a 4000 x g por 15 segundos em temperatura ambiente. Esta lavagem foi repetida por mais uma vez.

Eluição e precipitação do mRNA:

Após as lavagens a coluna foi transferida para um novo tubo (fornecido pelo kit) e adicionado 100 μ L de tampão de eluição. Foi centrifugado a 4000 x g por 15 segundos em temperatura ambiente.

Foi adicionada uma segunda alíquota de 100 µl de tampão de eluição à coluna e foi centrifugado novamente por 15 segundos. A coluna foi removida do tubo e descartada. Os 200 µl neste novo tubo é a amostra de mRNA.

O mRNA foi precipitado com 10 µl de glicogênio carreador (2 mg/ml), 30 µl de 2 M acetato de sódio e 600 µl de 200 proof (100%) etanol, em seguida as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido. Imediatamente após, foram derretidas e centrifugadas a uma velocidade máxima de 16000 x g por 15 minutos a 4°C.

O sobrenadante foi descartado, restando apenas um pequeno pellet de mRNA. Este foi ressuspendido com 8 µl de tampão de eluição.

Para a síntese de cDNA foram utilizados 8 µL de RNA total, acrescentando 0,5 µg/µL de oligo(dT), 40 mM das quatro dNTP's e 14 µL de água DEPC para ajustar o volume. Em seguida o tubo foi aquecido a 65°C por 5 minutos. Adicionou-se então o 2 µL do 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, 2 UI de Taq DNA polimerase, 2 mM de MgCl₂ para GAPDH, BAX, GRB-10, INF-τ e 1 mM para BCL-2, IGF-2, IGF-2R, 2 µL de cDNA para GAPDH, BAX, INF-τ, BCL-2, IGF-2, IGF-2R e 2,5 µL para o gene GRB-10. Antes da realização das reações de PCR, foi determinado o número de ciclos e a temperatura de anelamento, na fase exponencial de amplificação, para cada gene em questão. O número de ciclos de amplificação foi de 33 para INF-τ, 37 ciclos para o GAPDH, 40 ciclos para BAX e GRB-10 e 45 ciclos para BCL-2, IGF-2 e IGF-2R. A temperatura de anelamento utilizada foi de 50°C para os genes BCL-2, IGF-2 e IGF-2R e de 54°C para os demais genes. Foi utilizado o programa ActinalGF do termociclador.

As seqüências dos “primers” utilizados, bem como o tamanho dos fragmentos amplificados estão mostrados na Tabela 5.

Tabela 5. Seqüência dos *primers* utilizados e tamanhos dos fragmentos amplificados para avaliação dos genes IGF-II, IGF-IIR, INTERFERON- τ , BCL-2, BAX, GRB 10 e GAPDH.

Gene	Primer	Fragmento amplificado
IGF-II		
sense	5'-TCGTGCTGCTATGCTGCTTACG-3'	306 pb
antisense	5'-ACTGCTTCCAGGTGTCAGATTGG-3'	
IGF-IIR		
sense	5'-CGCCTACAGCGAGAAGGGGGTTAGTC-3'	293 pb
antisense	5'-AGAAAAGCGTGACGTGCGCCTTGTC -3'	
INTERFERON- τ		
Sense	5'-GCCCTGGTGCTGGTCAGCTA-3'	564 pb
antisense	5'-CATCTTAGTCAGCGAGAGTC-3'	
BCL-2		
Sense	5'-ATGACTTCTCTCGGCGCT-3'	184 pb
antisense	5'-TTGACGCTCTCCACACACA -3'	
BAX		
Sense	5'-TGCAGAGGATGATCGCAGCTGTG-3'	198 pb
antisense	5'-CCAATGTCCAGCCCATCATGGTC-3'	
GRB 10		
Sense	5'-GAAGATGGGACAAGCAAAGT-3'	290 pb
antisense	5'-CTGGCACCAAGTAACCATCTG-3'	
GAPDH		
Sense	5'-CCCATCACCATCTTCCAGG-3'	471 pb
antisense	5'-AGTGAGCTTCCCGTTCAGC-3'	

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 GAPDH como constitutivo.

4.10. Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o fatorial 2x2. Os resultados foram analisados através do programa computacional Statistical Analysis System (SAS, 2001) sendo anteriormente verificada a normalidade dos resíduos pelo Teste de Shapiro-Wilk (PROC UNIVARIATE) e a homogeneidade das variâncias comparadas pelo Teste de Hartley (OTT, 1993). Os dados (variável dependente) que não atenderam a estas premissas foram submetidos à transformação logarítmica [$\text{Log}(X+1)$] ou quadrática [$\text{RQ}(X+1/2)$]. Os dados originais ou transformados, quando este último procedimento foi necessário, foram submetidos à análise de variância que separou como causas de variação efeito de dieta, efeito de escore de condição corporal (ECC) e efeito de período de colheita, além das interações entre estes fatores (Tabela 6). No caso de efeito nas interações, estas foram separadas através de contrastes ortogonais. Tal análise foi realizada utilizando-se o procedimento General Linear Model (PROC GLM do SAS).

Na análise da taxa de eclosão foi incluído o efeito do estágio embrionário e retirado o efeito do período de colheita (Tabela 7). Nesta análise, para ser possível utilizar um teste quantitativo (ANOVA) realizou-se a transformação dos dados em 0 ou 1. Enquanto não houvesse eclosão do embrião, este dado era considerado 0, a partir do momento em que houvesse a eclosão, este dado assumia o valor 1.

As análises referentes aos valores de insulina, IGF e taxa de eclosão foram realizadas conforme descrito anteriormente, porém foi adicionado o fator medidas repetidas no tempo, referentes aos diversos momentos de colheita (Tabelas 8 e 9). As probabilidades das interações com o tempo foram determinadas pelo teste de Greenhouse-Geisse, utilizando-se o comando REPEATED gerado pelo procedimento GLM (PROC GLM do SAS). Análises por tempo somente foram realizadas quando as interações entre tempo e tratamentos forem significativas. Para tal foi utilizado o comando SLICE do GLM do SAS. Quando significativo, estudou-se efeito de tratamento dentro do tempo pelo teste de média Tukey.

As variáveis número médio de oócitos não-fecundados, de mórulas e de blastocistos não respeitaram a premissa da normalidade dos resíduos mesmo

quando transformados, logo, utilizou-se a estatística não-paramétrica de ordem valendo-se do teste de Kruskal-Wallis (PROC NPAR1WAY do SAS).

Os dados de expressão gênica e do tamanho dos embriões foram avaliados pelo teste *t* de Student, apenas os dados que não apresentaram distribuição normal foram analisados pelos testes não-paramétricos Mann Whitney ou Kruskal-Wallis. Os resultados estão apresentados sob a forma de média $\pm$ erro padrão da média.

Foi utilizado o nível de significância de 5% para todos os testes realizados.

Tabela 6. Esquema de análise de variância para delineamento fatorial

Causas de variação	Graus de Liberdade
Dieta	1
Escore de Condição Corporal	1
Período	1
Interação Dieta x ECC	1
Interação Dieta x Período	1
Interação ECC x Período	1
Interação Dieta x ECC x Período	1
Resíduo A	64
Total de Unidades Experimentais	71

Tabela 7. Esquema de análise de variância para delineamento fatorial (Taxa de eclosão)

Causas de variação	Graus de Liberdade
Dieta	1
Escore de Condição Corporal	1
Estágio Embrionário	1
Interação Dieta x ECC	1
Interação Dieta x Estágio	1
Interação ECC x Estágio	1
Interação Dieta x ECC x Estágio	1
Resíduo A	64

Total de Unidades Experimentais	71
---------------------------------	----

Tabela 8. Esquema de análise de variância para delineamento fatorial com as medidas repetidas no tempo (dias -2, -1, 0, 1, 3, 5, 7, 11 e 13)

Causas de variação	Graus de Liberdade
Dieta	1
Escore de Condição Corporal	1
Período	1
Interação Dieta x ECC	1
Interação Dieta x Período	1
Interação ECC x Período	1
Interação Dieta x ECC x Período	1
Resíduo A	64
Total de Unidades Experimentais	71
Tempo	8
Interação Tempo x Dieta	8
Interação Tempo x ECC	8
Interação Tempo x Período	8
Interação Tempo x Dieta x ECC	8
Interação Tempo x Dieta x Período	8
Interação Tempo x ECC x Período	8
Interação Tempo x Dieta x ECC x Período	8
Resíduo B	512
Total de Sub-unidades Experimentais	647

Tabela 9. Esquema de análise de variância para delineamento fatorial com as medidas repetidas no tempo para a variável insulina (dias 0, 7 e 13)

Causas de variação	Graus de Liberdade
Dieta	1
Escore de Condição Corporal	1
Período	1
Interação Dieta x ECC	1
Interação Dieta x Período	1
Interação ECC x Período	1
Interação Dieta x ECC x Período	1
Resíduo A	64
Total de Unidades Experimentais	71
Tempo	2
Interação Tempo x Dieta	2
Interação Tempo x ECC	2
Interação Tempo x Período	2
Interação Tempo x Dieta x ECC	2
Interação Tempo x Dieta x Período	2
Interação Tempo x ECC x Período	2
Interação Tempo x Dieta x ECC x Período	2
Resíduo B	128
Total de Sub-unidades Experimentais	215

5. RESULTADOS

5.1. Peso corporal e escore de condição corporal

Não houve variação no peso médio (média $\pm$ EPM) e no ECC médio dos animais durante o período experimental ($P > 0,10$). Os animais com maior peso corporal e maior ECC se mantiveram assim durante todo o experimento, incluindo o período em que estavam submetidos à AIMS. O mesmo foi observado nos animais com menor peso corporal e ECC inferior (Figuras 3 e 4).

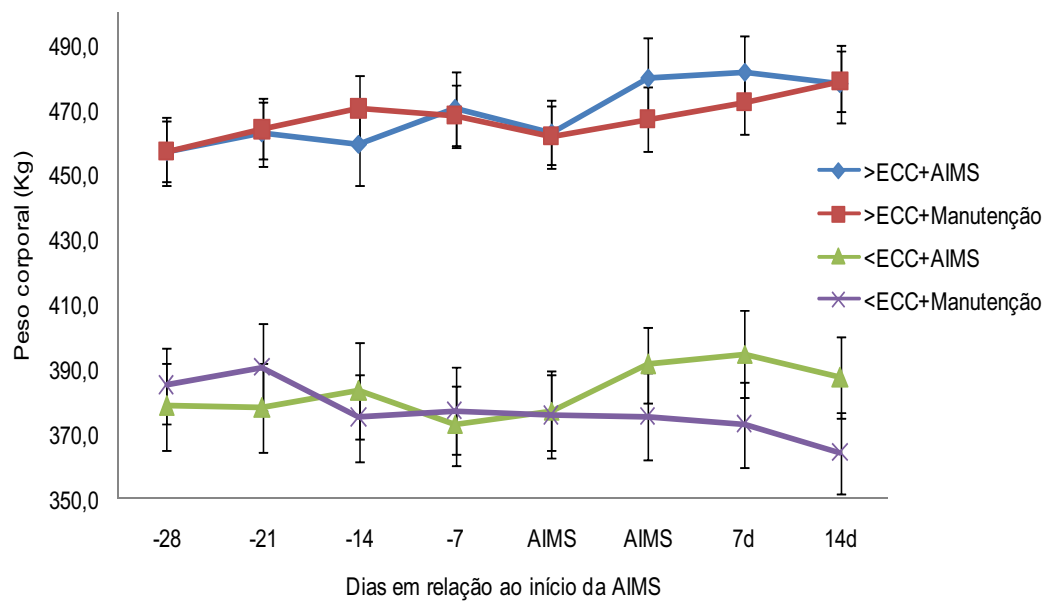


Figura 3. Peso corporal (kg) dos animais (média $\pm$ EPM) com maior ECC submetidos à AIMS (>ECC + AIMS; n = 19) e à Manutenção (>ECC + Manutenção; n = 19) e dos animais com menor ECC submetidos à AIMS (<ECC + AIMS; n = 17) e à Manutenção (<ECC + Manutenção; n = 17) ao longo do período experimental. Não houve diferença ($P > 0,10$) no peso corporal médio entre os grupos submetidos ou não à AIMS.

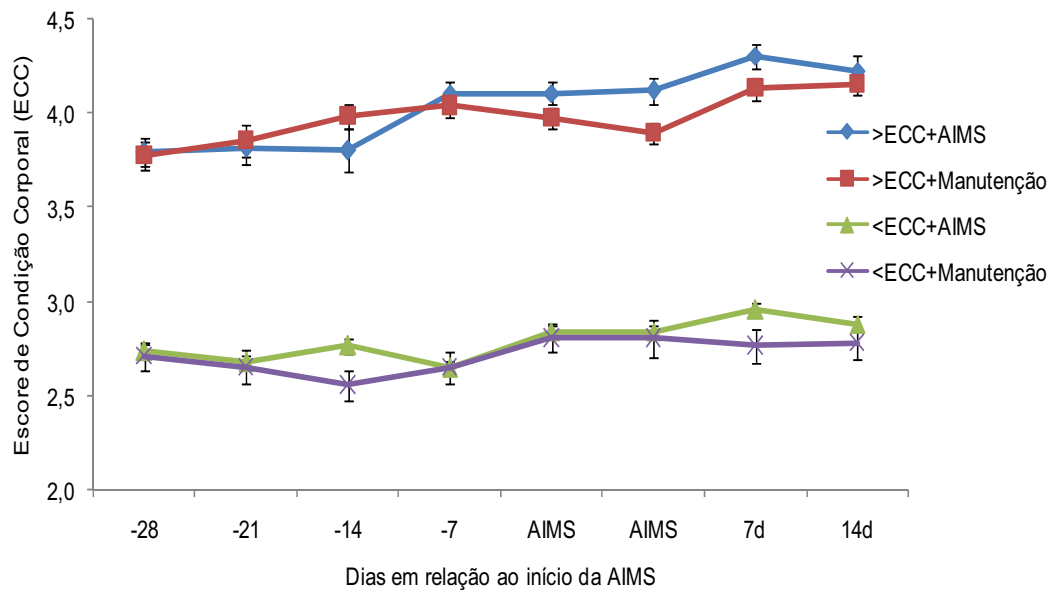


Figura 4. Escore de condição corporal (ECC, escala de 1 a 5) dos animais (média $\pm$ EPM) com maior ECC submetidos à AIMS (>ECC + AIMS; n = 19) e à Manutenção (>ECC + Manutenção; n = 19) e dos animais com menor ECC submetidos à AIMS (<ECC + AIMS, n = 17) e à Manutenção (<ECC + Manutenção; n = 17) ao longo do período experimental. Não houve diferença ($P > 0,10$) no ECC médio entre os grupos submetidos ou não à AIMS.

5.2. Resposta superestimulatória e superovulatória e produção embrionária

Não houve efeito da dieta, do ECC e, conseqüentemente, também não houve efeito de interação entre dieta e ECC quanto ao número de folículos recrutados na onda folicular sincronizada e quanto ao número de ovulações ($P>0,05$). O número de estruturas totais e, conseqüentemente, o número de embriões viáveis também não diferiu entre os quatro tratamentos experimentais ($P>0,05$) (Tabelas 10 e 11).

Tabela 10. Resultados (média) da população folicular (n), corpos lúteos (n) e embriões coletados (n), nos animais com maior ECC submetidos à AIMS (>ECC + AIMS; n = 19) e à Manutenção (>ECC + M; n = 19) e dos animais com menor ECC submetidos à AIMS (<ECC + AIMS, n = 17) e à Manutenção (<ECC + M; n = 17).

	>ECC		<ECC		Média	CV (%)	P		
	M	AIMS	M	AIMS			Diet a	ECC	D*E CC
Folículos ≥ 3mm (antes da AIMS); n	47,6	47,5	47,5	37,2	42,4	47,5	0,56	0,03	0,81
Folículos ≥ 3mm (início FSH); n	56,4	55,1	54,3	48,2	53,6	43,4	0,81	0,41	0,46
Folículos ≥ 6mm (final FSH); n	41,6	35,5	41,5	34,5	38,3	62,9	0,53	0,86	0,66
Corpos lúteos; n	11,8	10,3	13,4	12,4	11,9	50,5	0,58	0,23	0,91
Estruturas totais coletadas; n	7,4	6,6	8,5	8,5	7,7	68,5	0,80	0,18	0,58
Embriões viáveis; n	3,47	3,58	4,41	3,94	3,83	87,6	0,38	0,32	0,94
Embriões degenerados; n	3,1	2,5	2,7	3,8	3,0	123,7	0,45	0,52	0,10

Tabela 11. Número médio de ovócitos não fecundados (NF), mórulas e blastocistos, com respectivas médias, CV e probabilidades, nos animais com maior ECC submetidos à AIMS (>ECC + AIMS; n = 19) e à Manutenção (>ECC + M; n = 19) e dos animais com menor ECC submetidos à AIMS (<ECC + AIMS, n = 17) e à Manutenção (<ECC + M; n = 17).

	>ECC		<ECC		Média	CV (%)	P
	M	AIMS	M	AIMS			
NF	0,6	0,2	0,7	1,1	0,6	183,7	0,09
Mórula	2,3	2,8	3,2	2,4	2,7	113,1	0,61
Blastocisto	1,4	1,3	1,9	1,8	1,7	126,8	0,47

5.3. Concentrações séricas de insulina e IGF-I

Não houve efeito de interação entre dieta e ECC na concentração sérica de insulina ($P > 0,05$) (Figura 5). Por outro lado, houve efeito da condição corporal durante quase todo o período experimental, com excessão dos dias 3 e 11 em relação ao início da AIMS (Figura 6), e da dieta nos dias 5, 7, 9 e 11 em relação ao início do fornecimento da AIMS (Figura 7), sobre a concentração sérica de insulina (Tabela 12). Dessa forma, os animais que receberam AIMS por 14 dias previamente à SOV e os animais com maior ECC apresentaram maiores concentrações séricas de insulina em relação aos animais que receberam dieta de Manutenção durante todo o período experimental e aos animais com menor ECC.

Tabela 12. Concentração de insulina nos dias -2, -1, 0, 1, 3, 5, 7, 11 e 13 em relação ao início da AIMS, com respectivas médias, coeficiente de variação (CV) e probabilidades nos animais com maior ECC submetidos à AIMS (>ECC + AIMS; n = 19) e à Manutenção (>ECC + M; n = 19) e dos animais com menor ECC submetidos à AIMS (<ECC + AIMS, n = 17) e à Manutenção (<ECC + M; n = 17).

	>ECC		<ECC		Média	CV (%)	P		
	M	AIMS	M	AIMS			Dieta	ECC	D*ECC
-2	11,5	14,0	11,6	7,4	11,2	72,7	0,38	0,01	0,05
-1	18,2	16,8	9,5	9,8	13,7	87,1	0,88	0,0008	0,81
0	17,2	12,9	10,1	9,7	12,5	96,9	0,77	0,01	0,34
1	13,6	17,7	10,1	11,7	13,3	91,9	0,20	0,01	0,59
3	15,8	16,5	9,9	13,9	14,1	79,9	0,10	0,07	0,66
5	14,8	21,0	7,8	10,5	13,6	77,9	0,012	<,0001	0,77
7	16,3	18,4	10,4	13,1	14,7	66,9	0,05	0,01	0,67
9	20,3	22,6	7,2	16,8	16,9	104,7	0,04	0,0006	0,15
11	15,6	12,3	11,0	14,6	15,2	66	0,08	0,07	0,83
13	12,4	19,1	8,5	14,2	13,6	72,2	0,002	0,02	0,56
Média	15,6	17,8	9,6	12,2	13,9	61,6	0,09	0,0005	0,81

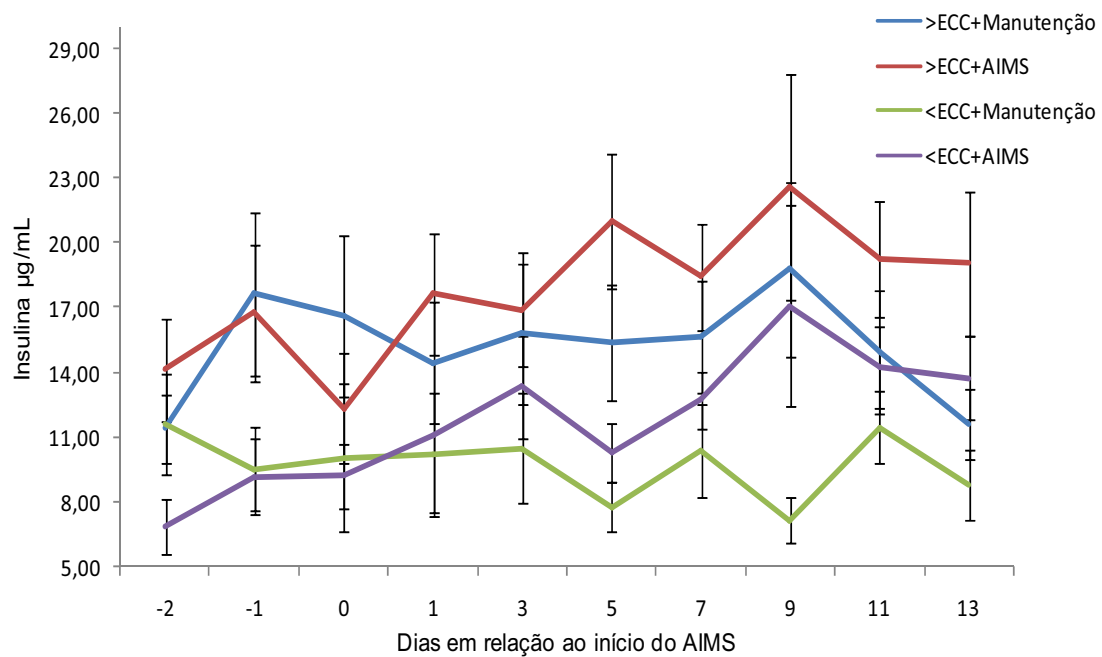


Figura 5. Concentração (média $\pm$ EPM) de insulina nos dias -2, -1, 0, 1, 3, 5, 7, 11 e 13 em relação ao início da AIMS, nos animais com maior ECC submetidos à AIMS (>ECC + AIMS; n = 19) e à Manutenção (>ECC + Manutenção; n = 19) e dos animais com menor ECC submetidos à AIMS (<ECC + AIMS, n = 17) e à Manutenção (<ECC + Manutenção; n = 17). Não houve efeito de interação entre dieta e ECC ($P > 0,05$).

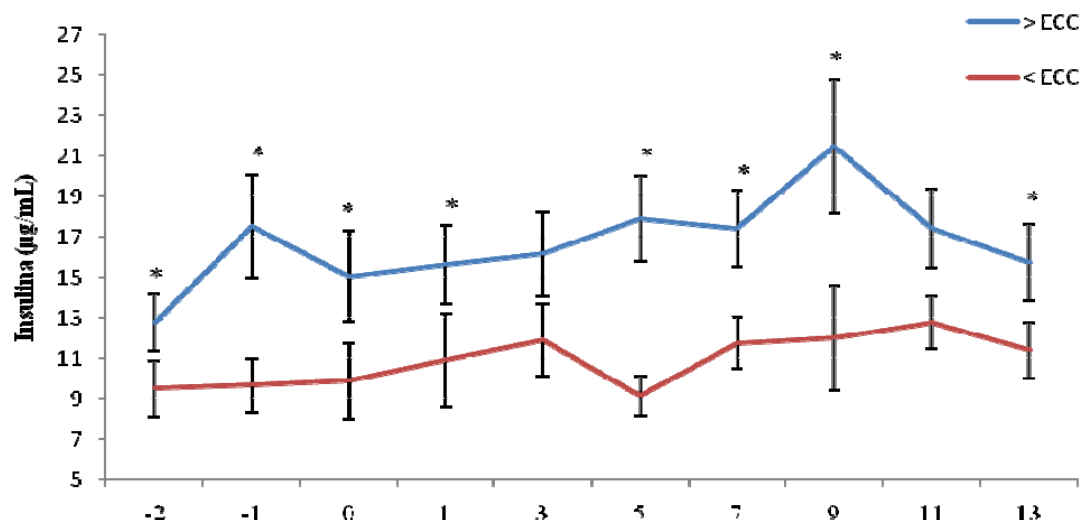


Figura 6. Concentração (média $\pm$ EPM) de insulina nos dias -2, -1, 0, 1, 3, 5, 7, 11 e 13 em relação ao início da AIMS, nos animais com maior ($n = 38$) e menor ($n = 34$) ECC, independente da dieta a que estavam submetidos. Houve efeito do ECC, os animais com elevado ECC apresentaram maiores concentrações de insulina nos dias -2, -1, 0, 1, 5, 7, 9 e 13 quando comparados aos animais com baixo ECC (* $P < 0,05$).

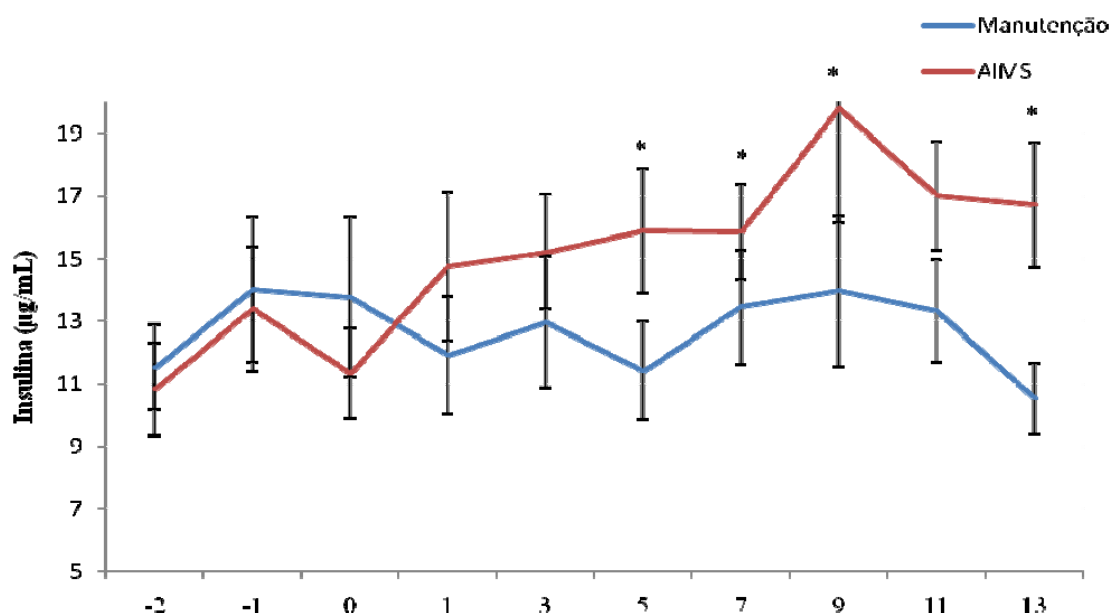


Figura 7. Concentração (média $\pm$ EPM) de insulina nos dias -2, -1, 0, 1, 3, 5, 7, 11 e 13 em relação ao início da AIMS, nos animais que estavam submetidos (n = 36) ou não (n = 36) à AIMS, independente do ECC. Houve efeito da dieta, os animais que estavam submetidos à AIMS apresentaram maiores concentrações de insulina nos dias 5, 7, 9 e 13 quando comparados aos animais que permaneceram com dieta de Manutenção durante todo o período experimental (*P < 0,05).

Não houve efeito de interação entre ECC e dieta nas concentrações de IGF-I ($P > 0,05$), em nenhuns dos dias analisados (Tabela 13 e Figura 8). Entretanto, para as concentrações séricas de IGF-I nos dias 0, 7 e 13 em relação ao início do fornecimento da AIMS, foi encontrado efeito do ECC apenas no dia 13 do fornecimento da AIMS ($P < 0,05$). Os animais com menor ECC apresentaram maiores concentrações séricas de IGF-I no dia 13, em relação aos animais com maior ECC (Figura 9). Não houve efeito da dieta nas concentrações séricas de IGF-I (Figura 10; $P > 0,05$).

Tabela 13. Concentração (média $\pm$ EPM) de IGF-I (ng/mL), nos dias 0, 7 e 13 em relação ao início da AIMS, nos animais com maior ECC submetidos à AIMS ($>$ ECC + AIMS; $n = 19$) e à Manutenção ($>$ ECC + Manutenção; $n = 19$) e nos animais com menor ECC submetidos à AIMS ($<$ ECC + AIMS, $n = 17$) e à Manutenção ($<$ ECC + Manutenção; $n = 17$) ($P > 0,05$).

	<ECC + Manutenção	<ECC+AIMS	>ECC + Manutenção	>ECC+AIMS
0	341,9 $\pm$ 30,6	313,8 $\pm$ 35,5	280,3 $\pm$ 18,1	288,0 $\pm$ 21,4
7	301,4 $\pm$ 28,2	247,3 $\pm$ 20,1	254,0 $\pm$ 22,2	229,0 $\pm$ 21,2
13	351,2 $\pm$ 26,8	329,8 $\pm$ 23,3	290,2 $\pm$ 27,7	267,4 $\pm$ 21,5

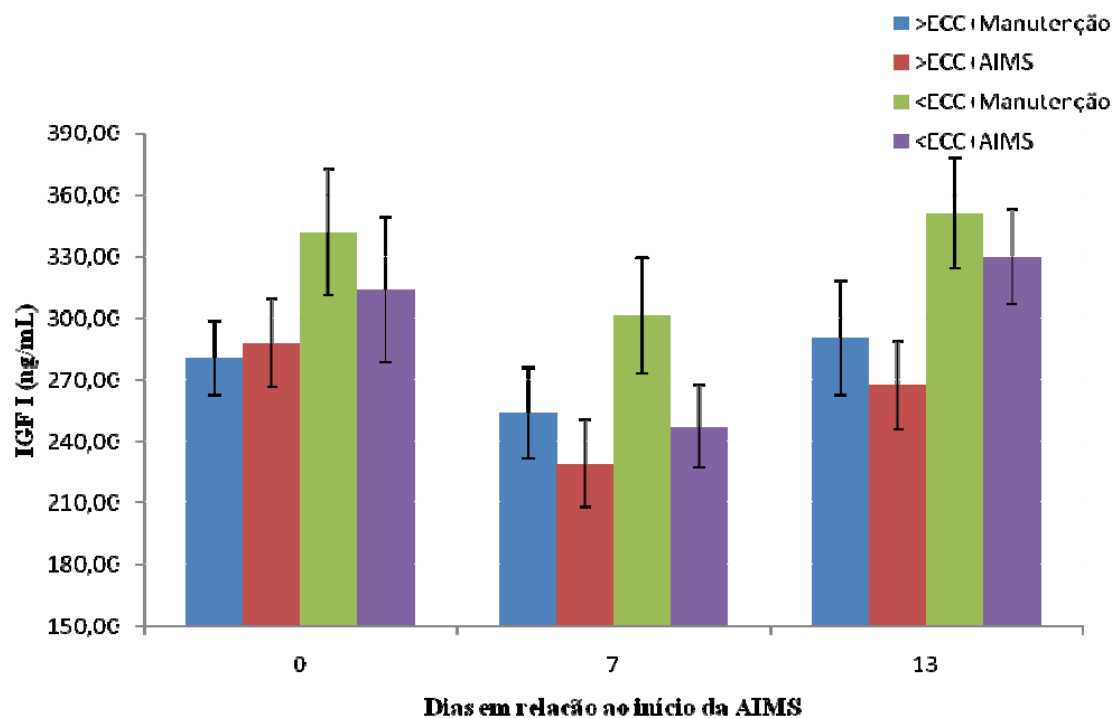


Figura 8. Concentração (média $\pm$ EPM) de IGF-I, nos dias 0, 7 e 13 em relação ao início da AIMS, nos animais com maior ECC submetidos à AIMS (>ECC + AIMS; n = 19) e à Manutenção (>ECC + Manutenção; n = 19) e dos animais com menor ECC submetidos à AIMS (<ECC + AIMS, n = 17) e à Manutenção (<ECC + Manutenção; n = 17). Não houve efeito de interação ($P > 0,05$).

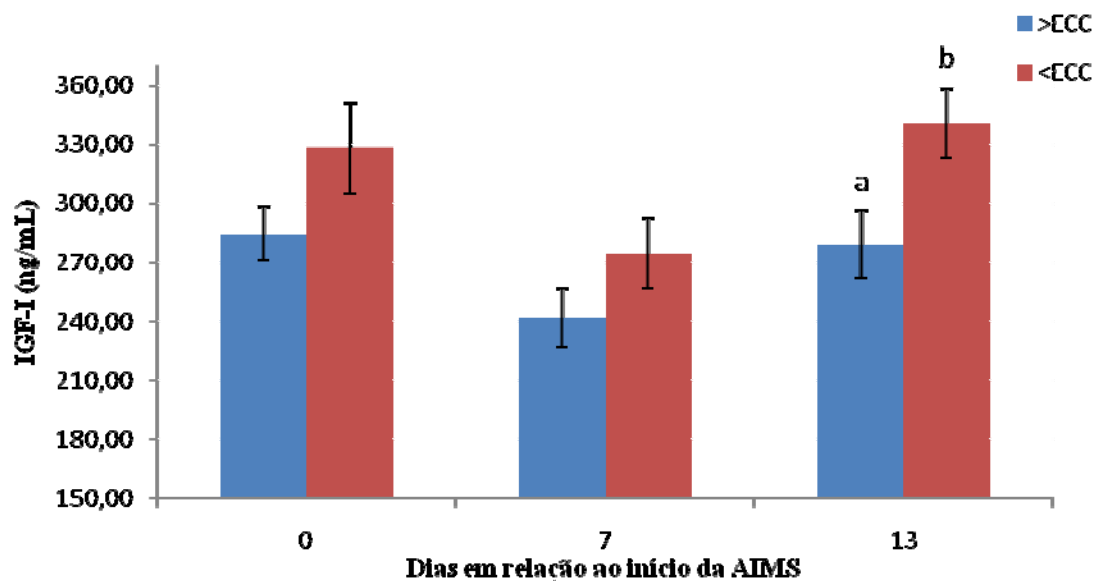


Figura 9. Concentração (média $\pm$ EPM) de IGF-I, nos dias 0, 7 e 13 em relação ao início da AIMS, nos animais com maior ($n = 38$) ou menor ($n = 34$) ECC, independentes da dieta a que estavam submetidos. Houve efeito do ECC, os animais com maior ECC apresentaram maiores concentrações de IGF-I no dia 13 quando comparados aos animais com menor ECC ($^{a,b}P < 0,05$).

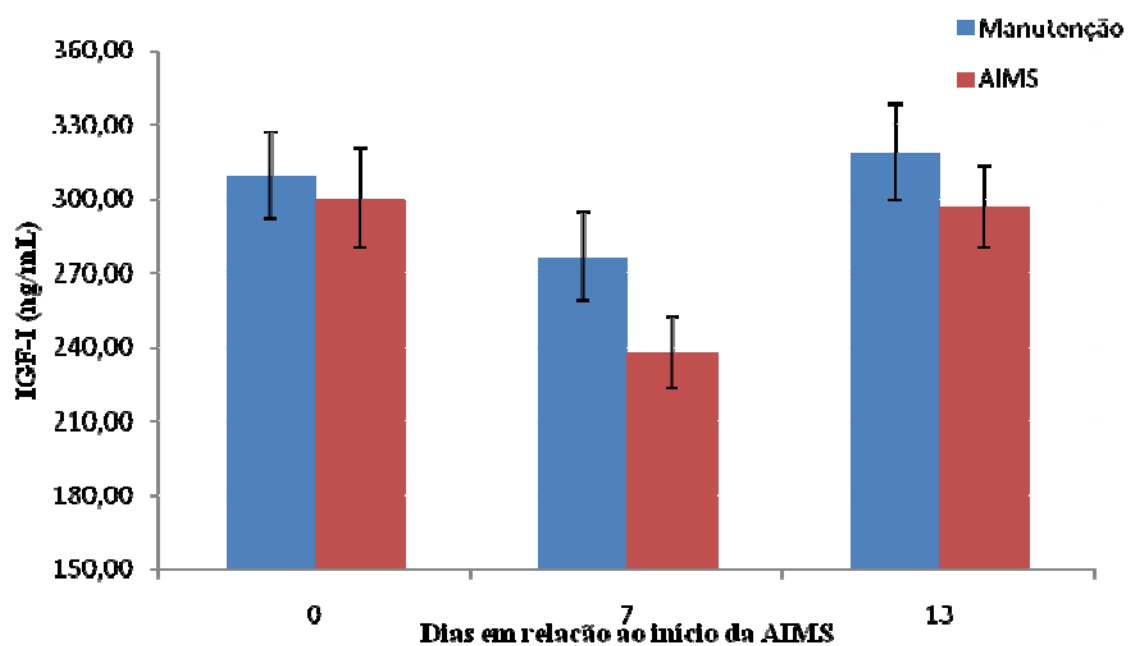


Figura 10. Concentração (média $\pm$ EPM) de IGF-I, nos dias 0, 7 e 13 em relação ao início da AIMS, nos animais que estavam submetidos ($n = 36$) ou não ($n = 36$) à AIMS, independente do ECC. Não houve efeito da dieta ($P > 0,05$).

5.4. Desenvolvimento *in vitro* dos embriões após o descongelamento – Taxa de eclosão

Não foi encontrado efeito de interação entre dieta e ECC sobre a taxa de eclosão dos embriões em nenhuma das avaliações realizadas durante o cultivo *in vitro* (Tabela 14 e Figura 11) ($P > 0,05$). Os embriões produzidos pelo grupo de animais com maior ECC, independente da dieta a qual estavam submetidos, apresentaram as maiores taxas de eclosão nas avaliações realizadas às 36, 48, 60, 72, 84 e 96 horas (Tabela 14 e Figura 12) ($P < 0,05$). Efeito de dieta foi observado apenas na avaliação realizada ao final das 96 horas do cultivo *in vitro*. Os embriões produzidos por animais submetidos à dieta de AIMS apresentaram maior taxa de eclosão às 96 horas (Tabela 14 e Figura 13) ($P < 0,05$).

Tabela 14. Taxas de eclosão (%) dos embriões com 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 horas de cultivo pós descongelação, com respectivas médias, coeficiente de variação (CV) e probabilidades, produzidos por animais com maior ECC submetidos à AIMS (>ECC + AIMS) e à Manutenção (>ECC + M) e por animais com menor ECC submetidos à AIMS (<ECC + AIMS) e à Manutenção (<ECC + M).

	>ECC		<ECC		Média	CV (%)	P		
	M	AIMS	M	AIMS			ECC	DIETA	D*E CC
12h	0	0	0	5,3	1,2	919,2	0,08	0,08	0,08
24h	13,9	18,2	3,8	13,2	11,8	274,7	0,19	0,33	0,39
36h	19,4	25	5,8	13,2	15,3	236	0,023	0,47	0,49
48h	33,3	43,2	17,3	21,1	28,2	159,9	0,004	0,59	0,79
60h	47,2	59,1	30,8	36,8	42,9	115,6	0,005	0,47	0,65
72h	47,2	70,5	30,8	39,5	46,5	107,6	0,0008	0,097	0,96
84h	52,8	72,7	34,6	47,4	51,2	98	0,005	0,086	0,78
96h	52,8	81,8	38,5	50	55,3	90,2	0,0014	0,013	0,61

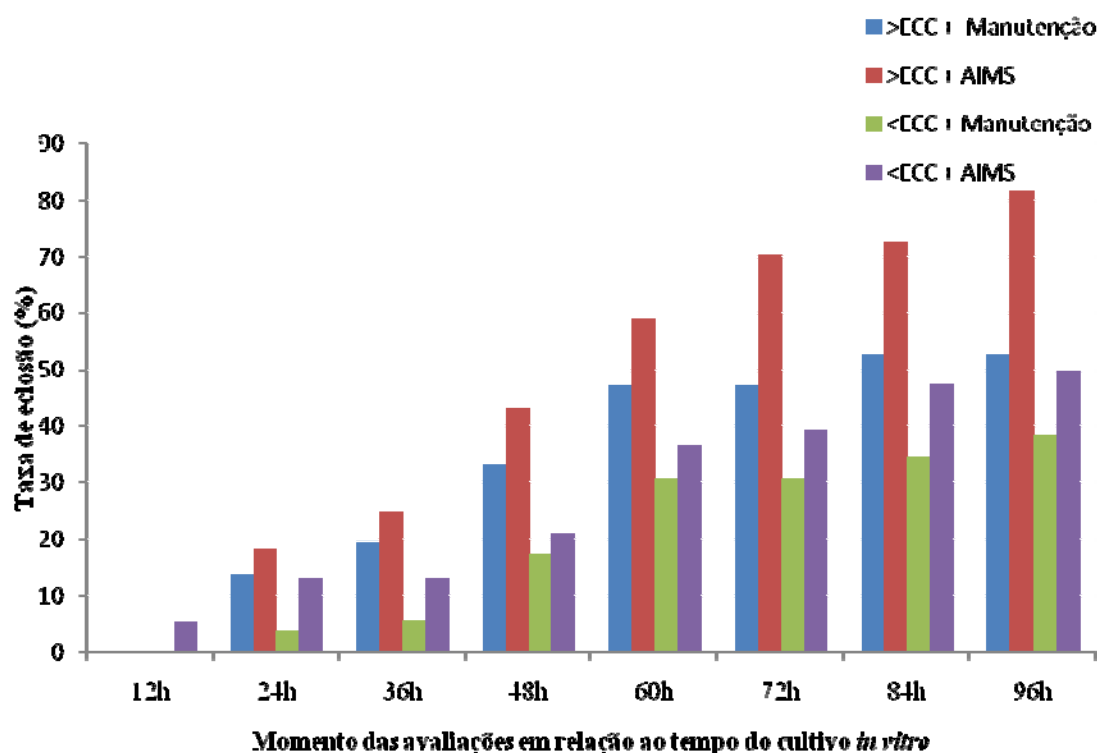


Figura 11. Taxa de eclosão (%) dos embriões após a descongelação, avaliada às 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 horas após o início do cultivo *in vitro*, entre os tratamentos: maior ECC submetido à Manutenção (>ECC + Manutenção) e à AIMS (>ECC + AIMS) e menor ECC submetido à Manutenção (<ECC + Manutenção) e à AIMS (<ECC + AIMS). Não houve efeito de interação entre dieta e ECC sobre a taxa de eclosão dos embriões ($P > 0,05$).

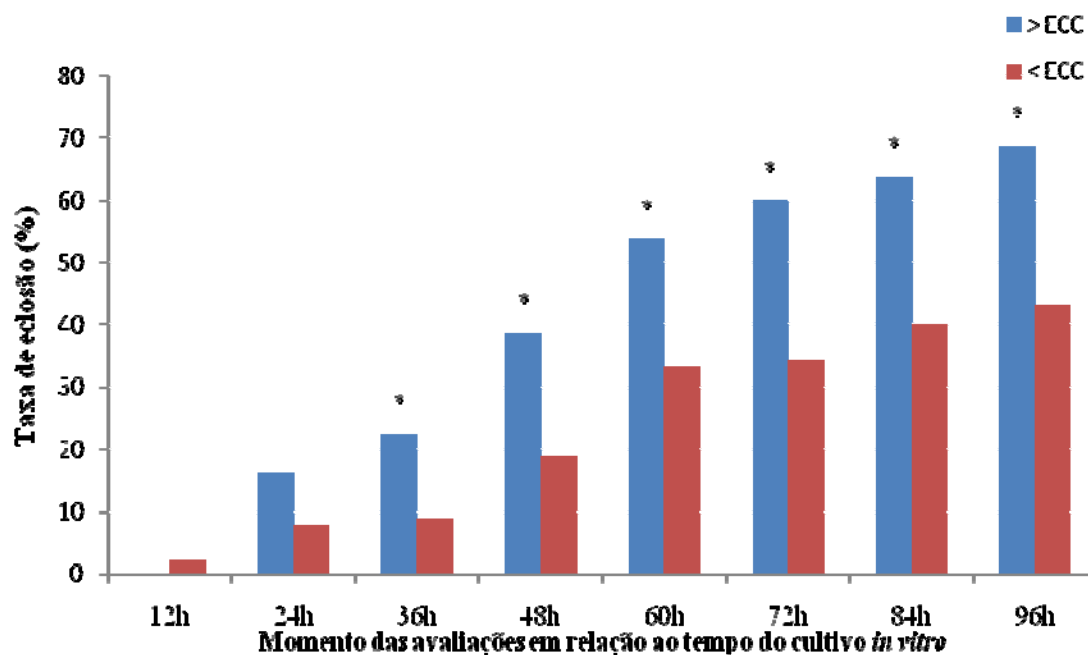


Figura 12. Taxa de eclosão (%) dos embriões após a descongelação, avaliada às 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 horas após o início do cultivo *in vitro* pós descongelação, comparando embriões produzidos por animais com maior ECC (>ECC) ou menor ECC (<ECC), independente da dieta. A taxa de eclosão foi maior nos embriões provenientes do grupo com maior ECC em relação à dos embriões produzidos pelo grupo com menor ECC (* $P < 0,05$).

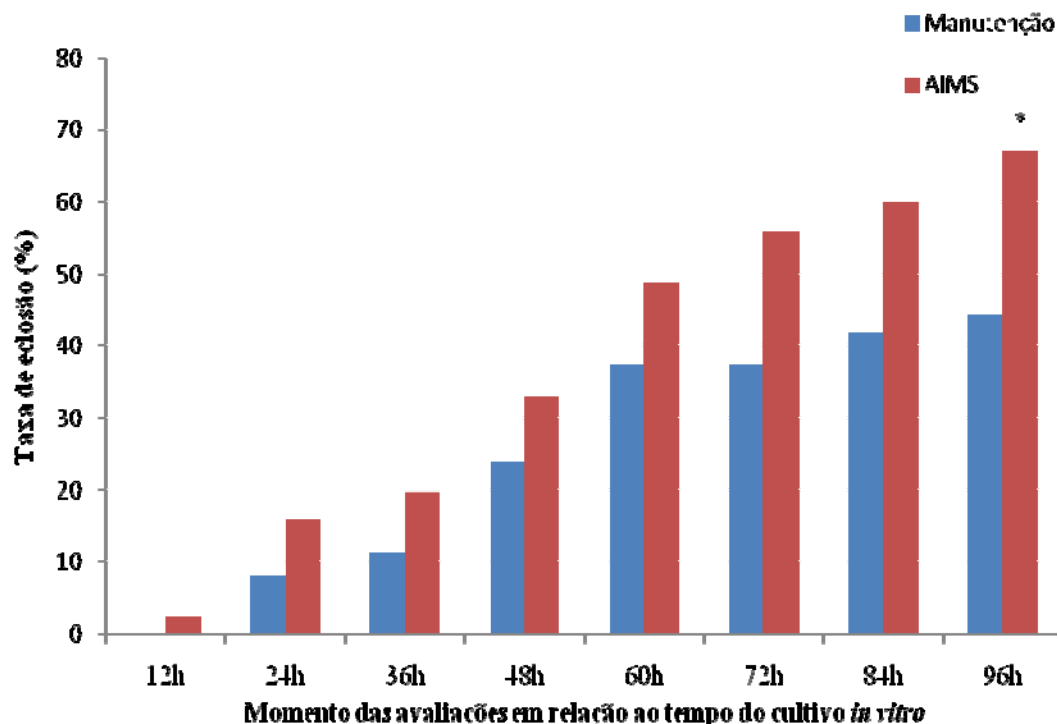


Figura 13. Taxa de eclosão (%) dos embriões após a descongelação, avaliada às 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 horas após o início do cultivo *in vitro*, comparando os embriões provenientes de animais submetidos ou não à AIMS, independente do ECC. A taxa de eclosão dos embriões provenientes dos animais que estavam recebendo AIMS foi maior em relação à dos provenientes dos animais que estavam recebendo Manutenção apenas na avaliação realizada ao final das 96 horas de cultivo *in vitro* (* $P < 0,05$).

5.5. Diâmetro dos embriões durante o cultivo *in vitro*

A Tabela 15 mostra o resultado do diâmetro médio (média $\pm$ EPM) dos embriões, produzidos por animais com maior ou menor ECC, submetidos ou não à AIMS, durante cultivo *in vitro* por até 96 horas após a descongelação. Houve efeito do ECC no tamanho dos embriões ($P < 0,05$). Embriões produzidos por animais com maior ECC foram maiores que os produzidos por animais com menor ECC (Figura 14 e 15). Não houve efeito da dieta das doadoras no tamanho dos embriões (Figura 16) ($P > 0,05$).

Tabela 15. Diâmetro dos embriões viáveis (μm), produzidos por animais com maior ECC submetidos à AIMS (>ECC + AIMS) e à Manutenção (>ECC + M) e por animais com menor ECC submetidos à AIMS (<ECC + AIMS) e à Manutenção (<ECC + M), nas horas 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 do cultivo *in vitro* após a descongelação (média $\pm$ EPM).

	>ECC + Manutenção	>ECC+AIMS	<ECC + Manutenção	<ECC+AIMS	P
24 h	172,6 $\pm$ 3,2 ^a (n = 23)	166,6 $\pm$ 5,0 ^a (n = 32)	163,5 $\pm$ 2,6 ^a (n = 46)	164,4 $\pm$ 3,2 ^a (n = 35)	0,35
36 h	188,3 $\pm$ 7,9 ^a (n = 23)	173,1 $\pm$ 6,7 ^{ab} (n = 32)	165,4 $\pm$ 2,8 ^b (n = 30)	170,1 $\pm$ 4,5 ^{ab} (n = 33)	0,02
48 h	210,5 $\pm$ 9,2 ^a (n = 16)	190,2 $\pm$ 8,5 ^{ac} (n = 23)	149,3 $\pm$ 6,2 ^b (n = 23)	159,5 $\pm$ 6,2 ^c (n = 24)	<0,01
60 h	205,0 $\pm$ 11,7 ^a (n = 16)	211,5 $\pm$ 10,6 ^a (n = 20)	193,6 $\pm$ 9,0 ^a (n = 18)	189,7 $\pm$ 7,4 ^a (n = 23)	0,49
72 h	177,0 $\pm$ 7,1 ^a (n = 11)	196,4 $\pm$ 11,4 ^a (n = 16)	205,7 $\pm$ 10,5 ^a (n = 18)	194,2 $\pm$ 5,6 ^a (n = 22)	0,25
84 h	176,2 $\pm$ 9,9 ^{ab} (n = 9)	184,2 $\pm$ 9,7 ^{ab} (n = 6)	185,5 $\pm$ 11,6 ^a (n = 17)	148,4 $\pm$ 6,4 ^b (n = 20)	0,01
96 h	169,4 $\pm$ 10,5 ^{ab} (n = 9)	202,8 $\pm$ 13,1 ^a (n = 6)	152,4 $\pm$ 10,0 ^b (n = 11)	156,5 $\pm$ 5,8 ^{ab} (n = 15)	<0,01

a,b,c P < 0,05

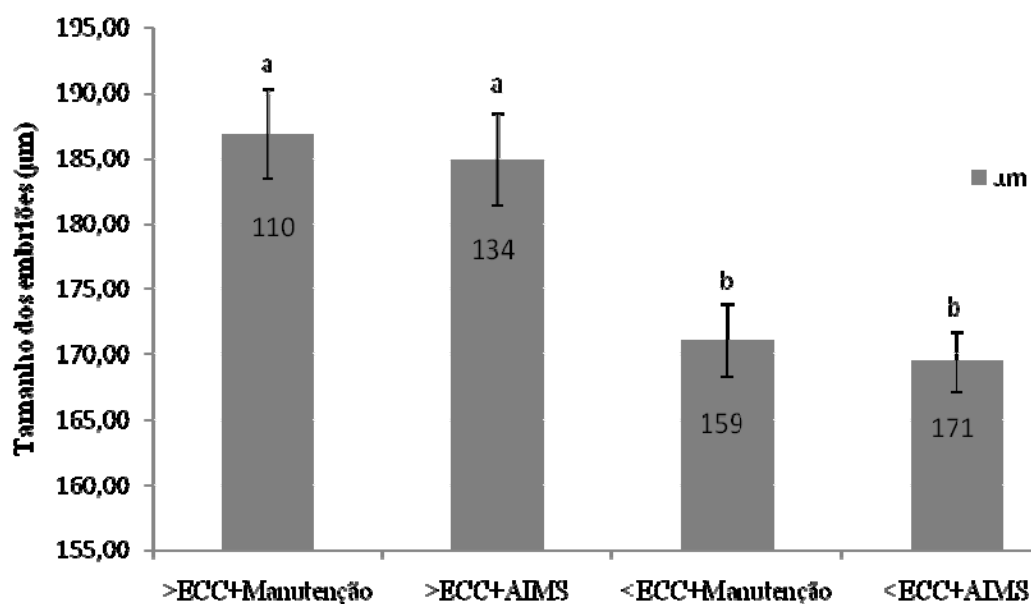


Figura 14. Diâmetro médio (μm) dos embriões viáveis produzidos por animais com maior ou menor ECC submetidos ou não à AIMS, durante todo o período de cultivo *in vitro* (mensurações realizadas com 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 horas) após a descongelação (média $\pm$ EPM) ($P = 0,0001$).

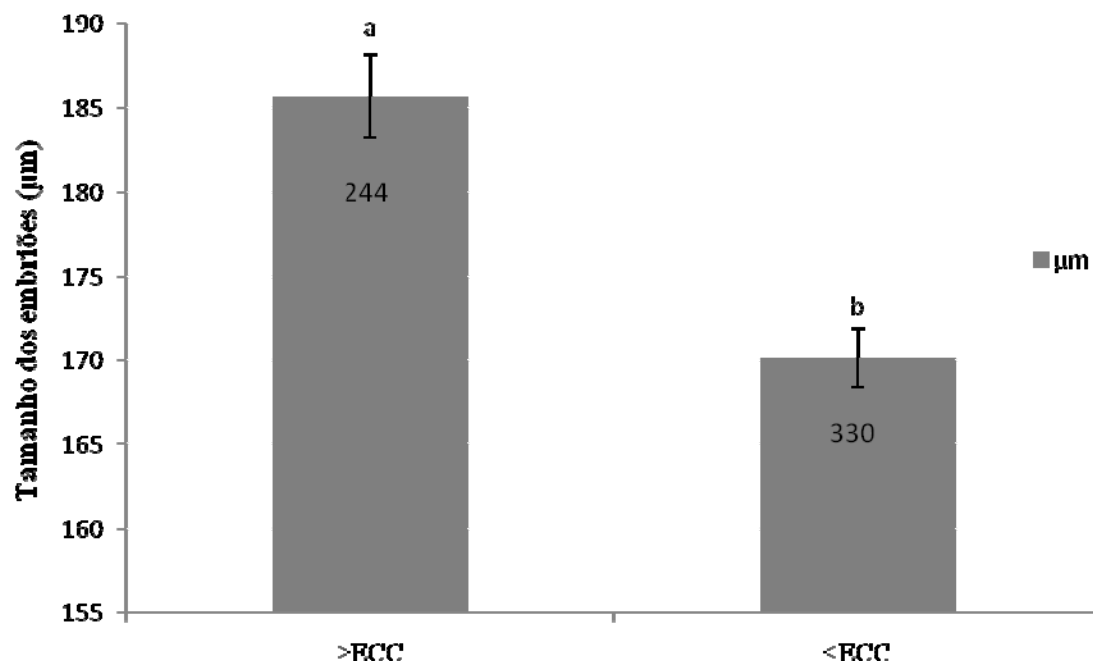


Figura 15. Diâmetro médio (μm) dos embriões viáveis produzidos por animais com maior ou menor ECC, independente da dieta, durante todo o período de cultivo *in vitro* (mensurações realizadas com 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 horas) após a descongelação (média $\pm$ EPM) ($P = 0,0001$).

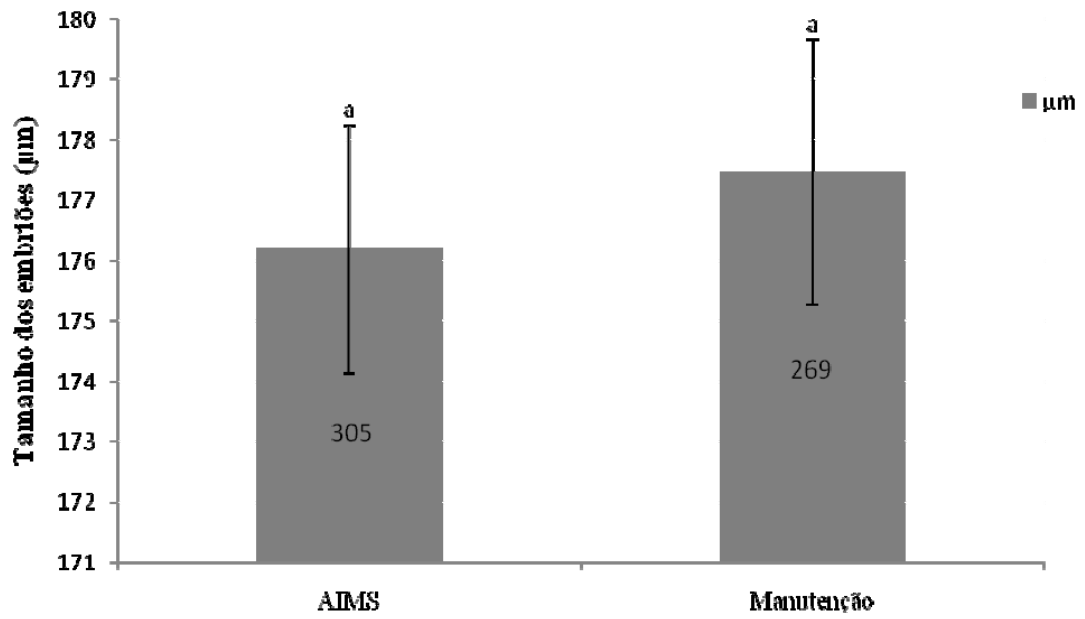


Figura 16. Diâmetro médio (μm) dos embriões viáveis produzidos por animais submetidos ou não a AIMS, independente do ECC, durante todo o período de cultivo *in vitro* (mensurações realizadas com 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 horas) após a descongelação (média $\pm$ EPM) ($P = 0,654$).

5.6. Expressão gênica dos embriões

A figura 17 mostra alguns amplicons dos genes avaliados nos embriões eclodidos durante cultivo *in vitro* pós-descongelação. Houve efeito do ECC apenas para o gene BAX. Os embriões produzidos por animais com maior ECC apresentaram maior expressão relativa do gene BAX (Figura 18) quando comparados aos produzidos por animais com menor ECC ($P = 0,0257$). Houve efeito da dieta apenas para o gene INTERFERON- τ . Os embriões que foram produzidos por animais que receberam AIMS por 14 dias previamente à SOV, apresentaram maior expressão relativa do gene INTERFERON- τ (Figura 19) quando comparados aos produzidos por animais que permaneceram sob dieta de manutenção durante todo o período experimental ($P = 0,0236$). Não houve efeito da dieta, do ECC e da interação dieta e ECC para os demais genes avaliados (Figuras 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 e 35) ($P > 0,05$).

A expressão global (quantidade média de mRNA total para cada tratamento) de todos os genes avaliados foi analisada e está apresentada na Figura 36. Não houve diferença na expressão global entre os quatro tratamentos experimentais ($P > 0,05$).

Na análise descritiva da expressão relativa de mRNA para os genes BAX e BCL-2, o gene BAX se mostrou mais expresso que o gene BCL-2 nos quatro tratamentos experimentais (maior ou menor ECC, submetido ou não à AIMS) (Figura 37).

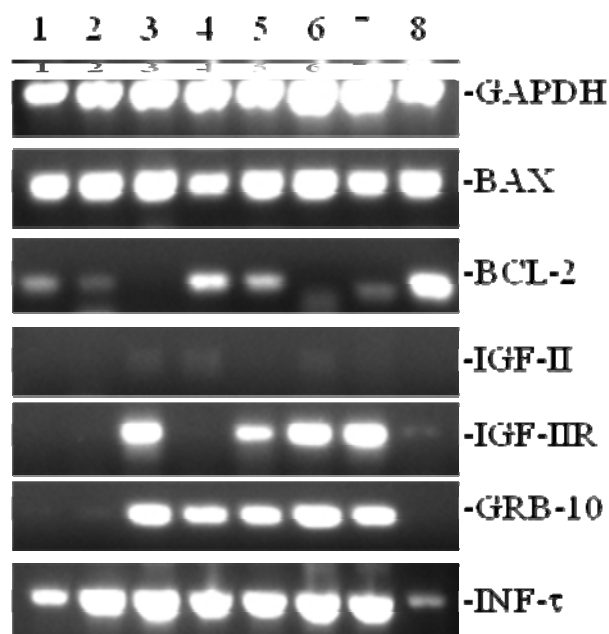


Figura 17. Gel de agarose 1,5% mostrando os produtos amplificados pela RT-PCR, para os genes GAPDH, BAX, BCL-2, IGF-II, IGF-IIR, GRB-10, INF τ em embriões eclodidos em cultivo *in vitro* pós-descongelção produzidos por novilhas com maior ou menor ECC, submetidas ou não a AIMS. 1 e 2 = Embriões eclodidos do grupo >ECC + AIMS (n = 16); 3 e 4 = Embriões eclodidos do grupo >ECC + Manutenção (n = 16); 5 e 6 = Embriões eclodidos do grupo <ECC + AIMS (n = 16); 7 e 8 = Embriões eclodidos do grupo <ECC + Manutenção (n = 14).

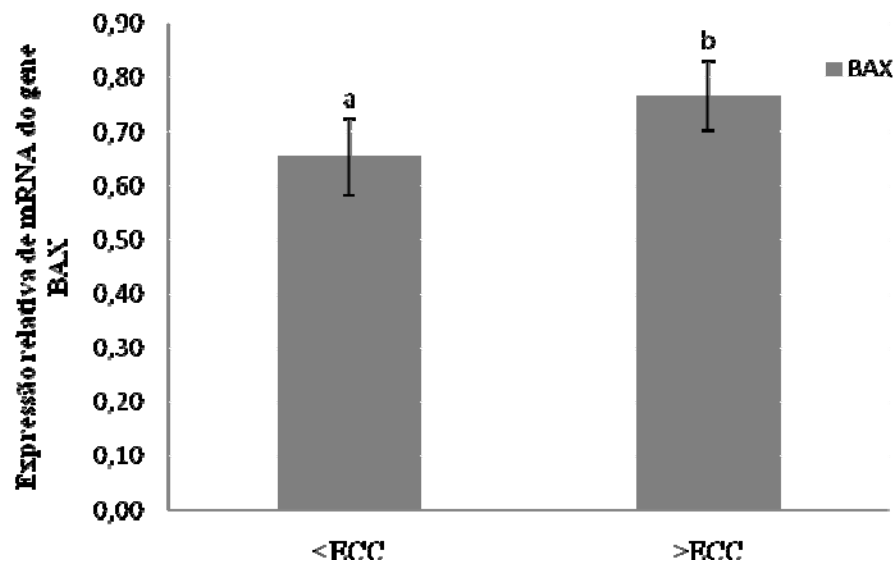


Figura 18. Expressão relativa (média $\pm$ EPM) de mRNA para o gene BAX em embriões eclodidos em cultivo *in vitro* pós-descongelção de novilhas com maior ou menor ECC. ^{a,b}Diferença na expressão do gene BAX ($P = 0,0257$).

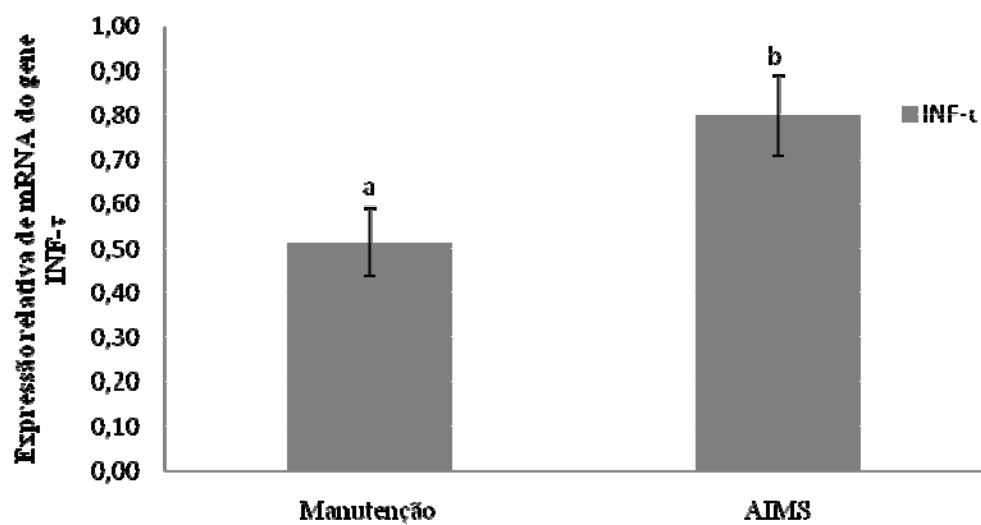


Figura 19. Expressão relativa (média $\pm$ EPM) de mRNA para o gene INF- τ em embriões eclodidos em cultivo *in vitro* pós descongelação de novilhas submetidas ou não a AIMS. ^{a,b}Diferença na expressão do gene INF- τ (P = 0,0236).

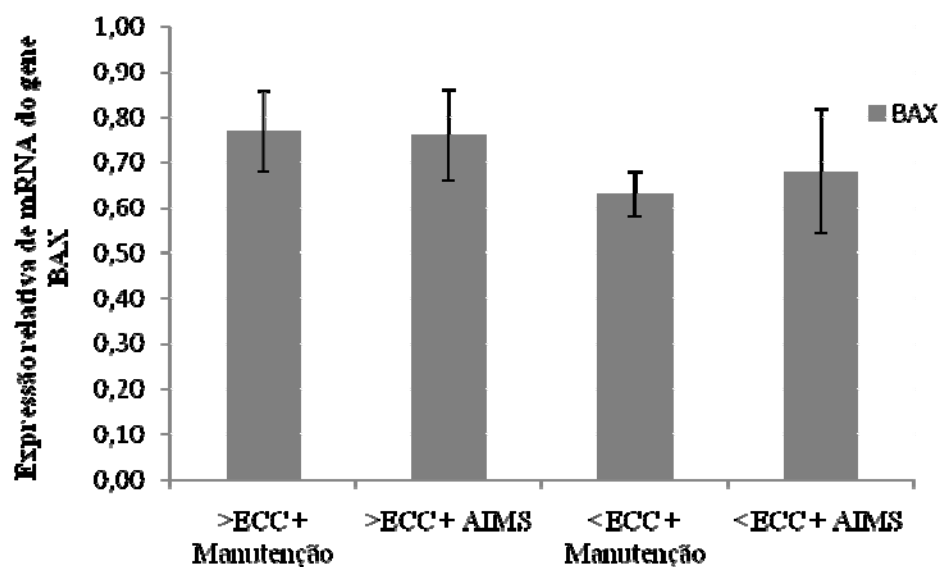


Figura 20. Expressão relativa (média $\pm$ EPM) de mRNA para o gene BAX em embriões eclodidos em cultivo *in vitro* pós-descongelamento de novilhas com maior ou menor ECC submetidas ou não a AIMS ($P > 0,05$).

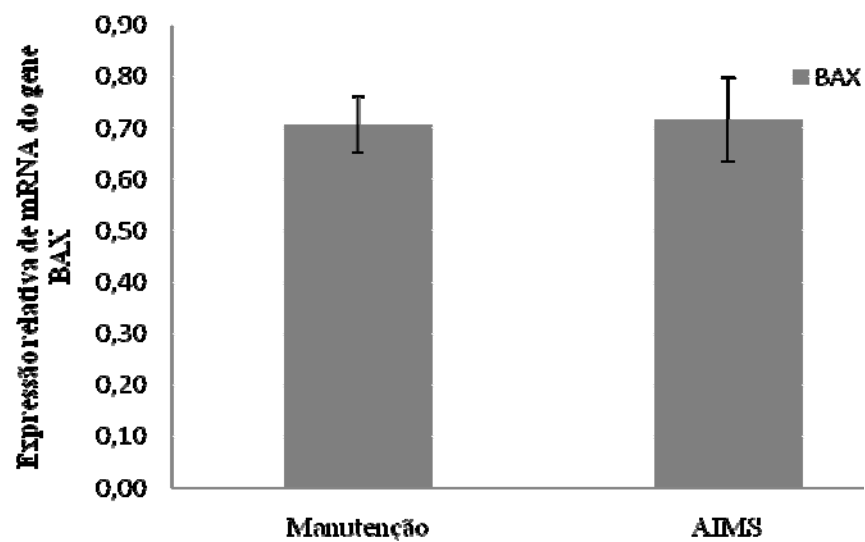


Figura 21. Expressão relativa (média $\pm$ EPM) de mRNA para o gene BAX em embriões eclodidos em cultivo *in vitro* pós-descongelção de novilhas submetidas ou não a AIMS ($P > 0,05$).

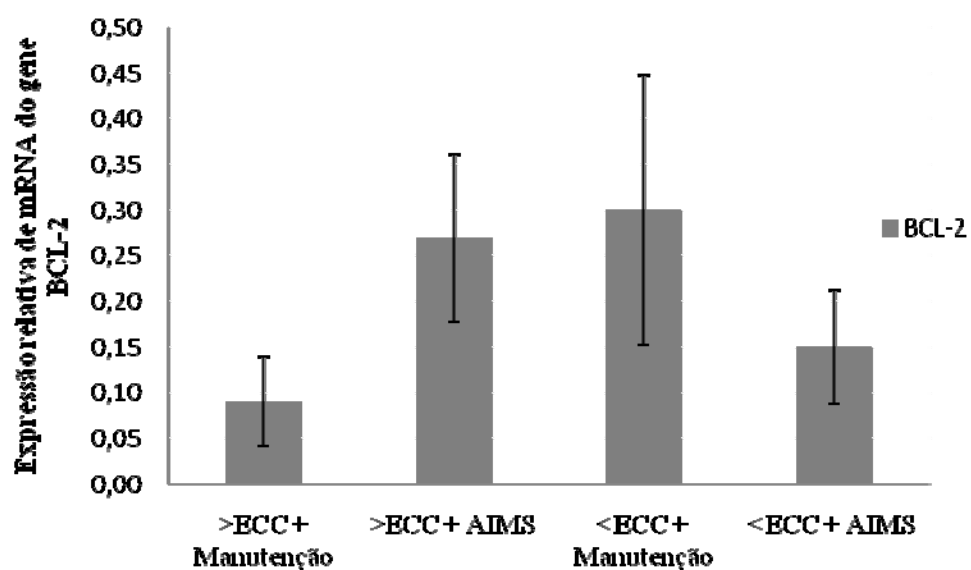


Figura 22. Expressão relativa (média $\pm$ EPM) de mRNA para o gene BCL-2 em embriões eclodidos em cultivo *in vitro* pós-descongelamento de novilhas com maior ou menor ECC submetidas ou não a AIMS ($P > 0,05$).

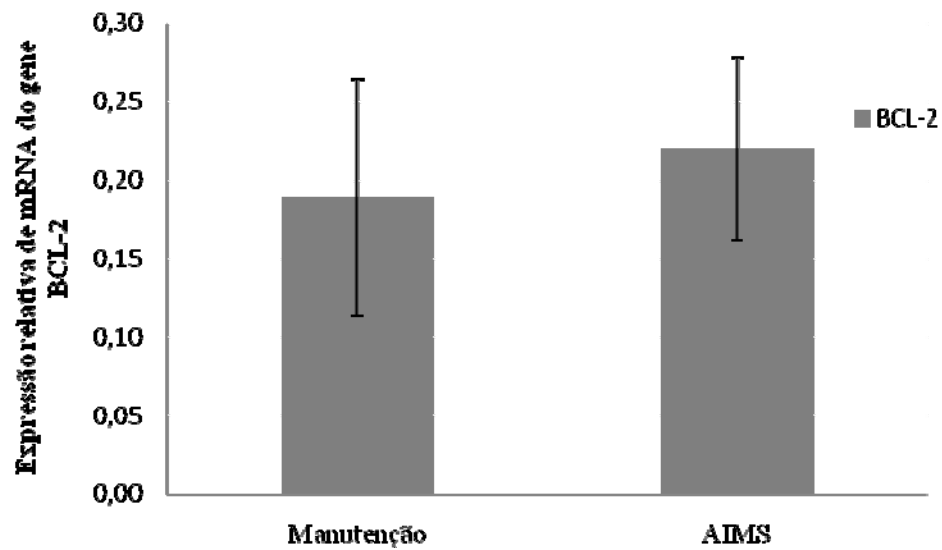


Figura 23. Expressão relativa (média $\pm$ EPM) de mRNA para o gene BCL-2 em embriões eclodidos em cultivo *in vitro* pós-descongelação de novilhas submetidas ou não a AIMS ($P > 0,05$).

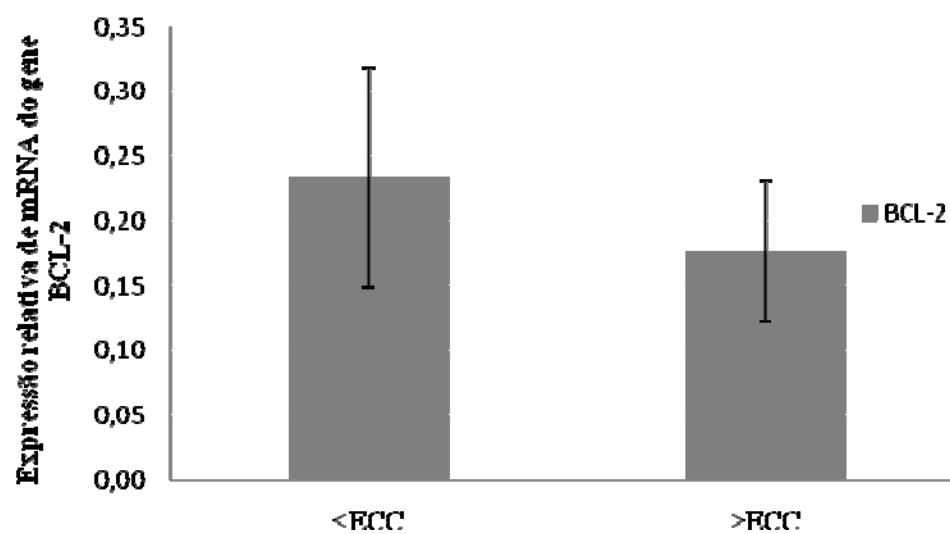


Figura 24. Expressão relativa (média $\pm$ EPM) de mRNA para o gene BCL-2 em embriões eclodidos em cultivo *in vitro* pós-descongelção de novilhas com maior ou menor ECC ($P > 0,05$).

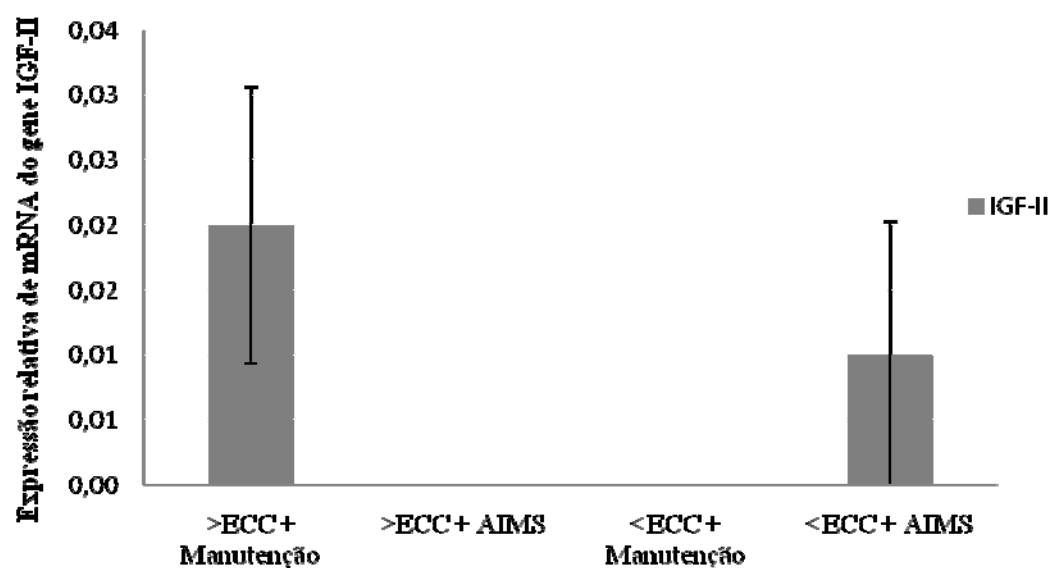


Figura 25. Expressão relativa (média $\pm$ EPM) de mRNA para o gene IGF-II em embriões eclodidos em cultivo *in vitro* pós-descongelamento de novilhas com maior ou menor ECC submetidas ou não a AIMS ($P > 0,05$).

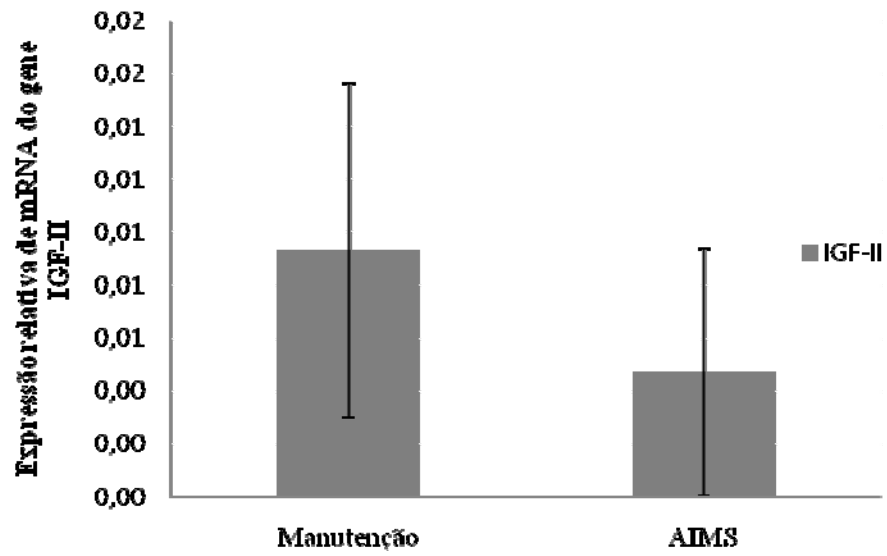


Figura 26. Expressão relativa (média $\pm$ EPM) de mRNA para o gene IGF-II em embriões eclodidos em cultivo *in vitro* pós-descongelação de novilhas submetidas ou não a AIMS ($P > 0,05$).

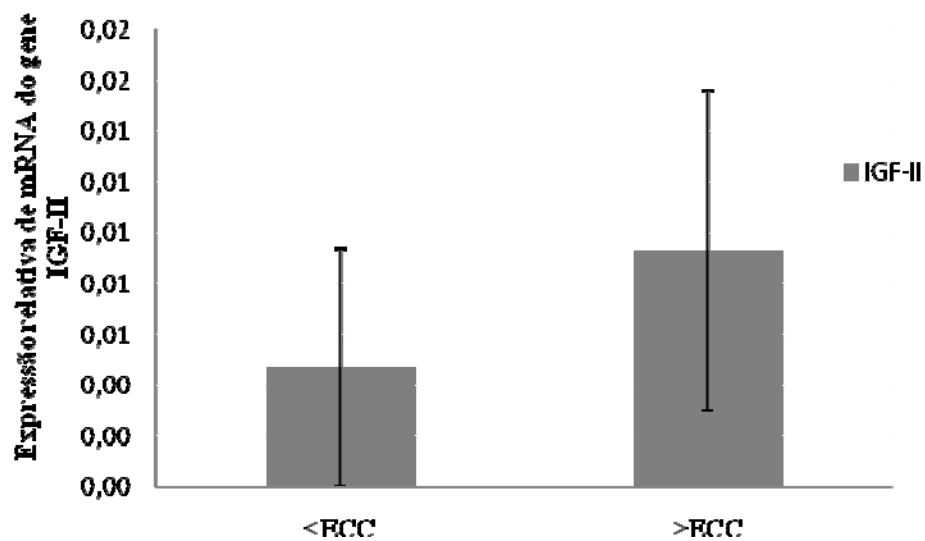


Figura 27. Expressão relativa (média $\pm$ EPM) de mRNA para o gene BCL-2 em embriões de novilhas com maior ou menor ECC ($P>0,05$).

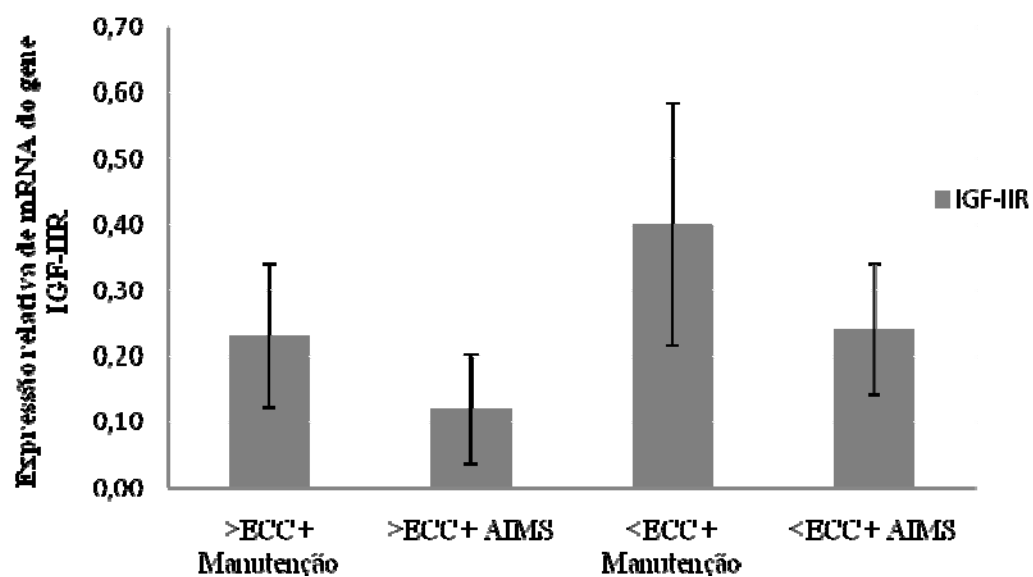


Figura 28. Expressão relativa (média $\pm$ EPM) de mRNA para o gene IGF-IIR em embriões eclodidos em cultivo *in vitro* pós-descongelamento de novilhas com maior ou menor ECC submetidas ou não a AIMS ($P > 0,05$).

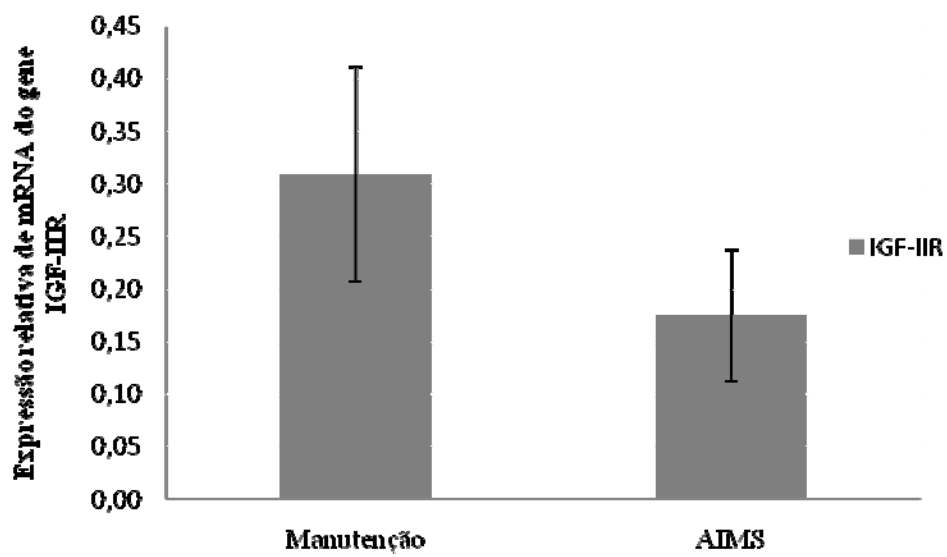


Figura 29. Expressão relativa (média $\pm$ EPM) de mRNA para o gene IGF-IIR em embriões eclodidos em cultivo *in vitro* pós-descongelamento de novilhas submetidas ou não a AIMS ($P>0,05$).

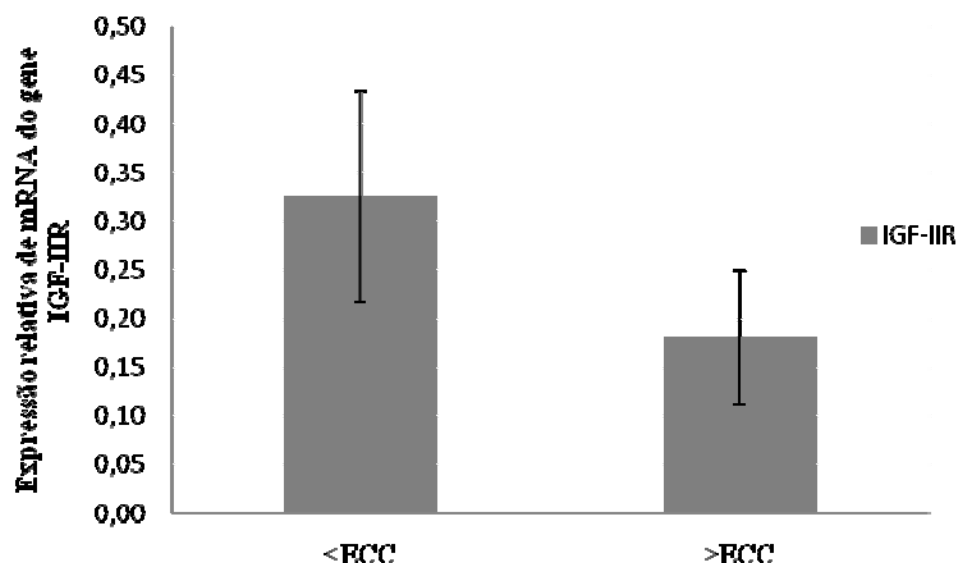


Figura 30. Expressão relativa (média $\pm$ EPM) de mRNA para o gene IGF-IIR em embriões eclodidos em cultivo *in vitro* pós-descongelamento de novilhas com maior ou menor ECC ($P > 0,05$).

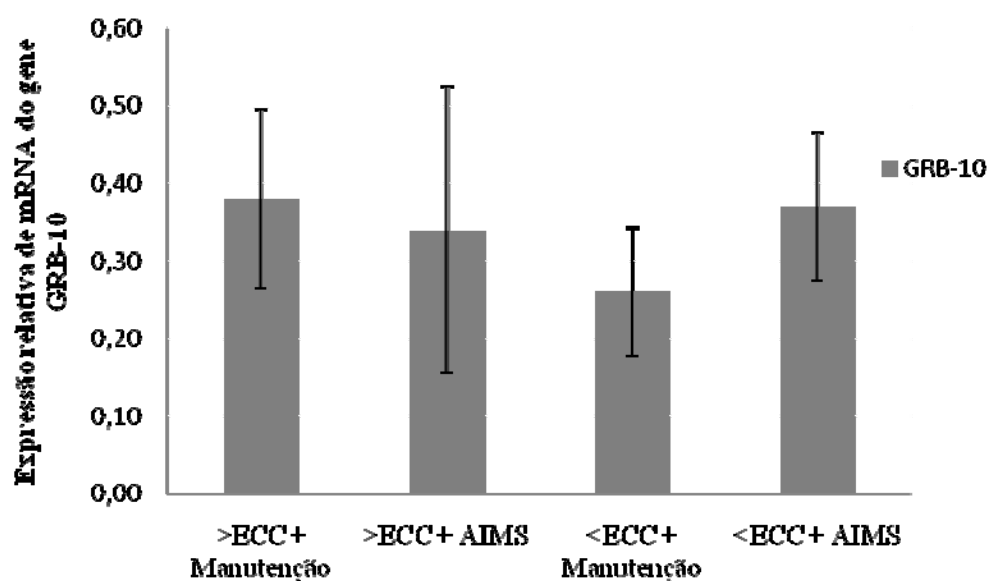


Figura 31. Expressão relativa (média $\pm$ EPM) de mRNA para o gene GRB-10 em embriões eclodidos em cultivo *in vitro* pós-descongelamento de novilhas com maior ou menor ECC submetidas ou não a AIMS ($P > 0,05$).

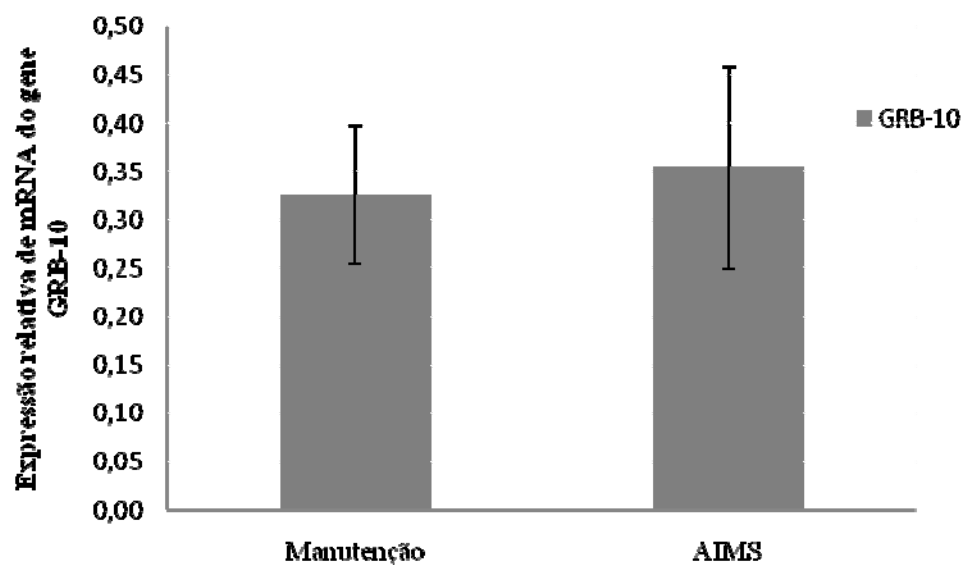


Figura 32. Expressão relativa (média $\pm$ EPM) de mRNA para o gene GRB-10 em embriões eclodidos em cultivo *in vitro* pós-descongelamento de novilhas submetidas ou não a AIMS ($P > 0,05$).

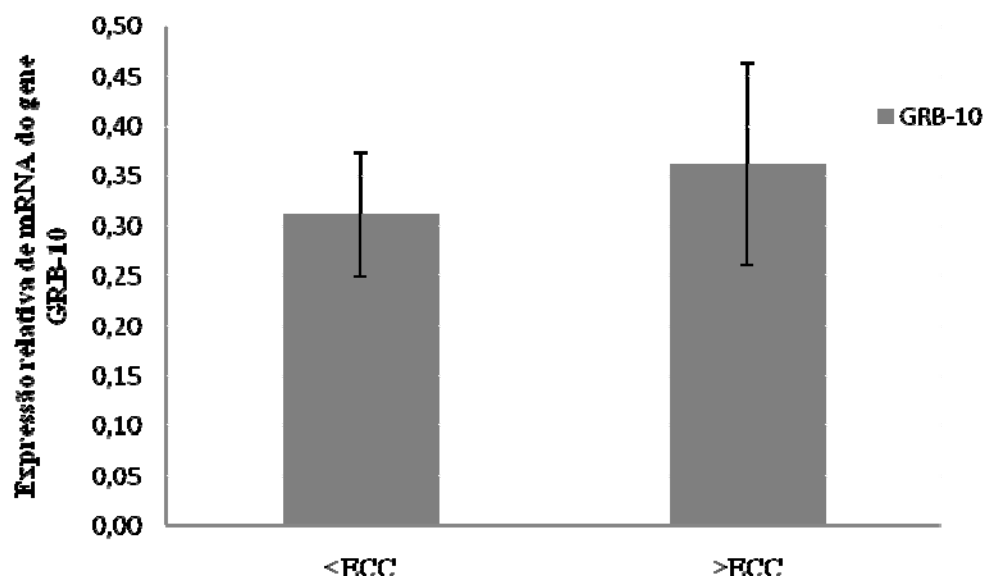


Figura 33. Expressão relativa (média $\pm$ EPM) de mRNA para o gene GRB-10 em embriões eclodidos em cultivo *in vitro* pós-descongelamento de novilhas com maior ou menor ECC ($P > 0,05$).

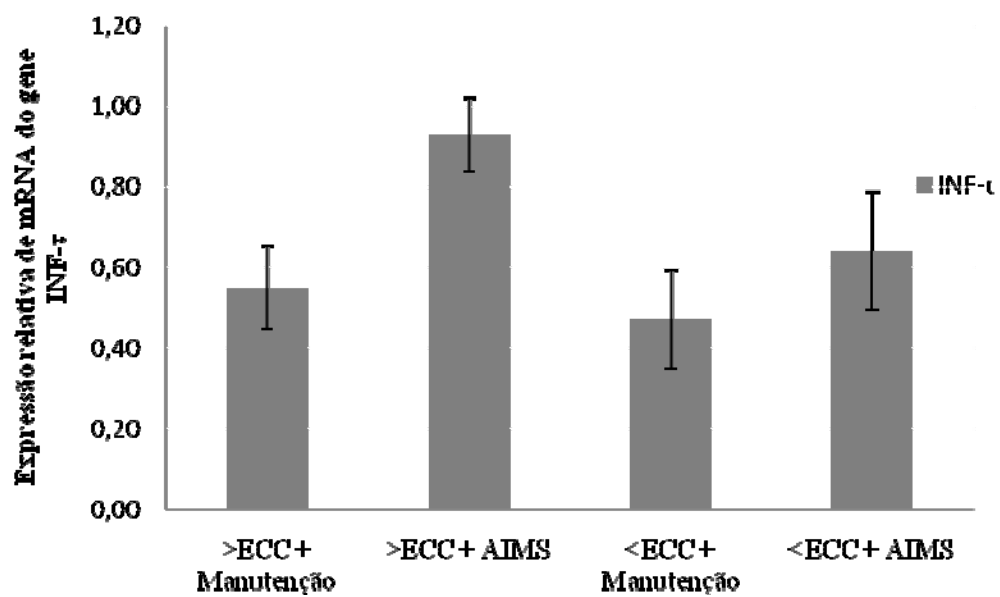


Figura 34. Expressão relativa (média $\pm$ EPM) de mRNA para o gene INF- τ em embriões eclodidos em cultivo *in vitro* pós-descongelação de novilhas com maior ou menor ECC submetidas ou não a AIMS ($P > 0,05$).

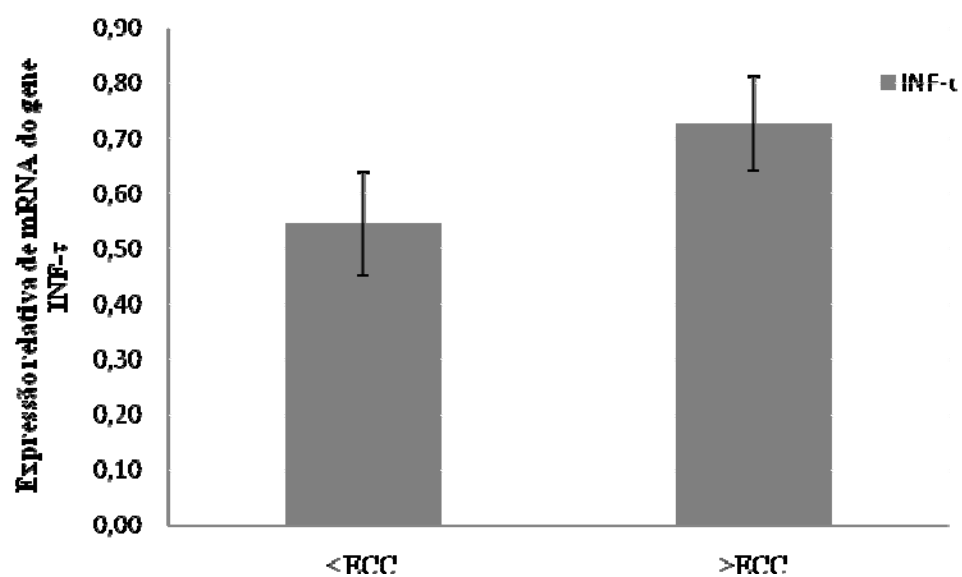


Figura 35. Expressão relativa (média $\pm$ EPM) de mRNA para o gene INF- τ em embriões eclodidos em cultivo *in vitro* pós-descongelamento de novilhas com maior ou menor ECC ($P > 0,05$).

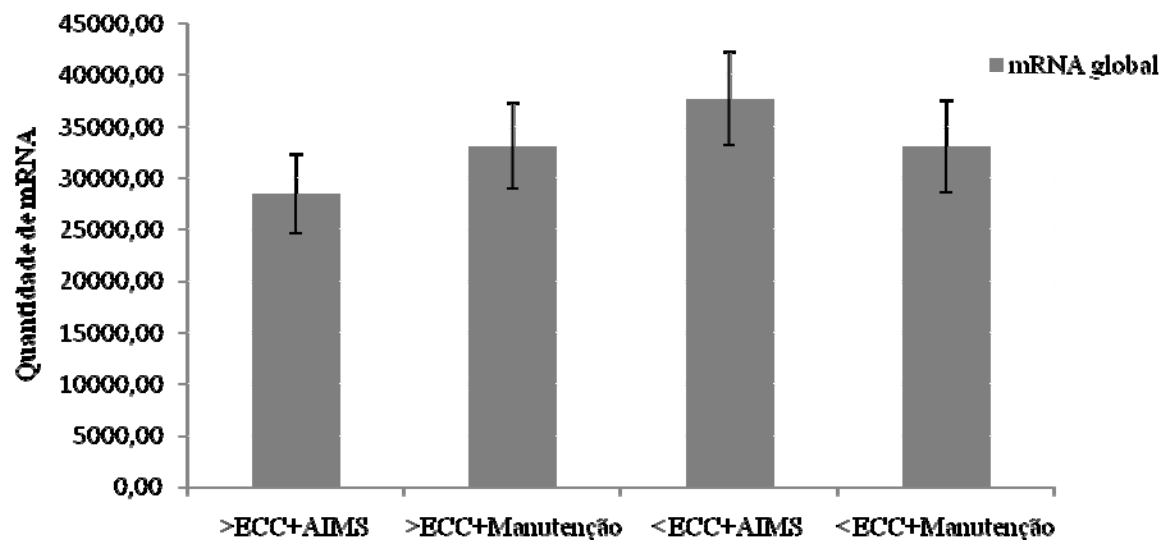


Figura 36. Quantificação (média $\pm$ EPM) para os genes agrupados (BAX, BCL-2, IGF-II, IGF-IIR, GRB-10 e $\text{INF}\tau$) em embriões eclodidos em cultivo *in vitro* pós descongelação de novilhas com $>$ ou $<$ ECC, submetidas ou não a AIMS. Não houve diferença entre os tratamentos ($P > 0,05$).

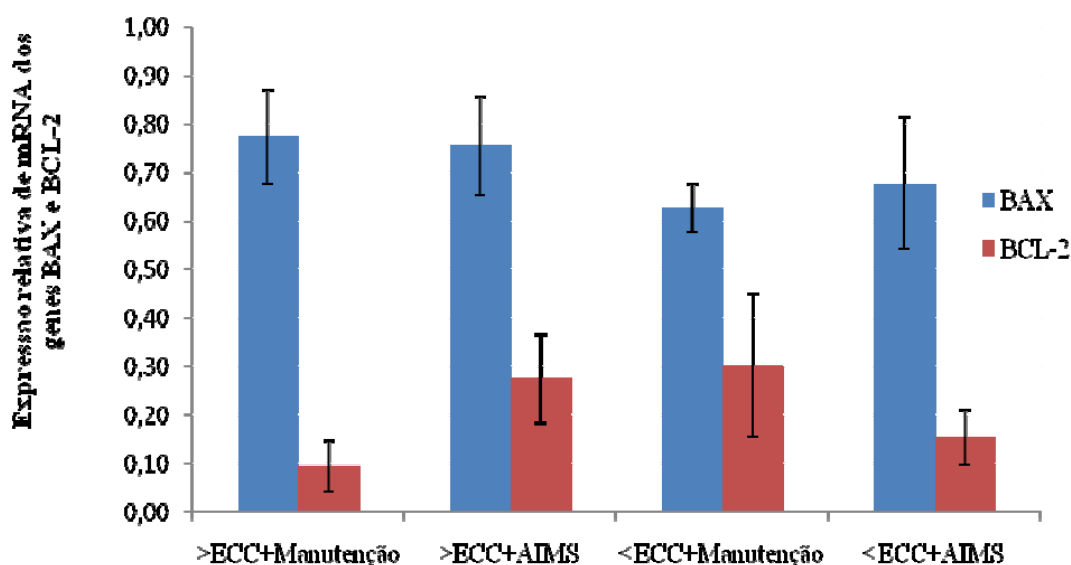


Figura 37. Análise descritiva comparando a expressão relativa de mRNA (média $\pm$ EPM) para os genes BAX e BCL-2 em embriões eclodidos em cultivo *in vitro* pós descongelação de novilhas com maior ou menor ECC, submetidas ou não a AIMS.

Foram feitas análises de correlação entre a expressão relativa de mRNA do gene BAX e o tamanho dos embriões, entre a concentração sérica de insulina e o tamanho dos embriões, entre a expressão relativa de mRNA do gene BAX e a concentração sérica de insulina e entre a taxa de eclosão dos embriões após 96 horas de cultivo pós-descongelação e a concentração sérica de insulina. Encontrou-se correlação alta e positiva em todas as análises realizadas, com valores de r , respectivamente, iguais a 0,93; 0,87; 0,93 e 0,96 ($P < 0,05$).

Tabela 16. Valores de correlação entre concentração sérica de insulina e diâmetro dos embriões, entre taxa de eclosão dos embriões após 96 horas de cultivo pós-descongelamento e concentração sérica de insulina, entre expressão relativa de mRNA do gene BAX e concentração sérica de insulina e entre a expressão relativa de mRNA do gene BAX e o diâmetro dos embriões produzidos por animais com maior ou menor ECC, submetidos ou não à alta ingestão de matéria seca por 14 dias antes da superovulação.

	Concentração sérica de insulina (µg/mL)	Expressão relativa de mRNA do gene BAX
Diâmetro dos embriões (µm)	r = 0,87	r = 0,93
Taxa de eclosão dos embriões (%)	r = 0,96	r = 0,81
Expressão relativa de mRNA do gene BAX	r = 0,93	-
P<0,05		

6. DISCUSSÃO

Os animais iniciaram o experimento com maior ou menor peso e ECC e assim se mantiveram durante todo o período experimental, como esperado. Mesmo os animais com maior ou menor ECC que foram submetidos à AIMS durante 14 dias previamente à SOV não sofreram alterações significativas no peso e no ECC (Figura 3 e 4). Realmente, as dietas experimentais foram eficientes, de forma que foi possível analisar apenas o efeito do ECC superior e inferior, sem a influência de ganho ou perda de peso, durante todo o período experimental.

A idéia inicial do fornecimento de elevadas quantidades de MS em determinados momentos dos protocolos de superovulação como alternativa para incrementar a produção *in vivo* de embriões bovinos, foi fundamentada em alguns trabalhos que mostraram resultados positivos usando essa estratégia (Gutierrez et al., 1997; Gong et al., 2002). No entanto, após vasta revisão da literatura, incluindo trabalhos recentes e resultados preliminares de experimentos desenvolvidos em nosso laboratório observou-se que o alto consumo de MS ou energia pode comprometer (Mantovani et al., 1993; Nolan et al., 1998; Yaakub et al., 1999b; Wrenzycki et al., 2000; Siddiqui et al., 2002; Lozano et al., 2003; Adamiak et al., 2005; Mollo et al., 2007) ou simplesmente exercer efeito nulo (Freret et al., 2006) no crescimento folicular, na resposta superovulatória, na viabilidade ovocitária e na produção e qualidade de embriões, em ruminantes.

No presente trabalho, o ECC dos animais e/ou 14 dias de AIMS previamente à SOV apresentaram efeito nulo sobre a função ovariana, quanto ao número de folículos recrutados, resposta superestimulatória e superovulatória e quanto à produção embrionária. O número de estruturas totais coletadas e de embriões viáveis não diferiu entre os quatro tratamentos. A maioria dos dados publicados, com efeito positivo ou negativo, baseia-se em estudos com fêmeas taurinas (Gutierrez et al., 1997; Gong et al., 2002; Adamiak et al., 2005; Mantovani et al., 1993; Nolan et al., 1998; Yaakub et al., 1999b; Wrenzycki et al., 2000). Há indícios que taurinos são mais sensíveis a essas alterações, logo respondem mais rapidamente às alterações no ECC e na dieta. Gutierrez et al. (1997) e Gong et al. (2002) aumentaram o número de

folículos recrutados de novilhas taurinas com baixo ECC fornecendo AIMS por 2 e 3 semanas, respectivamente. Negrão et al. (1997), O'Callaghan & Boland (1999), Yaakub et al. (1999b) e Wrenzycki et al. (2000) que concluíram que a produção de embriões transferíveis aumenta à medida que o consumo energético diminui, também trabalharam com taurinos. Em relação aos zebuínos, Mollo et al. (2007) observaram que novilhas da raça Nelore confinadas e submetidas à restrição alimentar (0,7 x M), por um período de 9 semanas, apresentaram respostas superestimulatórias e superovulatórias maiores do que novilhas submetidas à alta ingestão alimentar (1,7 x M). Além disso, o número de embriões coletados também foi superior no grupo de baixa ingestão. Segundo Siddiqui et al. (2002), um nível nutricional que limite o ECC em 2,5 a 3,0 (escala de 1 a 5) em vacas zebus antes de um tratamento de superovulação, seria melhor do que um alto nível nutricional. Kadokawa et al. (2008) avaliaram a relação entre ECC e produção embrionária em novilhas taurinas e observaram que os animais com ECC 3,5 produziram menos embriões viáveis que os animais com ECC 3,0 e 3,25 (escala de 1 a 5), mostrando que, nesta categoria animal, alterações bem menores na condição corporal já foram suficientes para alterar a produção embrionária. Neste trabalho, com novilhas Nelore, a condição corporal média dos animais com menor e maior ECC foi 2,7 e 4,0 (escala de 1 a 5), respectivamente, e a dieta de AIMS foi fornecida durante 14 dias prévios à SOV. Essas diferenças entre os tratamentos não foram suficientes para alterar a função ovariana e a produção embrionária. De fato, apenas no experimento do capítulo 1 foi observado efeito negativo da AIMS sobre a produção embrionária. Naquele estudo, os animais apresentavam ECC 4,0 (escala de 1 a 5) e a dieta foi fornecida por apenas 7 dias prévios à SOV. No entanto, diferente do estudo subsequente em que se utilizou novilhas zebus, naquele trabalho foram utilizadas vacas mestiças, corroborando a hipótese que animais com sangue taurino são mais sensíveis a alterações na dieta e no ECC.

Adamiak et al. (2005) acreditam que o efeito do nível nutricional sobre as qualidades ovocitária e embrionária é dependente do ECC inicial da fêmea bovina. Alguns autores acreditam que “flushing” nutricional (AIMS) associado a um ECC elevado nos animais pode exercer um efeito deletério sobre o crescimento folicular, maturação ovocitária e produção de embriões,

possivelmente devido ao excesso de IGF-I (Webb et al., 2004) e à hiperinsulinemia (Adamiak et al., 2005). Eles observaram que os animais hiperinsulinêmicos (elevado ECC com alta ingestão) apresentaram menor número de folículos totais no ovário e menor número de ovócitos maturados e blastocistos produzidos após cultivo *in vitro* (Adamiak et al., 2005).

Neste trabalho, os animais com elevado ECC e os animais submetidos à AIMS apresentaram maiores concentrações séricas de insulina, sem efeito de interação, porém não houve efeito deletério sobre a produção embrionária. De fato, apesar de alguns trabalhos mostrarem efeito negativo da hiperinsulinemia (Webb et al., 2004, Adamiak et al., 2005), existem outros trabalhos mostrando efeito benéfico e essencial da insulina no crescimento embrionário inicial (pré-implantação) (Augustin et al., 2003 e Mann et al., 2003). Ambos, insulina e IGF-I, atuam como potentes estimuladores da proliferação de células da granulosa e da esteroidogênese em bovinos (Webb et al., 2004). Insulina é um potente hormônio anabólico, estimula o transporte de glicose e aminoácidos, estimula síntese de RNA, proteína e glicogênio e, além disso, apresenta propriedades mitogênicas e anti-apoptóticas (Citado por Augustin et al., 2003). Em relação ao desenvolvimento embrionário, ela atua exercendo ação mitogênica e anti-apoptótica e regulando o transporte de glicose, substrato energético essencial para a sobrevivência embrionária, através da expressão do transportador da glicose (GLUT). Os autores observaram que a presença da insulina no meio de cultivo aumentou as taxas de clivagem e de blastocistos e produziu blastocistos com maior número de células e com menor grau de apoptose (Augustin et al., 2003). Mann et al. (2003) forneceram uma dieta que induziu aumento da razão insulina:glucagon para novilhas de corte e encontraram maior proporção de blastocistos alongados com tamanho superior a 10 cm, no dia 16, no grupo que recebeu a dieta hiperinsulinêmica e é importante ressaltar que a dieta não alterou a concentração de progesterona nestes animais. No presente trabalho, foi observado que os embriões produzidos por novilhas com elevado ECC, independente da dieta, apresentaram maior tamanho e maior taxa de eclosão durante o cultivo *in vitro* após descongelação. Estes resultados apresentaram correlação alta e positiva com as concentrações séricas de insulina.

Quanto à ação anti-apoptótica da insulina, acredita-se que seja via expressão de GLUT (transportador da glicose para dentro das células), menor

expressão de GLUT aumenta a apoptose em blastocistos (citado por Augustin et al., 2003). Os autores descreveram que embriões cultivados em meio com presença de insulina apresentaram menor grau de apoptose, avaliado através da técnica de TUNEL. No entanto, quando avaliaram o grau de apoptose através da expressão de mRNA dos genes BAX, BCL-2 e GLUT não foi possível detectar efeito da insulina. Concluíram que os efeitos da insulina não estão relacionados à quantidade de mRNA desses genes. Neste trabalho houve efeito da condição corporal na expressão de mRNA do gene BAX. Os animais com elevado ECC apresentaram maior expressão do gene BAX. No entanto, a expressão relativa desse gene apresentou correlação alta e positiva com a concentração sérica de insulina e com o tamanho dos embriões, sendo este um forte indicativo de que, não necessariamente, uma maior expressão do BAX indica qualidade inferior dos embriões. Recentemente, Vandaele et al. (2008) mostraram que a expressão de mRNA dos genes BAX, BCL-2 e caspase-3 e -7 não devem ser usados como marcadores para apoptose em embriões bovinos. Os autores trataram embriões bovinos com “staurosporine”, substância indutora de apoptose, e mesmo após o tratamento não foi possível detectar diferença na expressão desses genes. Yang e Rajamahendran (2002) avaliaram a expressão de mRNA dos genes BAX e BCL-2 em ovócitos e embriões bovinos com diferentes graus de qualidade, o BAX apresentou-se altamente expresso em todos os tipos de ovócitos e embriões, independente do grau de qualidade, já o BCL-2 estava mais expresso nos embriões de boa qualidade. Ambos BAX e BCL-2 apresentaram-se altamente expressos em ovócitos desnudos.

Alguns autores defendem a opinião de que a detecção de diferenças na expressão de mRNA somente indica uma significância biológica se confirmada a expressão e a atividade da proteína (Vandaele et al., 2008). Caso não seja confirmada presença e atividade da proteína, a expressão de mRNA pode mostrar, apenas, maior atividade celular, ou seja, maior proliferação e crescimento e, como consequência dessa maior atividade, mortes de algumas células também podem ocorrer. Os resultados deste trabalho reforçam a hipótese de que a expressão aumentada do gene BAX pode, simplesmente, indicar maior atividade celular e não necessariamente, qualidade inferior dos embriões, uma vez que a expressão de mRNA do gene BAX foi maior nos

embriões produzidos por animais com elevado ECC, sendo que estes também apresentaram maior tamanho e maior taxa de eclosão durante o cultivo *in vitro* após descongelação, associados a maiores concentrações séricas de insulina.

As animais com menor ECC apresentaram maiores concentrações séricas de IGF-I no dia 13, do fornecimento da AIMS. Apesar de a insulina ser a responsável pela expressão dos receptores hepáticos de GH e de IGF-I (Butler et al., 2003), quem realmente determina a síntese e liberação de IGF-I é o GH. A ação do GH depende apenas de um nível mínimo de insulina que seja capaz de expressar e manter ativos os receptores de GH (Chase et al.; 1998 e Bossis et al.; 1999). No entanto, a liberação de GH é controlada, principalmente, pela nutrição, através de “feed back” negativo (Chase et al.; 1998 e Bossis et al.; 1999). Esse mecanismo pode explicar a maior concentração sérica de IGF-I nos animais com menor ECC. Provavelmente os níveis circulantes de GH estavam mais elevados nestes animais e como estes animais não estavam sob restrição alimentar, ou seja, estavam com menor ECC mas recebendo dieta de manutenção e/ou AIMS a insulina manteve seus níveis fisiológicos. Dessa forma, os níveis de insulina provavelmente estavam acima do nível mínimo necessário para manter ativos os receptores de GH e associado aos, prováveis, maiores níveis circulantes de GH, foi possível estimular a maior liberação de IGF-I nos animais com menor ECC.

Além disso, deve-se destacar que os menores níveis circulantes de IGF-I nos animais com maior ECC podem ter contribuído com a não ocorrência de efeitos deletérios da AIMS sobre a produção embrionária nestes animais. Já que estes embriões sofreram efeito estimulatório apenas da insulina, não havendo o possível excesso estimulatório causado pela associação destes dois hormônios.

A expressão relativa de mRNA para o gene INF- τ foi maior nos embriões produzidos por animais que foram submetidos à AIMS ($P < 0,05$). Porém a causa é desconhecida, não se sabe qual alteração causada pela AIMS, fornecida durante 14 dias prévios à SOV, poderia refletir na expressão de mRNA para o gene INF- τ nos embriões eclodidos após descongelação e cultivo *in vitro*.

Os demais genes avaliados, GRB-10, IGF-II, IGF-IIR e BCL-2, acredita-se estarem relacionados à qualidade embrionária, porém neste estudo, não

houve diferença na expressão em embriões produzidos por doadoras submetidas aos diferentes tratamentos. A não detecção de diferenças na expressão destes genes pode ser atribuída à grande variação nos níveis de expressão nos embriões. No entanto, este é um comportamento comum em estudos de expressão gênica, principalmente em embriões, que sabidamente têm um metabolismo celular acelerado. Este comportamento tem sido observado também em vários outros experimentos do Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (dados não publicados). Além disso, neste trabalho foram utilizados no máximo dois embriões para cada uma das repetições, fato que favorece ainda mais a variação nos níveis de expressão destes genes.

7. CONCLUSÕES

Nas condições do presente estudo, elevado ou baixo escore de condição corporal, associado ou não a alta ingestão de matéria seca por 14 dias previamente à SOV, não alterou a resposta superovulatória e produção embrionária nos grupos experimentais, contrariando a hipótese do trabalho em que haveria uma melhor resposta em novilhas magras submetidas à AIMS. Por outro lado, os embriões produzidos por animais com elevado ECC, independente da dieta, mostraram-se melhores após a congelação, a descongelação e o cultivo *in vitro* até eclosão em relação aos demais embriões. Eles apresentaram maior tamanho, maior taxa de eclosão, maior expressão de mRNA do gene BAX e correlação alta e positiva desses resultados com a concentração sérica de insulina. Pode-se sugerir que as possíveis alterações metabólicas causadas pela insulina, dentre elas o maior transporte de substrato energético para dentro da célula embrionária, deram um maior suporte (reservas energéticas) para estes embriões, como consequência, eles foram mais criotolerantes e conseguiram se desenvolver melhor após a congelação, a descongelação e o cultivo *in vitro* até a eclosão.

8. AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo auxílio financeiro; à FAPESP pela concessão de bolsa; à Integral Nutrição Animal pelo fornecimento de seus produtos para alimentação dos animais.

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 hyperinsulinemia in cattle. **Biology of Reproduction**. v.73, p.918-26, 2005.

AUGUSTIN, A.; POCAR, P.; WRENZYCKI, C.; NIEMANN, H.; FISCHER, B. Mitogenic and anti-apoptotic activity of insulin on bovine embryos produced in vitro. **Reproduction**, v.126, p.91-9, 2003.

BARROS, C.M.; NOGUEIRA, M.F.G. SOV em zebuínos de corte. In: 1º. Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada. Londrina, p. 212-22, 2004.

BARUSELLI, P.S.; MARQUES, M.O.; REIS, E.L.; NASSER, L.F.T.; SILVA, R.C.P; MENEGATTI, J.A.; VALENTIN, R.; SANTOS, I.C.C. Adequação da dose de FSH (Folltropin-v) em protocolos de superovulação de vacas nelore (*Bos taurus indicus*) com inseminação artificial em tempo fixo (SOTF). In: XVII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 2003, Fortaleza. **Acta Scientiae Veterinarie**, p. 244-45, 2003.

BOSSIS, I.; WETTEMANN, R.P.; WELTY, S.D.; VIZCARRA, J.; SPICER, L.J. Nutritionally induced anovulation in beef heifers: ovarian and endocrine function during realimentation and resumption of ovulation. *Biol. Reprod.*, v.62, p.1436-1444, 1999.

BURATINI Jr, J.; PRICE, C.A.; VISINTIN, J.A.; BO, 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.421-31, 2000.

BUTLER, W.R.; MARR, A.L.; PELTON, S.H.; RADCLIFF, R.P.; LUCY, M.C. Insulin restores GH responsiveness during lactation-induced negative energy

balance in dairy cattle: effects on expression of IGF-I and GH receptor 1A. *J. Endocrinol.*, v.176, p.205-217, 2003.

CASTRO NETO, A.S.; SANCHES, B.V.; BINELLI, M.; SENEDA, M.M.; PERRI, S.H.; GARCIA, J.F. Improvement in embryo recovery using double uterine flushing. *Theriogenology*, v.63, p.1249–1255, 2005.

CHASE Jr, C.C.; KIRBY, C.J.; HAMMOND, A.C.; OLSON, T.A.; 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.

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

FORTUNE, J.E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Animal Reproduction Science**. v.78, p. 135-63, 2003.

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.783-94, 2006.

GONG, J.G. Influence of metabolic hormones and nutrition on ovarian follicle development in cattle: practical implications. *Dom. Anim. Endocrinol.*, v.23, p.229-41, 2002.

GONG, J.G.; ARMSTONG, 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.; WEBB, R. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: Follicular populations and peripheral hormones. **Biology of Reproduction**, v.45, p.941-49, 1991.

GUTIERREZ, C.G.; OLDHAM, J.; BRAMLEY, T.A.; GONG, J.G.; CAMPBELL, B.K.; WEBB, R. The recruitment of ovarian follicles is enhanced by increased dietary intake in heifers. **Journal Animal Science**. p.1876-84, 1997.

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 of energy utilization by beef cows. **Journal of Animal Science**, v.68, p.1447-56, 1990.

KADOKAWA, H.; TAMEOKA, N.; UCHIZA, Y.; KIMURA, M. Short communication: A field study on the relationship between body condition and embryo production in superovulated Holstein yearling heifers. **Journal of Dairy Science**, v.91, p.1087-91, 2008.

LOZANO, J.M.; LONERGAN, P.; BOLAND, M.P.; O'CALLAGHAN, D. Influence of nutrition on the effectiveness of superovulation programmes in ewes: effect on oocyte quality and post-fertilization development. **Reproduction**, v.125, p.543-53, 2003.

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. **Animal Reproduction Science**, v.79, p.71-9, 2003.

MANTOVANI, R.; ENRIGHT, W.J.; KEANE, M.G.; ROCHE, J.F.; BOLAND, M.P. Effect of nutrition on follicle stimulating hormone (FSH) on superovulatory response in beef heifers. **Proc 9th AETE**, p.234, Abstract, 1993.

MAPLETOFT, R.J.; STEWARD, K.B.; ADAMS, G.P. Recent advances in the superovulation in cattle. **Reproduction, Nutrition and Development**, v. 42(6): p. 601-11, 2002.

MOLLO, M.R.; RUMPF, R.; MARTINS, A.C.; CARRIJO, L.H.D.; SAUERESSIG, M.G.; SARTORI, R. Produção de embriões em novilhas nelore superovuladas submetidas à baixa ou alta ingestão alimentar. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35(supl), p.1241, Resumo, 2007.

NEGRÃO S, NIBART M, HUMBLLOT P. Negative effects of overfeeding on superovulatory response and embryo production in dairy heifers. **Proc 13th Scient Meet AETE**, Lyon 1997;Abstract.

NOGUEIRA, M.F.G.; BARROS, B.J.P.; TEIXEIRA, A.B.; TRINCA, L.A.; D'OCCHIO, M.J.; BARROS, C.M. Embryo recovery and pregnancy rates after the delay of ovulation and fixed time insemination in superstimulated beef cows. **Theriogenology**, v.57, p.1625-34, 2002.

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.1263-74, 1998.

O'CALLAGHAN D, BOLAND MP. Nutritional effects on ovulation, embryo development and the establishment of pregnancy in ruminants. **Animal Science**, v.68, p.299-314, 1999.

SARTORI, R.; SOUZA, A.H.; GUENTHER, J.N.; CARAVIELLO, D.; GEIGER, L.N.; SCHENK, J.; WILTBANK, M.C. Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially inseminated with X-sorted or unsorted sperm. **Animal Reproduction**, v.1, n.1, p.86 - 90, 2004.

SIDDIQUI, M.A.R.; SHAMSUDDIN, M.; BHUIYAN, M.M.U.; AKBAR, M.A.; KAMARUDDIN, K.M. Effect of feeding and body condition score on multiple ovulation and embryo production in zebu cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v.37, p.37-41, 2002.

STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. (ed.). **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. 3ª edição. Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões. Biblioteca do Congresso, 1999.

VANDAELE, L.; GOOSSENS, K.; PEELMAN, L.; VAN SOOM, A. Short communication: mRNA expression of BCL-2, BAX, caspase-3 and -7 cannot be used as a marker for apoptosis in bovine blastocysts. **Animal Reproduction Science**, v.106, p.168-73, 2008.

WEBB, R.; GARNSWORTHY, P.C.; GONG, J.G.; ARMSTRONG, D.G. Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. **Journal Animal Science**. v.82, 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. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.18, p.69-78, 2000.

YAAKUB, H.; O'CALLAGHAN, D.; BOLAND, M.P. Effect of type and quantity of concentrates on superovulation and embryo yield in beef heifers. **Theriogenology**, v. 51(7), p.1259-66, 1999a.

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

YANG, M.Y.; RAJAMAHENDRAN, R. Expression of BCL-2 and BAX proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced in vitro. **Animal Reproduction Science**, v.70, p.159-69, 2002.