UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CAMPUS DE ARAÇATUBA

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM SEMENTE DE GIRASSOL NA PERFORMANCE REPRODUTIVA DE FÊMEAS BOVINAS DE CORTE

Mariângela Bueno Cordeiro
Zootecnista

ARAÇATUBA – SP
2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CAMPUS DE ARAÇATUBA

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM SEMENTE DE GIRASSOL NA PERFORMANCE REPRODUTIVA DE FÊMEAS BOVINAS DE CORTE

Mariângela Bueno Cordeiro
Orientadora: Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive

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

ARAÇATUBA – SP
2013

Catalogação na Publicação(CIP)
Serviço de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNE

Cordeiro, Mariângela Bueno

C794e Efeito da suplementação com semente de girassol na performance reprodutiva de fêmeas bovinas de corte/ Mariângela Bueno Cordeiro.

Araçatuba: [s.n], 2013

161f. il.; + CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, 2013
Orientador: Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive

1. Semente de Girasssol 2. ácido linoléico. 3. Bovino 4. mortalidade embrionária. 5. PGF2α

CDD 664.726

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Efeito da suplementação com semente de girassol na performance reprodutiva de fêmeas bovinas de corte.

AUTORA: MARIÂNGELA BUENO CORDEIRO

ORIENTADORA: Dra. CLÁUDIA MARIA BERTAN MEMBRIVE

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

Dr. GUILHERME PUGLIESI

Dra. FLÁVIA LOMBARDI LOPES

Dra. CLÁUDIA MARIA BERTAN MEMBRIVE

DATA DA REALIZAÇÃO: 14 de novembro de 2013.

Presidente da Comissão Examinadora
Dra. CLÁUDIA MARIA BERTAN MEMBRIVE
- Orientadora -

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARIÂNGELA BUENO CORDEIRO – Nascida em 4 de junho de 1988, na cidade de Presidente Prudente/SP. Em 2006, ingressou no curso de Graduação em Zootecnia pela Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP, Campus de Dracena/SP, concluído em julho de 2011. Durante a graduação desenvolveu atividades de pesquisa, no Laboratório de Reprodução Animal, especialmente na área de Biologia Molecular, com ênfase nos mecanismos fisiológicos envolvidos na síntese de PGF2α endometrial em fêmeas bovinas. No período de 01/09/2009 a 28/02/2011, foi bolsista de Iniciação Científica da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processo 2009/09234-9, sob orientação da Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive. Em agosto de 2011, recebeu o prêmio de Melhor Iniciação Científica da V Turma de Zootecnia da UNESP de Dracena/SP, com o projeto intitulado "Efeitos do estradiol na síntese das proteínas envolvidas na cascata geradora de PGF2α endometrial em fêmeas bovinas". Em agosto de 2011, ingressou no curso de Mestrado em Ciência Animal na Faculdade de Medicina Veterinária, UNESP, Campus de Araçatuba/SP, na área de Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal, sob orientação da Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive. Desde 01/03/2012 é bolsista de Mestrado da FAPESP, Processo 2011/14444-2, período no qual desenvolveu a referida dissertação.

“Porque qualquer um, independentemente das habilitações que tenha, ao menos uma vez na sua vida fez ou disse coisas muito acima da sua natureza e condição, e se a essas pessoas pudéssemos retirar do quotidiano pardo em que vão perdendo os contornos, ou elas a si próprias por violência se retirassem das malhas e prisões, quantas mais maravilhas seriam capazes de obrar, que pedaços de conhecimento profundo poderiam comunicar, porque cada um de nós sabe infinitamente mais do que julga e cada um dos outros infinitamente mais do que neles aceitamos reconhecer.”

José Saramago (A jangada de pedra)

DEDICATÓRIA

A minha família, bem mais precioso que possuo, em especial aos meus grandiosos pais, *CLAUDIONOR DE ALENCAR CORDEIRO* e *ANGELA CRISTINA BUENO* que são meus exemplos de determinação e força.

Ao meu amado noivo, *RENATO MONTEIRO MALDONADO*, por todo carinho, compreensão e apoio as minhas escolhas.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meu caminho e em sua imensa bondade permitir que eu recomece sempre que necessário.

Aos meus pais, Claudionor de Alencar Cordeiro e Angela Cristina Bueno, que deram o melhor de si para que eu me sentisse amada e valorizada. Se hoje ergo minha cabeça e olho sempre para o horizonte é porque meus olhos refletem vocês.

Aos meus irmãos e heróis, Daniel Bueno Cordeiro e Rodrigo Bueno Cordeiro, pelos momentos de alegria e companheirismo.

A minha avó, Maria Ângela Sottovia Bueno, por incentivar e financiar parte dos meus estudos.

Ao meu noivo, Renato Monteiro Maldonado, que entrou em minha vida como quem nada queria e abriu meu coração para um sentimento único. Obrigada por me mostrar o outro “ângulo” da vida e por sempre sorrir.

A minha queridíssima orientadora, Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive, pelo exemplo de mulher e por demonstrar qual o verdadeiro significado da persistência.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento do presente trabalho e pela bolsa de mestrado concedida.

A Fundação para o Desenvolvimento da UNESP (FUNDUNESP), pelo auxílio financeiro (Processo 1874/009/13-Prope/CDC).

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

A Coordenação Executiva da UNESP do Campus de Dracena/SP, em especial ao Prof. Dr. Mário de Beni Arrigoni e Prof. Dr. Paulo Alexandre Monteiro de Figueiredo, por disponibilizar a estrutura física do Campus para realização de parte dos estudos.

Ao Prof. Dr. Mario Binelli, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Campus de Pirassununga/SP, pela valiosa contribuição científica e por ter disponibilizado a estrutura física e intelectual do Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular (LFEM) para a realização das análises por PCR em tempo real.

Ao Prof. Dr. Ed Hoffmann Madureira, da Faculdade de Medicina Veterinária da USP, Campus de Pirassununga/SP, pelo empréstimo dos equipamentos utilizados para a mensuração dos lipídios.

Ao Prof. Dr. Guilherme de Paula Nogueira, da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP de Araçatuba/SP, pela importante contribuição nas dosagens de progesterona por radioimunoensaio.

Ao Prof. Dr. Manoel Francisco de Sá Filho, da Universidade Federal de Santa Maria/RS, pela valiosa contribuição na execução das análises estatísticas.

Ao Prof. Dr. Augusto Hauber Gameiro, da Faculdade Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP, Campus de Pirassununga/SP, pela contribuição no desenvolvimento das análises econômicas.

Ao Prof. Dr. Ricardo de Francisco Strefezzi, da Faculdade Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP, Campus de Pirassununga/SP, por permitir a utilização do microscópio utilizado para a captura de imagens das lâminas histológicas.

Ao Prof. Dr. Dante Pazzanese D. Lanna e a toda equipe do Laboratório de Nutrição e Crescimento Animal, sediado na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), em Piracicaba/SP, pela contribuição com o desenvolvimento da técnica de cromatografia gasosa.

Ao Dr. Guilherme Pugliesi, Pós-Doutorando do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, Campus de Pirassununga/SP, pela realização das biópsias uterinas e ajuda com a análise dos resultados obtidos por PCR em tempo real.

Ao Dr. Daniel de Jesus Cardoso de Oliveira, pesquisador da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), pela grande contribuição na

obtenção das receptoras pertencentes a “Central de Receptoras Retorno”, local de realização do experimento 1.

Ao Dr. Fausto Barbieri, médico veterinário responsável e proprietário da “Central de Receptoras Retorno”, pela concessão das receptoras e importante contribuição técnica.

Ao zootecnista, Johnny Maciel de Souza, pela grandiosa contribuição experimental, por contribuir com a disponibilização dos valiosos resultados que tornaram possível a realização deste importante estudo.

A graduanda em Zootecnia da UNESP de Dracena, Leriana Garcia Reis, pela ajuda com a suplementação dos animais utilizados no experimento 2 e pela valiosa contribuição nas análises das glândulas endometriais. Obrigada pela amizade e momentos de grande alegria.

A toda equipe do Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular (LFEM), situado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP – Campus de Pirassununga/SP, em especial a doutoranda Milena Lopes Oliveira, pela valiosa contribuição com o desenvolvimento da técnica de PCR em tempo real e a doutoranda Angela Maria Gonella, pela ajuda com a captura das imagens das lâminas histológicas e interpretação dos resultados obtidos a partir do “software” Image-Pro® PLUS-The Proven Solution™.

Aos doutorandos Everton Lopes e Roney dos Santos Ramos, do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, Campus de Pirassununga/SP, pela contribuição na coleta das biópsias uterinas.

Aos alunos de pós-graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, Campus de Pirassununga/SP, Milton Maturana Filho e Thiago Santin, pela colaboração na mensuração das concentrações plasmáticas dos lipídios.

A mestranda do programa de pós-graduação da UNESP do Campus de Araçatuba/SP, Juliana Stephani de Souza, pela colaboração com a confecção das lâminas para a avaliação histológica uterina.

Ao doutorando do programa de pós-graduação da UNESP do Campus de Araçatuba/SP, Marcos Antonio Maioli, pela ajuda na utilização do “software” Graph Pad Prism® Version 5.01 aplicado para a confecção dos gráficos referentes aos resultados do presente estudo.

A grandiosa Devani Mariano Pinheiro, do Laboratório de Endocrinologia Animal da UNESP de Araçatuba, pela realização das dosagens de progesterona realizadas no presente estudo.

Aos meus grandes amigos e companheiros de graduação, Hyllana Catarine Dias de Medeiros, Delaila Juliana Brigida, Atã Iakowsky Barbosa e Mariana Midori Nagata, que sempre torceram e ainda torcem pelo meu sucesso e felicidade.

Aos funcionários da “Central de Receptoras Retorno”, pelo auxílio na execução dos procedimentos técnicos com os animais.

Aos proprietários da Fazenda Santa Encarnação, Antônio do Amaral Pérez e Ivan do Amaral Pérez, por concederem os animais utilizados no experimento 2.

A equipe técnica da Fazenda Santa Encarnação, em especial ao zootecnista Tiago Arriero Rodrigues, pelo apoio, orientação e grandes ensinamentos; e ao técnico em agropecuária Thiago Rodrigues Sanches, pela paciência e ajuda na execução do experimento 2.

Ao frigorífico Marfrig, sediado na cidade de Bataguassu/MS, por realizar o abate dos animais utilizados no experimento 2.

A todos os técnicos de laboratório da UNESP, Campus de Dracena/SP, pelo auxílio concedido, em especial ao Marcelo José Martini Bartholomei pela ajuda com as análises bromatológicas.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização dos meus estudos, muito obrigada.

SUMÁRIO

Página

I. INTRODUÇÃO..... 30
II. REVISÃO DE LITERATURA..... 36
2.1 Fontes de gordura utilizadas na alimentação de bovinos..... 36
2.2 Propriedades e efeitos da semente de girassol..... 39
2.3 Metabolismo dos lipídios no rúmen..... 43
2.4 Efeitos da suplementação lipídica na reprodução..... 48
2.4.1 Efeitos da suplementação lipídica no endométrio..... 51
2.5 Vias de síntese, sinalização e metabolismo dos eicosanoides..... 52
2.6 Análise morfométrica de glândulas endometriais e suas implicações..... 57
III. OBJETIVOS..... 59
IV. HIPÓTESE..... 60
I. MATERIAL E MÉTODOS..... 61
5.1 Experimento 1..... 61
5.1.1 Local do experimento..... 61
5.1.2 Animais..... 61
5.1.3. Sincronização do estro e ovulação..... 62
5.1.4 Administração dos tratamentos..... 64
5.1.5 Análise Bromatológica dos suplementos utilizados..... 65
5.1.6 Colheita de sangue e processamento das amostras..... 66
5.1.7 Transferência dos embriões produzidos por fertilização *in vitro* (FIV)..... 67
5.1.8 Diagnóstico de prenhez..... 68
5.1.9 Radioimunoensaio para a mensuração das concentrações plasmáticas de progesterona..... 68
5.1.10 Mensuração das concentrações plasmáticas de lipídios..... 68
5.1.11 Análise estatística..... 69
5.1.12 Análise econômica..... 70

5.2 Experimento 2..... 71
5.2.1 Local do experimento..... 71
5.2.2 Animais..... 72
5.2.3 Sincronização dos estros e das ovulações..... 73
5.2.4 Administração dos tratamentos..... 76
5.2.5 Análise bromatológica dos suplementos utilizados..... 77
5.2.6 Colheita de sangue e processamento das amostras..... 78
5.2.7 Avaliação do corpo lúteo..... 78
5.2.8 Biópsia uterina..... 79
5.2.9 Radioimunoensaio para a mensuração das concentrações plasmáticas de progesterona..... 79
5.2.10 Mensuração das concentrações plasmáticas de lipídios..... 80
5.2.11 Cromatografia gasosa..... 80
5.2.12 Análise de expressão gênica..... 82
5.2.12.1 Extração de RNA..... 82
5.2.12.2 Síntese de cDNA..... 82
5.2.12.3 Desenho de “primers”..... 83
5.2.12.4 Validação de “primers”..... 84
5.2.13 Confecção das lâminas histológicas..... 86
5.2.14 Análise morfométrica e número de glândulas endometriais.. 88
5.2.15 Análise estatística..... 88
5.2.15.1 Análise estatística utilizada para avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real..... 88
5.2.15.2 Análise estatística utilizada para avaliação dos componentes plasmáticos..... 89
5.2.15.3 Análise estatística utilizada para avaliação da morfometria do corpo lúteo, morfometria das glândulas endometriais e avaliação do número de glândulas endometriais considerando o efeito de tratamento em determinado tempo..... 90
5.2.15.4 Análise estatística utilizada para avaliação da

morfometria e número de glândulas endometriais considerando somente efeito de tratamento e avaliação do perfil de ácidos graxos no endométrio..... 90
VI. RESULTADOS..... 92
6.1 Experimento 1..... 92
6.1.1 Efeito de tratamento nas taxas de concepção..... 92
6.1.2 Avaliação das concentrações plasmáticas de progesterona... 93
6.1.3 Avaliação das concentrações plasmáticas de lipídios..... 93
6.1.4 Análise da viabilidade econômica da suplementação com semente de girassol..... 97
6.2 Experimento 2..... 98
6.2.1 Avaliação das concentrações plasmáticas de progesterona... 98
6.2.2 Avaliação das concentrações plasmáticas de lipídios..... 99
6.2.3 Avaliação do diâmetro e da área do corpo lúteo..... 103
6.2.4 Avaliação do perfil de ácidos graxos endometriais por cromatografia gasosa..... 105
6.2.5 Análise de expressão gênica por PCR em tempo real..... 108
6.2.6 Análise morfométrica e número de glândulas endometriais.... 114
VII. DISCUSSÃO..... 124
7.1 Experimento 1..... 124
7.1.1 Taxa de concepção..... 124
7.1.2 Concentração de lipídios no plasma..... 127
7.1.3 Concentração de progesterona no plasma..... 128
7.1.4 Análise econômica da utilização da semente de girassol..... 130
7.2 Experimento 2..... 130
7.2.1 Concentrações de lipídios no plasma..... 130
7.2.2 Tamanho do corpo lúteo e concentrações plasmáticas de P4..... 132
7.2.3 Composição lipídica endometrial..... 133
7.2.4 Análise de expressão gênica..... 136
7.2.5 Análise morfométrica das glândulas endometriais..... 138

VIII. CONCLUSÃO..... 140
REFERÊNCIAS..... 141

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidônico
AGE	Ácidos graxos essencias
AGPI	Ácidos graxos poliinsaturados
AMPC	Monofosfato cíclico de adenosina
C18:2	Ácido linoléico
C18:3	Ácido linolênico
CLA	Ácido linoléico conjugado
cm	Centímetro
COX-1	Cicloxigenase 1
COX-2	Cicloxigenase 2
DHA	Ácido docosahexanóico
ECC	Escore de condição corporal
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
EDTA	Ácido tetracético etilenediamine de sódio
EE	Extrato etéreo
EPA	Ácido eicosapentaenóico
FIV	Fertilização *in vitro*
g	Grama
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HE	Hematoxilina - Eosina
IA	Inseminação artificial
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
IM	Intramuscular
IP3	Inositol trifosfato
kg	Kilograma
km	Kilometro
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
m	Metro
mg	Miligrama

mL	Mililitro
MM	Matéria mineral
MS	Matéria seca
NDT	Nitrogênio digetível total
ng	Nanograma
P4	Progesterona
PB	Proteína bruta
PCI	Prostaciclina
PGE	Prostaglandina E
PGF2α	Prostaglandina F2α
PGFM	15-ceto-13,14-diidroprostaglandina F2α
PGs	Prostaglandinas
PLA2	Fosfolipase A2
PLC	Fosfolipase C
RT	Transcrição reversa
TETF	Tranferência de embriões em tempo fixo
TXs	Tromboxanos
UI	Unidades internacionais
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1- Estrutura química do ácido linoléico, um ácido graxo essencial do tipo ômega 6..... 38

Figura 2- Estrutura química do ácido linolênico, um ácido graxo essencial do tipo ômega 3..... 38

Figura 3- Vias de biohidrogenação ruminal do ácido linoléico e linolênico: o ácido linoléico transforma-se em cis-9, trans-11 C18:2, este posteriormente em ácido vacênico e finalmente a ácido esteárico; o ácido linolênico transforma-se em cis-9, trans-11, cis-15 C:18:3, este posteriormente em trans-11, cis-15 C18:2 que transforma-se em ácido vacênico e finalmente a ácido esteárico..... 45

Figura 4- Estrutura do ácido linoléico (A) e de dois de seus isômeros conjugados (B e C)..... 46

Figura 5- Via de síntese, sinalização e metabolismo de eicosanoides no endométrio de fêmeas bovinas: a enzima fosfolipase citosólica A2 (PLA2) libera o ácido araquidônico (AA) da membrana fosfolipídica, este pode ser convertido pela cicloxigenase 1 (PTGS1) ou cicloxigenase 2 (PTGS2) à PGH2, esta precursora de todos os prostanoides. A PGH2 é convertida pelas enzimas PGE sintases (PTGES1, PTGES2 ou PTGES3) em PGE2; PGF sintase (AKR1B1, AKR1C3, AKR1C4) em PGF2α, PGD sintase (PTGDS) em PGD2; TXAs sintase (TBXAS2) em TXA2 ou PGI sintase (PTGIS) no produto PGI2. Depois de sintetizadas, a PGD2 pode ser convertida à PGF2α pela ação da enzima AKR1C3,

assim como a PGE2 que pode ser convertida à PGF2α pela ação da enzima CBR1. A seguir, os prostanoides atravessam a membrana plasmática passivamente ou por transporte facilitado. Uma vez no exterior das células, os prostanoides se ligam aos seus receptores específicos: a PGE2 aos receptores PTGER-1, PTGER-2, PTGER-3, PTGER-4; a PGF2α ao PTGFR; a PGD2 ao PTGDR; a PGI2 ao PTGIR e o tromboxano A2 ao TBXAR2. A PGE2 e PGF2α podem entrar na célula alvo por transporte facilitado utilizando a proteína transportadora de membrana SLCO2A1 ou podem ser inativadas pela enzima PGDH..... 54

Figura 6- Representação esquemática do delineamento referente ao Experimento 1, colocação do dispositivo intravaginal com P4 associado a 2mg de benzoato de estradiol (D-10), retirada do dispositivo intravaginal associado a administração de 150μg de D-cloprostenol e 400UI de eCG (D-2), fornecimento de suplemento sem (Grupo Controle; n = 111) ou com semente de girassol (Grupo Girassol; n = 106) do D-2 ao D19, administração de 1mg de benzoato de estradiol (D-1), realização da TETF (D7), coletas de sangue realizadas no D-2, D7 e D19 e diagnóstico de gestação por ultrassonografia no D30, receptoras mestiças de embrião..... 63

Figura 7- Representação esquemática do delineamento referente ao experimento 2 de acordo com o período (dias) de suplementação dos animais pertencentes a cada grupo experimental, colocação do dispositivo intravaginal com P4 associado a 2mg de benzoato de estradiol (D-10), retirada do dispositivo intravaginal associado a

administração de 2mg de cloprostenol sódico, 0,5mg de cipionato de estradiol e 300UI de eCG (D-2), fornecimento de suplemento sem (Grupo Controle) ou com semente de girassol (Grupo Girassol) do D0 ao D22 ou D14 ou D6, biópsia uterina no D22 ou D14 ou D6, coletas de sangue apartir do D0, abate no D23 ou D15 ou D7 e coleta de materiais biológicos, em vacas Nelore (*Bos taurus indicus*)..... 75

Figura 8- Experimento 1: Efeito de tratamento sobre as taxas de concepção 23 dias pós TETF, em receptoras de embriões produzidos *in vitro,* tratadas durante 22 dias após a remoção do dispositivo (D-2 a D19), com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol; n = 106) ou não (Grupo Controle; n = 111)..... 92

Figura 9- Experimento 1: Efeito do tratamento sobre as concentrações plasmáticas de P4 no D7 e D19 em receptoras de embriões produzidos *in vitro,* tratadas durante 22 dias após a remoção do dispositivo (D-2 a D19), com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol; n = 106) ou não (Grupo Controle; n = 111)..... 93

Figura 10- Experimento 1: Efeito do tratamento sobre as concentrações plasmáticas de colesterol total no D-2, D7 e D19 em receptoras de embriões produzidos *in vitro,* tratadas durante 22 dias após a remoção do dispositivo (D-2 a D19), com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol; n = 106) ou não (Grupo Controle; n = 111)..... 94

Figura 11- Experimento 1: Efeito do tratamento sobre as concentrações plasmáticas de triglicerídeos no D-2, D7 e

D19 em receptoras de embriões produzidos *in vitro,* tratadas durante 22 dias após a remoção do dispositivo (D-2 a D19), com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol; n = 106) ou não (Grupo Controle; n = 111)..... 95

Figura 12- Experimento 1: Efeito do tratamento sobre as concentrações de HDL no D-2, D7 e D19 em receptoras de embriões produzidos *in vitro,* tratadas durante 22 dias após a remoção do dispositivo (D-2 a D19), com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol; n = 106) ou não (Grupo Controle; n = 111)..... 96

Figura 13- Experimento 1: Efeito do tratamento sobre as concentrações de LDL no D-2, D7 e D19 pós-cio das receptoras de embriões produzidos *in vitro,* tratadas durante 22 dias após a remoção do dispositivo (D-2 a D19), com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol; n = 106) ou não (Grupo Controle; n = 111)..... 97

Figura 14- Experimento 2: Efeito do tratamento, tempo e interação entre tratamento x tempo sobre as concentrações plasmáticas de P4 no D0, D7, D11, D15, D19 e D22 de vacas Nelore tratadas com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol; n = 10) ou não (Grupo Controle; n = 10); durante 22 dias, com início da suplementação 48 horas após a remoção do dispositivo (D0 a D22)..... 99

Figura 15- Experimento 2: Efeito do tratamento, tempo e interação entre tratamento x tempo sobre as concentrações plasmáticas de triglicerídeos no D0, D7, D11, D15, D19 e D22 de vacas Nelore tratadas com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol; n = 10)

ou não (Grupo Controle; n = 10) durante 22 dias, com início da suplementação 48 horas após a remoção do dispositivo (D0 a D22)..... 100

Figura 16- Experimento 2: Efeito do tratamento, tempo e interação entre tratamento x tempo sobre as concentrações plasmáticas de colesterol total no D0, D7, D11, D15, D19 e D22 de vacas Nelore tratadas com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol; n = 10) ou não (Grupo Controle; n = 10); durante 22 dias, com início da suplementação 48 horas após a remoção do dispositivo (D0 a D22)..... 101

Figura 17- Experimento 2: Efeito do tratamento, tempo e interação entre tratamento x tempo sobre as concentrações plasmáticas de HDL no D0, D7, D11, D15, D19 e D22 de vacas Nelore tratadas com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol; n = 10) ou não (Grupo Controle; n = 10); durante 22 dias, com início da suplementação 48 horas após a remoção do dispositivo (D0 a D22)..... 102

Figura 18- Experimento 2: Efeito do tratamento, tempo e interação entre tratamento x tempo sobre as concentrações plasmáticas de LDL no D0, D7, D11, D15, D19 e D22 de vacas Nelore tratadas com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol; n = 10) ou não (Grupo Controle; n = 10); durante 22 dias, com início da suplementação 48 horas após a remoção do dispositivo (D0 a D22)..... 103

Figura 19- Experimento 2: Diâmetro do corpo lúteo (média ± erro padrão da média) de vacas Nelore tratadas com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol; n = 30) ou não (Grupo Controle; n = 30);

durante 6, 14 ou 22 dias, com início da suplementação 48 horas após a remoção do dispositivo..... 104

Figura 20- Experimento 2: Área total do corpo lúteo (média ± erro padrão da média) de vacas Nelore tratadas com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol; n = 30) ou não (Grupo Controle; n = 30); durante 6, 14 ou 22 dias, com início da suplementação 48 horas após a remoção do dispositivo..... 105

Figura 21- Experimento 2: Percentual de lipídios endometriais identificados em “pools” de tecido endometrial obtido a partir de amostras de endométrio coletadas no D7, D15 e D23 de vacas Nelore tratadas com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol) ou não (Grupo Controle) com início da suplementação 48 horas após a remoção do dispositivo (D0)..... 108

Figura 22- Experimento 2: Abundância relativa (média ± erro padrão da média) do transcrito do receptor de membrana PTGER4 no endométrio nos dias 6, 14 e 22 de vacas Nelore tratadas com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol; n = 19) ou não (Grupo Controle; n = 20) com início da suplementação 48 horas após a remoção do dispositivo (D0)..... 111

Figura 23- Abundância relativa (média ± erro padrão da média) do transcrito da COX-2 (PTGS2) no endométrio nos dias 6, 14 e 22 de vacas Nelore tratadas com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol; n = 19) ou não (Grupo Controle; n = 20) com início da suplementação 48 horas após a remoção do dispositivo (D0)..... 112

Figura 24- Abundância relativa (média ± erro padrão da média) do transcrito da enzima AKR1C4 no endométrio nos dias 6,

14 e 22 de vacas Nelore tratadas com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol; n = 19) ou não (Grupo Controle; n = 20) com início da suplementação 48 horas após a remoção do dispositivo (D0)..... 113

Figura 25- Abundância relativa (média ± erro padrão da média) do transcrito da enzima AKR1B1 no endométrio nos dias 6, 14 e 22 de vacas Nelore tratadas com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol; n = 19) ou não (Grupo Controle; n = 20) com início da suplementação 48 horas após a remoção do dispositivo (D0)..... 114

Figura 26- Experimento 2: Diâmetro das glândulas endometriais (média ± erro padrão da média) de vacas Nelore tratadas com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol; n = 18) ou não (Grupo Controle; n = 15); durante 6, 14 ou 22 dias, com início da suplementação 48 horas após a remoção do dispositivo (D0)..... 115

Figura 27- Experimento 2: Diâmetro das glândulas endometriais (média ± erro padrão da média), considerando efeito de tratamento, de vacas Nelore tratadas com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol; n = 18) ou não (Grupo Controle; n = 15)..... 116

Figura 28- Experimento 2: Perímetro das glândulas endometriais (média ± erro padrão da média) de vacas Nelore tratadas com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol; n = 18) ou não (Grupo Controle; n = 15); durante 6,14 ou 22 dias, com início da suplementação 48 horas após a remoção do dispositivo (D0)..... 117

Figura 29- Experimento 2: Perímetro das glândulas endometriais

(média ± erro padrão da média), considerando efeito de tratamento, de vacas Nelore tratadas com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol; n = 18) ou não (Grupo Controle; n = 15)..... 118

Figura 30- Experimento 2: Área das glândulas endometriais (média ± erro padrão da média) de vacas Nelore tratadas com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol; n = 18) ou não (Grupo Controle; n = 15); durante 6,14 ou 22 dias, com início da suplementação 48 horas após a remoção do dispositivo (D0)..... 119

Figura 31- Experimento 2: Área das glândulas endometriais (média ± erro padrão da média), considerando efeito de tratamento, de vacas Nelore tratadas com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol; n = 18) ou não (Grupo Controle; n = 15)..... 120

Figura 32- Experimento 2: Número de glândulas endometriais por campo óptico (média ± erro padrão da média) de vacas Nelore tratadas com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol; n = 18) ou não (Grupo Controle; n = 15); durante 6,14 ou 22 dias, com início da suplementação 48 horas após a remoção do dispositivo (D0)..... 121

Figura 33- Experimento 2: Número de glândulas endometriais por campo óptico (média ± erro padrão da média), considerando efeito de tratamento, de vacas Nelore tratadas com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol; n = 18) ou não (Grupo Controle; n = 15)..... 122

Figura 34- Experimento 2: Imagens de glândulas endometriais, em aumento 10x, de vacas Nelore tratadas com 1,7kg de

suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol; n = 18) ou não (Grupo Controle; n = 15); durante 6,14 ou 22 dias, e abatidas nos dias 7, 15 ou 23 pós-início da suplementação..... 123

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1- Principais fontes de gordura empregadas na alimentação animal e suas respectivas composições de ácidos graxos..... 37

Tabela 2- Variação da composição em ácidos graxos do óleo em função de seis genótipos de girassol..... 40

Tabela 3- Análise bromatológica dos suplementos e da silagem de milho utilizados no experimento 1..... 66

Tabela 4- Análise bromatológica dos suplementos utilizados no experimento 2..... 77

Tabela 5- Nomenclatura do gene, “primers forward” (F) e “reverse” (R), sequência dos “primers”, identificação representativa (ID) e números de pares de bases (pb) dos genes..... 84

Tabela 6- Perfil de ácidos graxos identificados em “pools” de tecido endometrial obtido a partir de amostras de endométrio coletadas no D7, D15 e D23 de vacas Nelore tratadas com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol) ou não (Grupo Controle) com início da suplementação 48 horas após a remoção do dispositivo (D0 ao D22). Para confecção do “pool” do Grupo Girassol foram utilizadas 4 fêmeas no D7, 5 fêmeas no D15 e fêmeas no D23 e para confecção do “pool” do Grupo Controle utilizou-se a mesma quantidade de animais/dia..... 106

Tabela 7- Características das reações de amplificações e da curva padrão para validação dos “primers”..... 109

Tabela 8- Abundância relativa de transcritos envolvidos na biossíntese de eicosanoides no endométrio nos dias 6,

14 e 22 pós-início da suplementação de vacas Nelore tratadas com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol) ou não (Grupo Controle) com início da suplementação 48 horas após a remoção do dispositivo (D0 ao D22)..... 110

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM SEMENTE DE GIRASSOL NA PERFORMANCE REPRODUTIVA DE FÊMEAS BOVINAS DE CORTE

RESUMO – A mortalidade embrionária em bovinos, entre 15 e 19 dias de prenhez, pode ser promovida pela liberação de PGF2α endometrial. A síntese de PGF2α é inibida pela suplementação com compostos ricos em ácido linoléico, como a semente de girassol. Assim, objetivou-se avaliar o efeito e os mecanismos pelos quais a suplementação com semente de girassol atua na performance reprodutiva de fêmeas bovinas de corte. Hipotetizou-se que tal suplementação promove um incremento na taxa de concepção de receptoras de embriões produzidos *in vitro* submetidas à TETF e que tal efeito decorra de modificações na composição lipídica plasmática e endometrial, alterações na expressão de transcritos envolvidos na biossíntese de eicosanoides e/ou modificações no número e/ou morfometria das glândulas endometriais. No Experimento 1, novilhas mestiças zebuínas submetidas ao protocolo de TETF suplementadas com semente de girassol, por 22 dias a partir da remoção do dispositivo de progesterona, apresentaram maior taxa de concepção em relação ao grupo controle (55,66% vs. 36,94%; $P < 0,01$). No Experimento 2, vacas Nelore suplementadas com semente de girassol apresentaram maiores concentrações plasmáticas de colesterol total, LDL e HDL; modificações na composição lipídica endometrial e alterações na expressão de transcritos envolvidos na biossíntese de eicosanoides. Conclui-se que a suplementação com semente de girassol aumenta a taxa de concepção por modificar a composição lipídica plasmática e endometrial, a expressão de transcritos envolvidos na biossíntese de eicosanoides e número e morfometria das glândulas endometriais.

Palavras-Chave: ácido linoléico, bovino, endométrio, mortalidade embrionária, PGF2α

EFFECT OF SUPPLEMENTATION WITH SUNFLOWER SEED IN REPRODUCTIVE PERFORMANCE OF FEMALE BEEF CATTLE

SUMMARY – Embryonic mortality in cattle, between 15 and 19 days of pregnancy, can be promoted by the release of endometrial PGF2α. Synthesis of PGF2α is inhibited by supplementation with compounds rich in linoleic acid such as sunflower seed. This study aimed to evaluate the effects and the mechanisms by which supplementation with sunflower seed acts on reproductive performance of beef cows. It was hypothesized that such supplementation promotes an increase on conception rate of *in vitro*-produced embryos subjected to FTET; and that this effect arises from changes in plasma lipid composition and endometrial changes in the expression of transcripts involved in the biosynthesis of eicosanoids and/or changes in the number and/or endometrial gland morphology. In Experiment 1, zebu crossbred heifers submitted to the FTET protocol supplemented with sunflower seed, for 22 days from the removal of the progesterone device, showed higher conception rate in the control group (55.66% vs. 36.94% ; $P < 0.01$). In Experiment 2, Nelore cows supplemented with sunflower seed showed higher plasma concentrations of total cholesterol, LDL and HDL, changes in endometrial lipid composition and changes in the expression of transcripts involved in the biosynthesis of eicosanoids. It was concluded that supplementation with sunflower seeds increases the conception rate by modifying the lipid composition of the plasma and the endometrium, the expression of transcripts involved in the biosynthesis of eicosanoids and number and morphometry of the endometrial glands.

Keywords: linoleic acid, bovine, endometrium, embryonic mortality, PGF2α

I. INTRODUÇÃO

A demanda mundial por alimentos cresce rapidamente de forma proporcional ao aumento da população. Em 2013, o Brasil ocupa a posição de segundo maior exportador de carne bovina e tem recebido grande atenção mundial devido ao modelo de criação extensiva e potencial de incremento na produção. O rebanho bovino brasileiro é constituído por 209.790.000 animais, sendo 80% destes destinados à produção de carne. Estima-se que a produção nacional de carne bovina seja de 9.375.000 toneladas, proveniente do abate de 42.859.754 cabeças, sendo 1.450.000 toneladas do produto destinadas às exportações que representa 15,46% da produção (ANUALPEC, 2013).

Atualmente o Brasil apresenta uma taxa de desfrute (número de animais abatidos dividido pelo número total de animais x 100) de 20%, abate carcaças com um peso médio de 15 arrobas e exporta 15% da produção (ANUALPEC, 2013). Em comparação, os norte americanos desfrutam de 36% do seu rebanho, abatem carcaças pesando 24 arrobas e exportam 11% de sua produção (ANUALPEC, 2013). Embora detentor do maior rebanho bovino comercial do mundo, o Brasil apresenta uma eficiência na produção pecuária aquém da necessária, caracterizada inclusive pela baixa eficiência reprodutiva nas operações de cria.

Na criação de bovinos a produtividade está diretamente relacionada à eficiência reprodutiva das fêmeas, que devem apresentar um intervalo de partos de 12 meses, gerando a produção de 1 bezerro/matriz/ano. Em 2012, o rebanho nacional era composto por 76.126.751 matrizes, destas 62.620.239 eram vacas e 13.506.512 novilhas com mais de 24 meses. Em 2013, estima-se uma produção nacional de 53.015.511 bezerros (ANUALPEC, 2013). Quando se estabelece uma relação entre o número de matrizes em idade reprodutiva e o número de bezerros nascidos no ano subsequente, estima-se uma produção nacional média de 0,69 bezerro/matriz/ano, estabelecendo um intervalo entre partos de 17 meses. Nos últimos sete anos, houve uma grande agregação ao

valor do bezerro ao desmame, que passou de 60,6 IGP/bezerro em 2006 para 164,8 IGP/bezerro em 2012 (ANUALPEC, 2013). Conclui-se que a baixa eficiência reprodutiva nas operações de cria, caracterizada pela baixa eficiência na produção de bezerros nascidos reduz a lucratividade e a competitividade do setor pecuário.

A avaliação crítica do mercado financeiro e a rentabilidade agropecuária em 2010 permitiram demonstrar que o investimento de maior lucratividade sobre o capital investido foi o ouro (32,26%), seguido pela produção de leite com alta tecnologia (11,42%), poupança (6,90%), produção com ciclo completo na pecuária de corte (5,76%) e recria e engorda exclusivamente (5,07%). As operações restritas apenas a fase cria de bovinos de corte com alta e baixa tecnologia foram de 1,62% e -1,38%, respectivamente (SCOT CONSULTORIA, 2010). Assim, assume-se que a rentabilidade da fase de cria requer sua inserção no ciclo completo da criação de bovinos de corte e o crescente emprego de tecnologia para que a mesma se torne economicamente viável.

Mantendo-se baixa a eficiência reprodutiva, a única maneira de se aumentar o volume de carne produzido é aumentando a área destinada à exploração pecuária. Contudo, tal prática é indesejável pelas óbvias implicações ambientais negativas. Assim, torna-se evidente a importância de se aumentar a eficiência reprodutiva das explorações pecuárias com o objetivo de incrementar a produção de carne sem necessariamente aumentar o número de matrizes. Para tanto, torna-se imprescindível aumentar a taxa de prenhez (número de bezerros nascidos dividido pelo número de fêmeas em reprodução x 100) e concepção (número de bezerros nascidos dividido pelo número de fêmeas inseminadas x 100). Entretanto, para que a bovinocultura brasileira atinja maiores níveis de produtividade, além da eficiência reprodutiva, o melhoramento genético necessita ser priorizado (BARUSELLI et al., 2006).

Tais requisitos tem alavancado o emprego da inseminação artificial (IA). Para otimizar seu emprego, foram desenvolvidos protocolos hormonais que permitem a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em 100% das fêmeas tratadas em um momento pré-determinado, procedimento que exclui a

necessidade da detecção de estros. Além disso, a IATF possibilita a indução da ciclicidade de fêmeas em anestro no período pós-parto (DAY, 2005; PURSLEY et al., 1995; VASCONCELOS, 1994). No Brasil, segundo estimativas da Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA), estima-se que 27,19% das fêmeas bovinas tenham sido inseminadas em 2012, destas 32,96% fêmeas de corte e 19,21% fêmeas de leite, sendo aproximadamente 50% do total de inseminações realizadas por IATF (ASBIA, 2012). Apesar dos bons resultados obtidos com o emprego da IATF, as taxas de prenhez à primeira inseminação dificilmente são maiores que 60% em vacas de corte e 30% em vacas leiteiras de alta produção, indicando que uma proporção expressiva de fêmeas inseminadas não se tornam prenhes. A taxa média de concepção em rebanhos de corte comerciais no Brasil com o emprego da IATF é de 49,1% (BARUSELLI et al., 2008; SÁ FILHO et al., 2009).

Considerando a importância do incremento genético aliado ao aumento da eficiência reprodutiva, o Brasil também se tornou líder mundial no emprego da técnica de transferência de embriões em tempo fixo (TETF). A TETF aliada à produção de embriões *in vitro* constituem biotécnicas poderosas na disseminação de produtos nascidos oriundos de animais geneticamente superiores. Entretanto, as taxas de concepção no emprego da TETF dificilmente superam 50%. No Brasil, a produção anual de embriões bovinos teve um aumento de 800% ao longo da última década. Segundo a Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE) o Brasil é líder mundial na produção *in vitro* de embriões bovinos, sendo responsável por 70% do total de embriões gerados no mundo através desta biotecnologia (FAEMG, 2013).

Em rebanhos bovinos, a mortalidade embrionária é uma das maiores causas de falhas reprodutivas, conforme revisado por Santos et al. (2004) e Sartori (2004). Nos primeiros sete dias pós-inseminação tal mortalidade foi associada a falhas de fertilização, defeitos genéticos e anormalidades no desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto. Neste período, a mortalidade normalmente é inferior a 10%, mas em vacas de leite sob estresse calórico pode ultrapassar 40% (SARTORI et al., 2002; SARTORI, 2004). Em

bovinos os principais desafios biológicos para o estabelecimento da prenhez ocorrem no período especialmente compreendido entre os dias 15 e 19 após a fecundação, esse posteriormente designado de “período crítico” (BINELLI et al., 2001).

Diskin e Sreenan (1980) verificaram, em novilhas de corte, que falhas de fertilização até o dia 8 pós-inseminação são responsáveis por 10% dos casos de fracasso reprodutivo, enquanto as mortes embrionárias entre os dias 8 e 16 pós-inseminação contribuem com mais de 30% dos referidos casos. De fato, Humblot (2001) reportou em rebanhos franceses, 20,5 a 43,6% de mortalidade embrionária até o dia 25 pós-inseminação. Santos et al. (2004) sugeriram que a mortalidade embrionária se aproxime de 60% até 28 dias pós-inseminação, para vacas de leite de alta produção. Em complemento, Kunz et al. (2002) encontraram em vacas de corte taxas de mortalidade entre 20 e 40% até 22 dias pós-inseminação. Estudos onde vacas leiteiras lactantes foram submetidas à transferência de embriões e ao diagnóstico precoce da gestação por ultrassonografia observou-se que menos de 50% dos embriões viáveis estabelecem a gestação entre 27-30 dias após a ovulação (SARTORI et al., 2003). Tais dados justificam relatos de taxas de nascimento após única inseminação de 50 a 55% para novilhas (ROCHE et al., 1977; SREENAN; MULVEHILL, 1975) e de 53% para vacas de raças especializadas na produção de carne (ROCHE et al., 1977).

Em fêmeas bovinas, durante o período crítico, o concepto (embrião e membranas associadas) deve produzir competentemente moléculas que interagem com o endométrio inibindo a síntese de prostaglandina F2α (PGF2α) e, consequentemente, a luteólise, condição determinante para o estabelecimento da prenhez. Contudo, a simples existência do concepto no útero não assegura o bloqueio efetivo da luteólise e o reconhecimento materno da prenhez. Imediatamente após a ovulação, se inicia o desenvolvimento do corpo lúteo, uma estrutura glandular transitória, com capacidade de sintetizar vários hormônios, sendo que o principal é a progesterona (P4), fundamental para preparar adequadamente o meio uterino para o desenvolvimento do

concepto. Para a determinação de uma prenhez, deve ocorrer o reconhecimento fisiológico da presença do concepto. A luteólise é promovida na ausência da fertilização ou quando o concepto é incapaz de sinalizar sua presença no útero.

Diante deste contexto, estratégias nutricionais podem ser empregadas com a finalidade de reduzir a mortalidade embrionária entre os dias 15 e 19 da gestação. Tais estratégias objetivam minimizar capacidade de síntese de PGF2α no endométrio materno e/ou maximizar o estímulo anti-luteolítico induzido pelo concepto. Alguns estudos reportam a possibilidade de controlar eventos reprodutivos através de manipulações da dieta (CERRI et al., 2004; FOULDI-NASHTA et al., 2007; STAPLES et al., 1998; STAPLES; THATCHER, 2005; STAPLES et al., 2009; VASCONCELOS et al., 2001). A utilização de determinados componentes na dieta poderia promover alterações na composição lipídica do endométrio tornando-o menos luteolítico (MATTOS et al., 2000). Dentre os componentes citados encontra-se o ácido linoléico.

Em geral, as sementes oleaginosas são ricas em ácidos graxos poliinsaturados (AGPI), mas uma das fontes mais ricas em ácido linoléico ou ácido 9,12-octadecadienóico é o girassol (*Helianthus annuus L.*). O teor de óleo do girassol varia de 20 a 45% de acordo com o cultivar (DAGHIR et al., 1980; KARUNOJEEWA et al., 1989; SILVA, 1990), caracterizando-se por ter alta relação de AGPI/saturados (65,3%/11,6%). Os AGPI são constituídos, quase na sua totalidade pelo ácido linoléico (65%) e teores próximos a 20% de ácido graxo insaturado oléico (CHEVA-ISARAKUL; TANGTWEEWIPAT, 1991).

Reportou-se que a inclusão de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) na dieta altera o desenvolvimento folicular (STAPLES; THATCHER, 2005), aumenta a concentração de P4 (STAPLES et al., 1998), melhora a qualidade do embrião (CERRI et al., 2004) e diminui a capacidade luteolítica do endométrio durante o reconhecimento materno da gestação (MATTOS et al., 2000).

Em um estudo realizado por Peres et al. (2008), vacas Nelore, pluríparas, no período pós-parto, após serem submetidas à IATF receberam

suplemento alimentar contendo 40% de farelo de soja com 44% PB e 60% de semente de girassol ou suplemento igualmente balanceado em energia e proteína, porém não acrescido de semente de girassol (53% de farelo de soja com 44% PB e 47% de milho), ambos constituídos de 72% NDT e 24% de PB. As fêmeas receberam 1,7kg de suplemento/dia, até o 22º dia após IATF. Nas fêmeas suplementadas com semente de girassol, observou-se maior taxa de concepção (66,7% vs. 46,3%; P = 0,02) 30 dias após a IATF. Considerando que houve uma diferença de 20,4% entre a taxa de concepção das fêmeas suplementadas com semente de girassol comparada as que não receberam tal suplementação, o que representa um aumento de 44% na taxa de concepção, e que o efeito da semente de girassol em tal aumento, possivelmente seja multifatorial. Sugere-se que tal efeito, possa ser promovido por alterações no embrião, concepto, endométrio, microambiente uterino e/ou corpo lúteo.

Até o momento não foi caracterizada a composição lipídica do endométrio assim como as alterações promovidas em tal constituição em animais suplementados com gordura.

A hipótese no presente estudo, é que a suplementação com semente de girassol promove um incremento na taxa de concepção de receptoras de embriões produzidos *in vitro* submetidas à TETF e que tal efeito decorra de modificações na composição lipídica plasmática e endometrial, alterações na expressão de transcritos envolvidos na biossíntese de eicosanóides e/ou modificações no número e/ou morfometria das glândulas endometriais.

I. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fontes de gordura utilizadas na alimentação de bovinos

Os alimentos de origem vegetal e animal possuem substâncias insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos. Tais substâncias são referenciadas como lipídios. Os lipídios apresentam funções estruturais e de reserva. Na condição de reserva, os lipídios podem ser mobilizados e transformados em outras substâncias ou catabolizados para a produção de energia (GONÇALVES; DOMINGUES, 2007). Na nutrição animal, os lipídios fornecem 2,25 vezes mais calor ou energia por quilo quando comparado a carboidratos e proteínas na mesma quantidade (MARQUES, 2003).

Os ruminantes alimentados basicamente com forrageiras, ingerem baixo teor de lipídios, entre 1 e 4% da matéria seca (MS). O fornecimento de maiores quantidades de lipídios pode ser realizado pela adição de gorduras ou sementes oleaginosas na dieta. Recomenda-se não ultrapassar 6 a 7% da MS, pois quantidades acima deste limite promovem inibição da fermentação ruminal especialmente pelas bactérias celulolíticas, além de exercerem um efeito tóxico nas membranas celulares bacterianas (NRC, 2007; SANTOS et al., 2008).

Existem várias fontes de gordura que podem ser fornecidas aos animais, tais como sementes de oleaginosas, sebo, óleo reciclado de cozinha, óleos vegetais, óleos de peixe e gorduras comercialmente protegidas contra ação dos microorganismos ruminais como os sais de cálcio de ácidos graxos e gorduras granuladas (WATHES et al., 2007). Cada fonte de gordura é composta de uma mistura de diferentes ácidos graxos individuais. Os principais ácidos graxos presentes nas dietas são ácido palmítico (C16:0), esteárico (C18:0) ambos saturados; ácido oléico (C18:1) este insaturado e ácido linoléico (C18:2) e linolênico (C18:3) ambos poliinsaturados (SOARES, 2009).

Na Tabela 1, estão sumarizadas as principais fontes de gordura utilizadas na alimentação animal e suas respectivas composições de ácidos graxos.

Tabela 1 – Principais fontes de gordura empregadas na alimentação animal e suas respectivas composições de ácidos graxos

	COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS (%)						
Fonte de Gordura	**C14:0 Mirístico**	**C16:0 Palmítico**	**C16:1 Palmito-oleico**	**C18:0 Esteárico**	**C18:1 Oléico**	**C18:2 Linoléico**	**C18:3 Linolênico**
Sebo	3	25	3	18	43	4	<1
Óleo reciclado de cozinha	2	21	4	11	44	14	<1
Energy Booster 100[1]	3	40	1	43	10	2	<1
Megalac; EnerG-II[1]	1	50	<1	4	36	8	<1
Megalac-R[1]	1	36	<1	4	26	29	3
Óleo de canola	<1	4	<1	2	63	19	9
Óleo de caroço de algodão	1	23	1	3	18	54	1
Óleo de linhaça	<1	5	<	3	20	16	55
Óleo de colza	<1	5	<1	2	54	22	11
Óleo de cártamo	<1	7	<1	2	12	78	<1
Óleo de soja	<1	11	<1	4	23	54	8
Óleo de girassol	<1	7	<1	5	19	68	1
Óleo de peixe Menhaden[2]	7	16	8	3	12	1	2

[1] Preparações comerciais consideradas parcialmente inertes no rúmen
[2] Também contém 14% C20:5 e 9% C22:6.

Fonte: Staples (2009).

As gorduras de graxaria denominadas de sebo animal e a gordura amarela representada pelo óleo reciclado de cozinha são fontes de gordura compostas principalmente de ácido oléico (~43%). As gorduras granuladas, como Energy Booster 100, EnerG-II e Megalac; são gorduras secas compostas principalmente de ácido palmítico (36-50%). O óleo de canola é rico em ácido oléico (63%). O óleo de caroço de algodão, cártamo, girassol e soja são ricos em ácido linoléico (54 a 78%). O ácido linoléico, abreviado como C18:2, representa um ácido graxo essencial do tipo ômega 6 (Figura 1).

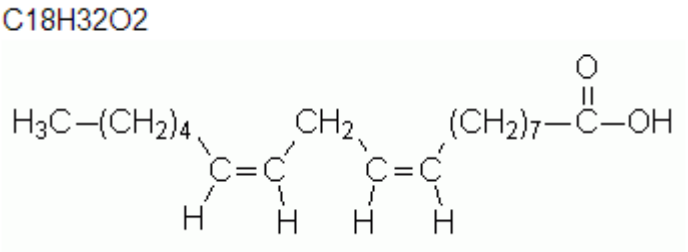


FIGURA 1 – Estrutura química do ácido linoléico, um ácido graxo essencial do tipo ômega 6.

O óleo de linhaça é rico em ácido linolênico (55%), abreviado como C18:3, representa um ácido graxo essencial tipo ômega 3 (Figura 2). O ácido eicosapentaenóico (C20:5) e ácido docosahexaenóico (C22:6) também são ácidos graxos tipo ômega 3 (STAPLES, 2009).

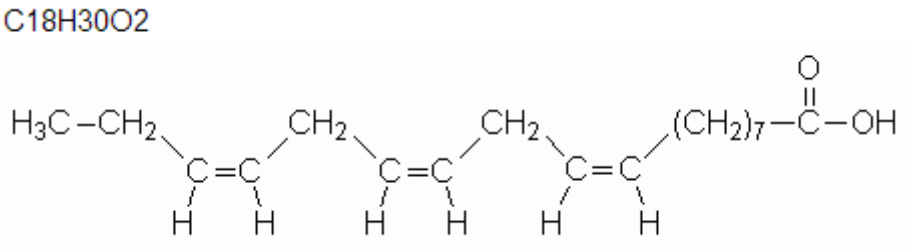


FIGURA 2 – Estrutura química do ácido linolênico, um ácido graxo essencial do tipo ômega 3.

O conteúdo de óleo das forragens e de vários grãos, embora seja usualmente baixo, possui altas proporções de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI). Os AGPI são representados pelo ácido linolênico (C18:3) e linoléico (C18:2). Ambos representam ácidos graxos essenciais na dieta, considerando que não podem ser sintetizados pelo organismo animal e humano (NRC, 2007; WATHES et al., 2007).

2.2 Propriedades e efeitos da semente de girassol

O girassol (*Helianthus annuus L.*) é uma cultura de ampla capacidade de adaptação às diversas condições de latitude, longitude e fotoperíodo. Nos últimos anos, vem se apresentando como opção de rotação e sucessão de culturas nas regiões produtoras de grãos. Sua melhor tolerância à seca quando comparada ao milho ou sorgo, sua baixa incidência de pragas e doenças, além dos benefícios que o girassol proporciona às culturas subsequentes são alguns dos fatores que vêm conquistando os produtores brasileiros.

Em áreas onde se faz rotação de culturas com o girassol, observa-se um aumento de produtividade de 10% nas lavouras de soja e de 15 a 20% nas de milho. Em 2011, a área nacional ocupada com cultivo do girassol cresceu 30%, e os estados de Mato Grosso, Goiás e Tocantins são atualmente os maiores produtores, estados potencialmente expressivos na pecuária de corte. O girassol vem sendo utilizado, principalmente, para extração de óleo e é considerado, dentro os óleos vegetais, como um dos óleos de melhor qualidade nutricional e organoléptica (aroma e sabor). Além disso, a massa resultante da extração do óleo rende uma torta altamente protéica, usada na produção de ração. O girassol ainda é utilizado na silagem para alimentação animal e seu cultivo também pode estar associado à apicultura (EMBRAPA, 2013).

A cultura do girassol se destaca no cenário mundial como quinta oleaginosa em produção de matéria prima, perdendo apenas para a cultura da soja, colza, algodão e amendoim. Destaca-se como a quarta oleaginosa em produção de farelo; atrás da soja, colza e algodão. Representa a terceira oleaginosa em produção de óleo, atrás da soja e colza. No Brasil, o estado do Mato Grosso é responsável por cerca de 70% da produção nacional de girassol, seguido do estado de Goiás, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul, que juntos concentram mais de 90% do total produzido no país. De acordo com Bett et al. (2004), o grão de girassol representa uma importante alternativa de alimento energético e proteico para os ruminantes, disponibilizando uma maior quantidade de nutrientes e, dessa forma, permitindo um maior suporte à

produção animal. Apesar de limitante no aminoácido lisina, o girassol é uma importante fonte de proteínas para alimentação animal. A semente de girassol, além do alto rendimento em óleo, contém altos níveis de aminoácidos essenciais, principalmente os aminoácidos sulfurados (MURATE; PRUDENCIO-FERREIRA, 1999; TELLES, 2006). Os efeitos de sua inclusão nas dietas vêm sendo reportados em diversos trabalhos.

O óleo de girassol, dentre os óleos vegetais, apresenta uma das maiores concentrações de AGPI, principalmente o ácido linoléico. A semente de girassol possui cerca de 24% de proteínas e 47% de ácidos graxos em sua composição. A concentração de ácidos linoléico e oléico corresponde à 90% do total dos ácidos graxos presentes no óleo de girassol (MANDARINO, 1992). O óleo de girassol, assim como o de soja e de caroço de algodão, é rico em ácido linoléico (~68%) (PEREZ et al., 2004; STAPLES, 2009).

Queiroga e Durán (2010) avaliaram a composição química de ácidos graxos do óleo de seis genótipos de semente de girassol, cujo resultado é apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 – Variação da composição em ácidos graxos do óleo em função de seis genótipos de girassol

Genótipos	ÁCIDOS GRAXOS (%)				
	Palmítico (16:0)	Esteárico (18:0)	Oléico (18:1)	Linoléico (18:2)	Outros
Toledo-2	6,77	2,52	31,42	56,55	2,74
Peredovik	7,2	3,4	26	62,82	0,58
Narval	5,87	3,55	36,5	54,05	0,03
Girospan-70	5,87	4,2	26,37	62,4	1,16
Toledo-8	6,55	3,95	27,25	61,62	0,63
Monro-45	7,15	5,22	33,92	52,85	0,86

Fonte: Adaptada de Queiroga e Durán (2010).

De acordo com a Tabela 2, observa-se que a ordem de importância dos ácidos graxos das sementes de girassol é a seguinte: linoléico, oléico, palmítico

e esteárico, reiterando o conceito de que o ácido linoléico constitui o ácido graxo mais abundante na composição das sementes de girassol (QUEIROGA; DURÁN, 2010).

Telles (2006) caracterizou os grãos de três variedades de girassol (Catissol, EMBRAPA e uma variedade híbrida), e reportou teores de lipídios entre 27,6 e 34,4% para as variedades analisadas, além de obter teores de proteína que variaram de 15,3 a 20,2%, e teores de umidade nos grãos de 5,7 a 7,1%. O mesmo autor determinou a composição de ácidos graxos nas três variedades analisadas, sendo que o ácido graxo predominante foi o ácido linoléico (64,4 a 69,7%), seguido do ácido oléico (17,1 a 23,0%). Em relação aos ácidos graxos saturados, o ácido palmítico (entre 5,8 e 6,5%) e o ácido esteárico (entre 4,1 e 4,4%) foram os predominantes nas três variedades estudadas. Segundo Leite et al. (2005), a composição média das sementes de girassol é 4,8% de umidade, 19,9% de carboidratos totais, 24% de proteína, 47,3% de óleo, e 4% de cinzas, além de possuir em torno de 24% de fibra em detergente neutro (FDN),

Figueiroa (2010) ao avaliar o efeito da adição de lignosulfonato em dietas à base de grão de girassol peletizado ou não, concluiu que o processo de peletização do grão de girassol diminui o teor de gordura do leite e aumenta a razão de ácidos graxos ômega 6 e ômega 3 no leite de vacas Holandesas, o que pode ser explicado pelos altos teores de ômega 6 no grão de girassol. Além disso, o processo de peletização proporcionou uma liberação mais rápida dos ácidos graxos poliinsaturados presentes no grão para o ambiente ruminal, e a inclusão de lignosulfonato na dieta das vacas não foi eficiente em proteger os ácidos graxos oriundos do grão do girassol contra a biohidrogenação (MOHAMED et al., 1988 apud FIGUEROA, 2010). Dessa forma, essa liberação de ácidos graxos no rúmen pode ter favorecido a formação do cis-12 trans-10, um dos isômeros do ácido linoléico conjugado (CLA), responsável por reduzir a síntese de gordura na glândula mamária. Segundo González (2004), tal fenômeno é chamado de Síndrome de Depressão da Gordura, que consiste na ação da bactéria *Butyvibrio fabrisolvens*, alterando a síntese de alguns

isômeros do CLA. Segundo o autor, todos os ácidos graxos de cadeia longa que constituem a gordura do leite provêm da biohidrogenação no rúmen, sendo que uma enzima presente na glândula mamária (∆9-desaturase) não consegue modificar o isômero cis-12 trans-10, que altera o isômero biologicamente ativo cis-9 trans-11, resultando no decréscimo na porcentagem de gordura do leite. Entretanto, Medeiros (2002) enfatiza a necessidade de estudos individuais dos ácidos graxos, já que se passaram quase 30 anos entre a proposta da depressão da gordura do leite até a identificação dos isômeros trans-10 (cis-12 trans-10) como os agentes causais.

Schingoethe et al. (1996) forneceram dietas a base de grão de girassol e soja extrusada a vacas da raça Holandesa e observaram que o leite das vacas que receberam a soja extrusada e o grão de girassol apresentou um maior teor de ácidos graxos insaturados e de cadeia longa, quando comparados com os animais que receberam a dieta controle.

Macedo et al. (2008), avaliaram a composição tecidual e química do músculo *Longissimus dorsi* de cordeiros Suffolk alimentados com ração contendo diferentes percentuais de inclusão de semente de girassol (0%, 6,6%, 13,20% e 19,80%), e constataram que o aumento deste percentual de semente de girassol na ração alterou o perfil de ácidos graxos do músculo, sendo que elevou a quantidade dos ácidos insaturados oléico e linoléico e reduziu os ácidos graxos saturados láurico e palmítico, melhorando dessa forma a qualidade nutricional da carne dos cordeiros.

Fernandes et al. (2009) avaliaram as características químicas e a composição em ácidos graxos da carne de tourinhos, novilhos e novilhas da raça Canchim terminados em confinamento recebendo uma dieta contendo grãos de girassol, e observaram que tal dieta proporcionou maior quantidade de CLA e ácidos graxos poliinsaturados nos lipídios intramusculares, aumentando as relações ácidos graxos insaturados:saturados e poliinsaturados:saturados.

Para Mir et al. (2003), grãos de girassol, ricos em ácidos graxos poliinsaturados, aumentam a síntese de CLA no rúmen, como produto da

biohidrogenação do ácido linoléico, que por sua vez está presente em grande quantidade nesse alimento.

2.3 Metabolismo dos lipídios no rúmen

Um grande número de bactérias e protozoários produzem enzimas para degradar os lipídios dos alimentos consumidos pelos ruminantes. O número de microrganismos com tal função depende da quantidade e da natureza da dieta, da frequência de alimentação, ruminação, distribuição física e quantidade de protozoários e bactérias. As bactérias ruminais não apresentam triglicerídeos e são incapazes de sintetizar ácidos graxos poliinsaturados (com duplas ou triplas ligações entre os átomos de carbonos). Assim, tais bactérias incorporam em sua composição lipídica somente ácidos graxos saturados constituídos por ligações simples (MARQUES, 2003).

A maior parte dos ácidos graxos de cadeia longa, incorporados por bactérias e protozoários é do tipo saturado, devido ao processo de biohidrogenação presente no rúmen. Contrariamente, aproximadamente 88% da gordura ingerida que alcança o rúmen é do tipo insaturada, representada pelo ácido oléico (C18:1), ácido linoléico (C18:2) e ácido linolênico (C18;3). Após passar pelo processo biohidrogenação, 49,5% dessa mesma gordura corresponde àquela insaturada. Os 50,5% restantes correspondem aos ácidos graxos saturados mirístico, palmítico e esteárico (MARQUES, 2003).

Cerca de 80% do ácido linoléico e 92% do linolênico sofrem biohidrogenação no rúmen, tal evento constitui uma limitação ao fornecimento de ácidos graxos insaturados tanto para deposição no tecido adiposo quanto na incorporação no leite, pela glândula mamária. Entretanto, o excesso de ingestão desses ácidos graxos insaturados pelos animais pode interferir de maneira negativa na biohidrogenação, excedendo a capacidade dos microrganismos presentes no ambiente ruminal em realizar tal processo, proporcionando maior absorção intestinal de ácidos graxos insaturados

(MEDEIROS, 2002). De acordo com Kim et al. (2000), a bactéria *Butyrivibrio fibrisolvens* A38 pode produzir quantidades de CLA significativas no ambiente ruminal, desta forma o ácido linoléico em alta concentração promove a inibição da biohidrogenação, resultando no acúmulo de CLA no rúmen.

O metabolismo ruminal de lipídios e o processo de biohidrogenação foi descrito por Berchielli et al. (2006). Segundo estes autores, a taxa de liberação de gordura da matriz do alimento é um fator limitante do metabolismo de lipídios no rúmen, sendo que sementes de oleaginosas possuem os lipídios no germe, tornando necessária a degradação da parede celular para que a hidrólise se inicie. Após a liberação da matriz, os triacilgliceróis são hidrolisados a ácidos graxos e glicerol, processo chamado de lipólise.

A lipólise consiste no início do processo de metabolismo dos lipídios no rúmen, sendo imprescindível para que ocorra a biohidrogenação (HARFOOT; HAZLEWOOD, 1988 apud MAIA et al., 2011). Segundo Church (1998) apud Maia et al. (2011), as bactérias ruminais modificam rapidamente os lipídios da dieta em sua permanência no rúmen, hidrolisando-os a ácidos graxos, glicerol e outros compostos, dependendo da natureza do lipídio. O glicerol liberado é utilizado para produção de ácidos graxos voláteis, entretanto, as bactérias não são capazes de utilizar os ácidos graxos para produção de energia. Uma vez hidrolisados, os ácidos graxos passam pelo processo de biohidrogenação, que consiste na adição de hidrogênio nas ligações duplas, aumentando o grau de saturação destes. A taxa de lipólise que ocorre no ambiente ruminal pode variar de acordo com a composição dos ácidos graxos e o percentual de inclusão de gordura na dieta (NRC, 2001).

Ácidos graxos poliinsaturados, presente em grande quantidade em sementes de oleaginosas como a semente de girassol, são tóxicos aos microrganismos presentes no rúmen, principalmente as bactérias gram positivas, metanogênicas e protozoários que são mais susceptíveis à toxicidade desses ácidos graxos. Dessa forma, os microrganismos ruminais desenvolveram a biohidrogenação como um mecanismo de defesa, promovendo a transformação de ácidos graxos insaturados em saturados. Os

AGPI, principalmente os ácidos linoléico e linolênico, liberados pela quebra da ligação éster são hidrogenados pelas bactérias (Figura 3), tendo como produto final o ácido esteárico (BONDI, 1987 apud MAIA et al., 2011).

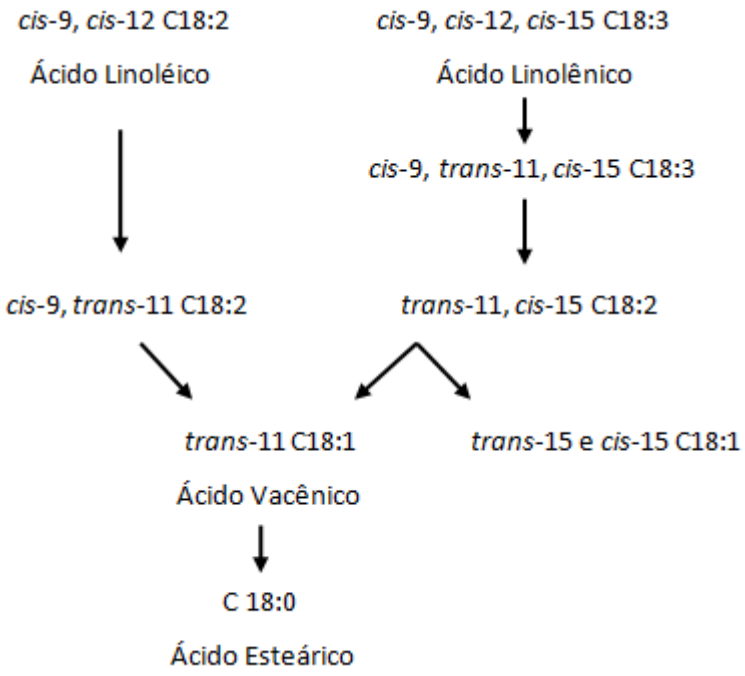


FIGURA 3 – Vias de biohidrogenação ruminal do ácido linoléico e linolênico: o ácido linoléico transforma-se em cis-9, trans-11 C18:2, este posteriormente em ácido vacênico e finalmente a ácido esteárico; o ácido linolênico transforma-se em cis-9, trans-11, cis-15 C:18:3, este posteriormente em trans-11, cis-15 C18:2 que transforma-se em ácido vacênico e finalmente a ácido esteárico.

Fonte: Adaptada de Harfoot; Hazlewood (1997) apud Maia et al. (2011).

O ácido cis-9 trans-11 dieno conjugado, também chamado de ácido linoléico conjugado (CLA) é um produto da biohidrogenação incompleta do ácido linoléico, pela ação da enzima isomerase proveniente de bactérias fermentativas presentes no rúmen, como a *Butyrivibrio fibrisolvens*, que isomeriza o ácido linoléico preferencialmente para as formas cis-9 e trans-11 (KEPLER et al., 1966). A estrutura do ácido linoléico e de dois de seus isômeros conjugados pode ser observada na Figura 4.

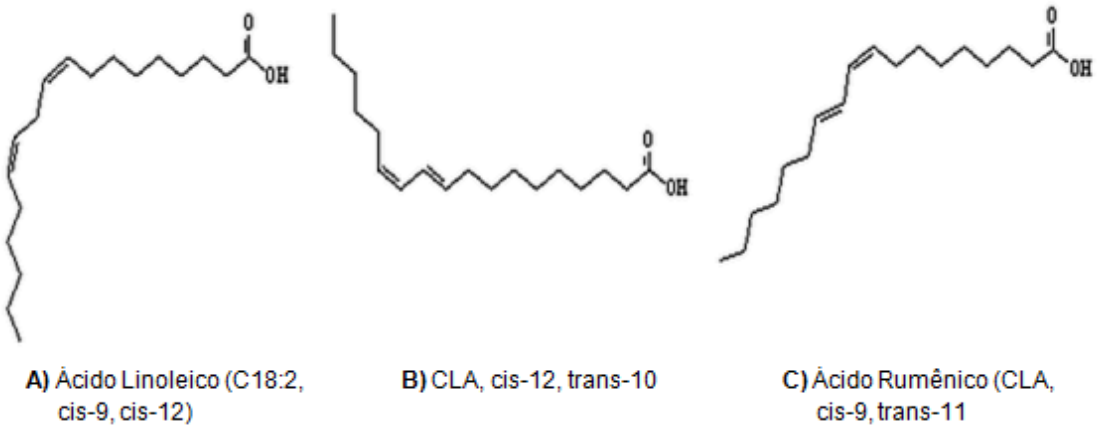


FIGURA 4 – Estrutura do ácido linoléico (A) e de dois de seus isômeros conjugados (B e C).

Fonte: Adaptada de Funck et al. (2006).

De acordo com Medeiros (2002), dentre os diversos isômeros de CLA, dois deles assumem grande importância: C18:2 Cis-9 Trans-11, que apresenta efeito anticarcinogênico e ainda atua na modulação do sistema imune. Outro isômero é o C18:2 Trans-10, Cis-12, um potente repartidor de nutrientes. Apesar da pequena diferença de posição e geometria de ligação, essas moléculas possuem ações distintas e intensas no metabolismo animal, mesmo em quantidades reduzidas na dieta (0,1-1% da MS), pelo fato de interferirem diretamente nos processos básicos do metabolismo.

A biohidrogenação envolve vários passos bioquímicos, onde diferentes grupos de bactérias ruminais catalisam essas conversões, e desse modo Kemp e Lander (1984) apud Modesto et al. (2002), dividiram essas bactérias em dois grupos: o grupo A são bactérias que hidrogenam principalmente o ácido linoléico à ácido vacênico (C18:1 trans-11, forma isômera do ácido linoléico); o grupo B é formado por bactérias que utilizam principalmente o C18:1 trans-11 como substrato, obtendo como produto final o ácido esteárico (C18:0). Se os ácidos graxos estão em uma concentração elevada no rúmen, a etapa final da biohidrogenação é inibida e, consequentemente, a concentração ruminal de ácido vacênico (C18:1 trans-11) aumenta. De acordo com Soares (2009), para que ocorra a biohidrogenação completa de um ácido graxo poliinsaturado, se

torna necessário a ação de ambos os grupos de bactérias citados anteriormente. Dessa forma, dietas ricas em concentrado, que propiciam a queda do pH ruminal e, consequentemente, provocam a inibição da lipólise, e também o fornecimento de ionóforos inibem o passo final da biohidrogenação, provocando o acúmulo do ácido vacênico (C18:1, trans-11).

Vários trabalhos foram realizados para diminuir esses efeitos da biohidrogenação dos lipídios no rúmen com o uso de diferentes técnicas de proteção das gorduras. Uma dessas técnicas foi obtida em 1984 associando os ácidos graxos ao cálcio, também chamado de sais de cálcio, que originou o produto Megalac® (DOREAU; CHILLIARD, 1997 apud LOPES, 2009). Este produto é uma gordura granular composta de sais de cálcio de óleo de palma contendo ácidos graxos saturados (palmítico e esteárico) e insaturados (ácido linoleico e ácido linolênico). Esta proteção é determinada pela cisão dos triglicerídeos do óleo. Os ácidos graxos reagem com sais de cálcio, unidos em forma de sal, popularmente chamados de sabões de cálcio (ARM; HAMMER, 2006 apud LOPES, 2009). Esta gordura, por ser um produto estável em água e a alta temperatura, é digerida somente em meio ácido. No rúmen, o meio é ligeiramente ácido (pH = 6,2), que faz com que ela atravesse praticamente intacta. Ao chegar ao abomaso, onde o meio é ácido (pH médio = 2 a 3), ocorre o desdobramento do Megalac resultando na liberação dos ácidos graxos e íons de cálcio para o intestino, onde serão absorvidos (ARM; HAMMER, 2006 apud LOPES, 2009).

Outra forma de reduzir a biohidrogenação ruminal é através do fornecimento de sementes de oleaginosas, pois essas são fisicamente protegidas do processo de biohidrogenação, devido à casca, tornando a gordura indisponível quimicamente para a biohidrogenação ruminal (DUCKETT, 2003, apud AFERRI et al., 2005). Os grãos inteiros das oleaginosas possuem uma taxa de liberação lenta de óleo, reduzindo o efeito negativo da gordura sobre a digestibilidade da fibra. O menor processamento sobre o grão da oleaginosa favorece a uma menor disponibilidade do óleo contido na semente no meio ruminal e, dessa forma, reduz os efeitos deletérios

aos microrganismos ruminais (BETT, 2004; COPPOCK; WILKS, 1991). Concomitantemente, a biohidrogenação será reduzida, aumentando os ácidos graxos insaturados livres passantes no rúmen como fonte de gordura dietética para ruminantes, fato que tem sido estimulado com o intuito de melhorar a qualidade dos alimentos produzidos (BETT, 2004).

Adicionalmente, Juchem (2007) demonstrou que quando são fornecidos óleos desprotegidos ou sais de cálcio de cadeia longa para vacas lactantes, mais de 70% do ácido linoléico e mais de 85% do ácido linolênico fornecidos são biohidrogenados no rúmen. O mesmo autor relata que somente o fornecimento de uma fonte extremamente rica nesses ácidos graxos torna possível a resistência dos mesmos à biohidrogenação ruminal, condição fundamental para que os mesmos possam ser absorvidos no intestino delgado.

2.4 Efeitos da suplementação lipídica na reprodução

A influência da nutrição sobre o desempenho reprodutivo é um tema que tem gerado muito interesse entre os pesquisadores, incluindo a avaliação dos efeitos da suplementação com gorduras. As gorduras e óleos são nutrientes essenciais na alimentação humana e animal, pois proporcionam uma fonte altamente concentrada de energia, além de serem componentes críticos na estrutura física e funcional das células. A impossibilidade dos animais, diferente dos vegetais, de sintetizar estes ácidos graxos a partir de precursores estruturalmente mais simples, deve-se a carência de enzimas específicas para tal síntese (NRC, 2007; SANTOS et al., 2008).

As principais famílias de ácidos graxos essenciais envolvidas na reprodução de bovinos são os ácidos graxos linolênico e linoléico. Tais efeitos são determinados tanto pela quantidade total destes ácidos graxos como pela proporção existente entre ambos (LOPES, 2009).

O mecanismo de ação das gorduras via incremento energético ou via fornecimento de ácidos graxos essenciais, ainda não está bem esclarecido. Em

vários estudos verificou-se o impacto positivo da suplementação com gordura na eficiência reprodutiva de bovinos de corte e leite (FERGUSON et al., 1990; GARCIA-BOJALIL et al., 1998; SKLAN et al., 1991; STAPLES et al., 1998). Os mecanismos envolvidos em tal incremento reprodutivo referem-se ao desenvolvimento de um maior folículo e corpo lúteo (VASCONCELOS et al., 2001), maior desenvolvimento do embrião (FOULDI-NASHTA et al., 2007) e inibição da produção de PGF2α pelo útero com atraso da luteólise (STAPLES et al., 2009).

Outro possível mecanismo associado à melhoria da concepção pela suplementação com ácidos graxos poliinsaturados é a necessidade do embrião por ácidos graxos essenciais (HAGGARTY et al., 2006), o que poderia explicar a melhor qualidade dos embriões e desenvolvimento embrionário (CERRI et al., 2004; RYAN et al., 1992; THANGAVELU et al., 2007; THOMAS; WILLIAMS, 1995). Entretanto, o mecanismo mais aceito é que a inclusão de uma dieta com alta densidade energética altera o desenvolvimento folicular (STAPLES; THATCHER, 2005), aumenta a concentração de P4 (STAPLES et al., 1998), diminui os sinais luteolíticos durante o reconhecimento materno da gestação (MATTOS et al., 2000) e melhora a qualidade do embrião (CERRI et al., 2004).

Incrementos na fertilidade de vacas têm sido associados com o aumento da concentração circulante de P4 durante a fase luteolítica. A adição de gordura nas dietas tem mostrado consistentes aumentos no colesterol plasmático e no colesterol contido no conteúdo folicular e luteal (HAWKINS et al., 1995; LAMMOGLIA et al., 1996; RYAN et al., 1992; STAPLES et al., 1998; WILLIAMS, 1989). Nesse contexto, o colesterol serve como precursor para a síntese de P4 em células luteais (GRUMMER; CARROLL, 1991).

Sangsritavong et al. (2002) e Lopes et al. (2009), realizaram estudos utilizando vacas ovarectomizadas e verificaram que o aumento das concentrações séricas de P4 possa ser consequência de uma menor metabolização da mesma pelo fígado. O aumento da concentração de P4 no início do diestro mostrou-se associado ao aumento da taxa de concepção (DEMÉTRIO et al., 2007).

Ferguson et al. (1990) fornecendo 2% de gordura granulada/animal/dia quando comparado ao grupo controle observaram um aumento na taxa de concepção no primeiro serviço de 59,1% vs. 42,6%; e em todos os serviços observaram um aumento de 59,3 vs. 40,7%. Em vacas suplementadas a pasto com 350g de ácidos graxos, ocorreu um aumento nas taxas de prenhez depois da primeira inseminação pós-parto (MCNAMARA et al., 2003). Com o fornecimento de sais de cálcio de cadeia longa, foi possível aumentar a taxa de prenhez em vacas de leite (SCHNEIDER et al., 1988; SKLAN et al., 1991) Em outros estudos não se observaram incrementos nas taxas de fertilidade de vacas leiteiras suplementadas com sais de cálcio de cadeia longa (SCOTT et al., 1995; SKLAN et al., 1994) ou sementes oleaginosas (SCHINGOETHE; CASPER, 1991), podendo ser atribuído um aumento na produção de leite a um ganho de peso (SKLAN et al., 1991; SKLAN et al., 1994).

Quando vacas leiteiras da raça Holandesa foram suplementadas com 750g de gordura de semente de linhaça, rica em ácido linolênico, ou semente de girassol, rica em ácido linoléico, as taxas de prenhez foram maiores nas vacas suplementadas com ácido linolênico (AMBROSE et al., 2006). No entanto, resultados similares não foram encontrados por outros autores que usaram a semente de linhaça (FUENTES et al., 2008; PETIT; TWAGIRAMUNGU, 2006). Similarmente, o fornecimento de ácido linolênico proveniente de óleo de peixe não promoveu o aumento das taxas de prenhez na primeira IA pós-parto quando comparadas com o fornecimento de sebo bovino (JUCHEM, 2007), embora a taxa de prenhez tenha sido maior na segunda IA, para vacas alimentadas com ácido linolênico. Juchem (2007) avaliou o efeito do fornecimento de sais de cálcio de cadeia longa de óleo de palma ou a mistura de ácido linoléico e trans-octadecanóico, para vacas de leite no pré e pós-parto. Vacas que receberam ácidos graxos insaturados tiveram maior taxa de prenhez quando comparadas com vacas suplementadas com óleo de palma.

Wilkins et al. (1996) alimentaram vacas de corte com uma dieta de caroço de algodão descascado, tratado com formol. Tal dieta era rica em ácido

linoléico protegido, que escapa a biohidrogenação no rúmen. Vacas controle receberam farinha de caroço de algodão peletizada. As taxas de concepção no primeiro (61% vs. 46%) e segundo (71% vs. 56%) ciclo estral foram maiores para as vacas que receberam a dieta rica em ácido linoléico.

2.4.1 Efeitos da suplementação lipídica no endométrio

Petit et al. (2006); Williams; Stanko (1999) e Staples et al. (1998) sugerem que a suplementação com ácidos graxos poliinsaturados promove um atraso na luteólise por inibir a síntese de PGF2α. Alguns estudos reportam a possibilidade de controlar os eventos reprodutivos através de manipulações da dieta, visto que controlando os ingredientes da dieta se pode alterar a composição lipídica do útero tornando-o menos luteolítico (LOPES, 2009; MATTOS et al., 2000; MATTOS et al., 2002; MATTOS et al., 2004; PETIT et al., 2004; ROBINSON et al., 2002; STAPLES et al., 2009; THATCHER et al., 1997; WILKINS et al., 1996).

No organismo o ácido linoléico, representante do ômega 6, é convertido em ácido araquidônico, precursor das prostaglandinas dienóicas, como a PGF2α. O ácido linoléico e o linolênico utilizam as mesmas enzimas para a metabolização. As enzimas elongase e dessaturase atuam na conversão do ácido linoléico em ácido araquidônico e também na conversão do ácido linolênico a ácido eicosapentaenóico, precursor das prostaglandinas trienóicas, como a prostaglandina 3α (PGF3α). A série de prostaglandina a ser produzida depende da quantidade do substrato. Sabe-se que o aumento de ácido linolênico na dieta diminuirá a produção de prostaglandina dienóica (WATHES et al., 2007). Entretanto, pode-se aumentar a produção de PGF2α quando se aumenta a disponibilidade de ácido araquidônico (STAPLES et al., 1998). Sugere-se que exista uma relação entre a proporção de AGPI e a ação dos mesmos, inibindo ou estimulando a produção de PGF2α, porém não foram

encontrados estudos citando especificamente a melhor relação entre ambos na dieta (WATHES et al., 2007).

O ácido linoléico apresenta uma ação inibidora da enzima cicloxigenase-2 (COX-2), fundamental para a síntese de PGF2α (MATTOS et al., 2003). Dois outros lipídios, encontrados em alguns tipos de peixe de águas geladas, foram descritos com atividade inibidora da enzima COX-2. Tais lipídios referem-se aos ácidos eicosapentanóico (EPA; 20:5n-3) e docosahexanóico (DHA; 22:6n-3) (MATTOS et al., 2003; THATCHER et al., 2001). Thatcher et al. (1997) alimentaram vacas holandesas não lactantes com farinha de peixe do Manhaden durante 25 dias e mediram as concentrações plasmáticas de 15-ceto-13,14-diidroprostaglandina F2α (PGFM), este o principal metabólito da PGF2α (PIPER et al., 1970), após a administração de estradiol e ocitocina no 15º dia do ciclo estral. Os mesmos autores verificaram que a farinha de peixe do Manhaden inibiu o pico de PGFM ocasionado pelo estradiol e pela ocitocina em comparação com a dieta controle, que não continha a farinha de peixe. Mattos et al. (2002) confirmaram tais resultados para vacas em lactação. Vacas leiteiras alimentadas com óleo de peixe durante o período de transição aumentaram as concentrações de EPA e DHA no tecido caruncular e reduziram a concentração de PGFM no pós-parto, comparadas com vacas alimentadas com óleo de oliva (MATTOS et al., 2004). Inversamente, quando fornecida gordura rica em ácido linoléico, a PGFM plasmática aumentou após a administração de ocitocina (PETIT et al., 2004; ROBINSON et al., 2002). Assim, a suplementação lipídica pode inibir ou estimular a secreção de PGF2α, dependendo da fonte de ácido graxo específico.

2.5 Vias de síntese, sinalização e metabolismo dos eicosanoides

A distribuição de ácidos graxos essenciais no plasma é modulada pela ingestão dietética assim, manipulações alimentares influenciam diretamente importantes propriedades de regulação de tais ácidos graxos, como funções de

primeiro e segundo mensageiro, formação de eicosanoides, liberação de citocinas, funções de receptores e composição da membrana celular (ANGULO-GUERRERO; OLIART, 1998; WALLACE et al., 2003).

Os eicosanoides são metabólitos oxigenados dos ácidos graxos essenciais. A família dos eicosanoides é composta por prostaglandinas, leucotrienos, prostaciclinas, tromboxanos e derivados dos ácidos graxos hidroxilados. Os substratos para a formação dos eicosanoides são o ácido diomo-gama-linolênico, ácido araquidônico (AA) e ácido eicosapentaenóico. Para a síntese destas substâncias, o ácido graxo precursor é clivado a fosfolipídios de membrana pela ação da enzima fosfolipase A2 (PLA2) ou fosfolipase C (PLC), dependendo do subtipo fosfatidil ao qual o ácido graxo está ligado (KÖNIG et al., 1997).

Conforme ilustrado na Figura 5, a grande parte dos eicosanoides relevantes deriva do AA através de diferentes vias de síntese.

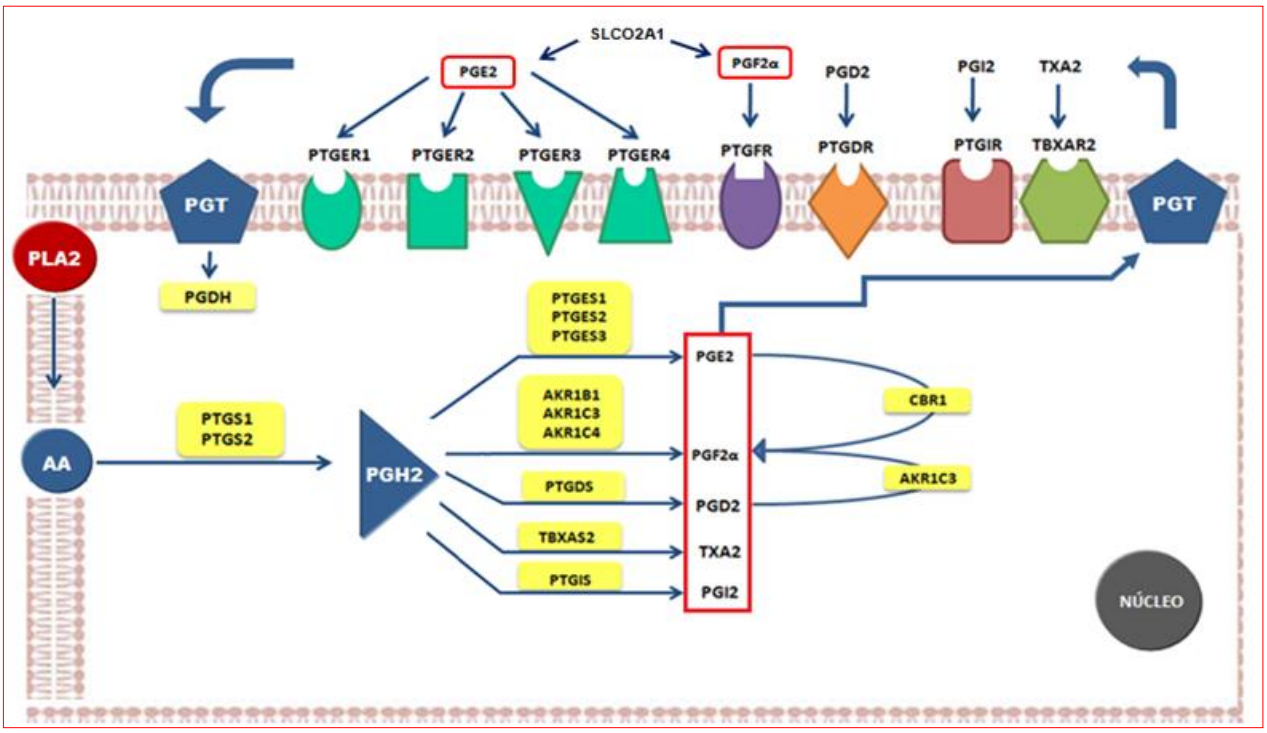


FIGURA 5 – Via de síntese, sinalização e metabolismo de eicosanoides no endométrio de fêmeas bovinas: a enzima fosfolipase citosólica A2 (PLA2) libera o ácido araquidônico (AA) da membrana fosfolipídica, este pode ser convertido pela cicloxigenase 1 (PTGS1) ou cicloxigenase 2 (PTGS2) à PGH2, esta precursora de todos os prostanoides. A PGH2 é convertida pelas enzimas PGE sintases (PTGES1, PTGES2 ou PTGES3) em PGE2; PGF sintase (AKR1B1, AKR1C3, AKR1C4) em PGF2α, PGD sintase (PTGDS) em PGD2; TXAs sintase (TBXAS2) em TXA2 ou PGI sintase (PTGIS) no produto PGI2. Depois de sintetizadas, a PGD2 pode ser convertida à PGF2α pela ação da enzima AKR1C3, assim como a PGE2 que pode ser convertida à PGF2α pela ação da enzima CBR1. A seguir, os prostanoides atravessam a membrana plasmática passivamente ou por transporte facilitado. Uma vez no exterior das células, os prostanoides se ligam aos seus receptores específicos: a PGE2 aos receptores PTGER-1, PTGER-2, PTGER-3, PTGER-4; a PGF2α ao PTGFR; a PGD2 ao PTGDR; a PGI2 ao PTGIR e o tromboxano A2 ao TBXAR2. A PGE2 e PGF2α podem entrar na célula alvo por transporte facilitado utilizando a proteína transportadora de membrana SLCO2A1 ou podem ser inativadas pela enzima PGDH.

Fonte: Adaptada de Oliveira (2013).

O AA é clivado pela ação das PLA2 e após sua clivagem o AA livre no citosol é oxigenado pelas enzimas cicloxigenases. Existem duas isoformas de COX, a Prostaglandina Endoperóxido H Sintase 1 (PTGS1 ou COX-1) e a Prostaglandina Endoperóxido H Sintase 2 (PTGS2 ou COX-2). A PTGS1 é uma enzima expressa de forma constitutiva nos tecidos, enquanto a expressão de PTGS2 ocorre a partir de estímulos celulares. Ambas isoformas das COX possuem a função de converter o AA à Prostaglandina G2 (PGG2). Subsequentemente, peroxidases realizam a redução de PGG2 à Prostaglandina H2 (PGH2), conhecida como o principal substrato predecessor na síntese de todos os prostanoides (SMITH; DEWITT; GARAVITO, 2000). Assim, cada prostanoide é sintetizado a partir da PTGS2, por atividade de enzimas específicas de síntese de prostaglandinas (PGs), prostaciclinas (PCI) e tromboxanos (TXs).

Quando a via de metabolização é a da cicloxigenase, há a formação de endoperóxidos lábeis como os prostanoides: PGs, TXs e PCI. Os prostanoides são substâncias muito potentes mesmo estando em concentrações muito baixas e também possuem uma meia-vida muito curta (menor que 1 minuto), sendo degradados rapidamente a metabólitos com fraca ou nenhuma atividade (KÖNIG et al., 1997).

As PGs compreendem muitos subtipos, os quais possuem diferentes funções. A prostaglandina E (PGE) tem sido amplamente investigada, em função do seu importante papel como imunomoduladora. Entre os tromboxanos, apenas o tromboxano A (TXA) é ativo, sendo o TXB inativo. Todos aqueles metabólitos formados a partir de ácido araquidônico (o precursor mais importante) recebem um sufixo “2” (PGE2, TXA2, PCI2) e aqueles oriundos do ácido eicosapentaenóico recebem o sufixo “3” (PGE3, TXA3, PCI3). O ácido diomo-gama-linolênico origina prostaglandinas do tipo 1, das quais a PGE1 é a mais importante do grupo (ANDRADE; CARMO, 2006).

As enzimas pertencentes à família aldo-cetoredutase (AKR) AKR1B1, AKR1C3 e AKR1C4, convertem a PGH2 a PGF2α. Contudo, outras prostaglandinas podem servir de substrato para a síntese de PGF2α. Por

exemplo, a PGD2 pode ser convertida pela AKR1B1 ao metabólito 9α, 11βPGF2 e a PGE2 ser transformada pela CBR1 em PGF2α (ACTIVITY et al., 1998; KANKOFER; WIERCINSKI, 1999; KANKOFER; WIERCINSKI; ZERBE, 2002; SCENNA et al., 2004).

Atualmente foram identificadas duas sintases de PGD2 distintas: enzima PGDS (L-PGDS; tipo lipocalina) e PGDS (H-PGDS; tipo hematopoiética) ambas possuem a capacidade de converter PTGS2 em PGD2 (GABLER et al., 2009).

A PGE2 possui quatro subtipos de receptores (PGER1, PGER2, PGER3 e PGER4) que uma vez ativados promovem diferentes efeitos celulares. Os receptores PGER2 e PGER4 estão ligados à proteína G e após serem ativados estimulam a liberação de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). Em bovinos foram identificadas mais quatro isoformas de PGER3 (EP_{3A}, EP_B, EP_C, EP_D). Estas isoformas apresentam semelhante especificidade aos seus agonistas e, entretanto, estão ligadas a diferentes proteínas G que promovem diferentes formas de sinalização intracelular, permitindo tanto respostas estimulantes como inibitórias sobre o AMPc. Além disso, como os receptores PTGER3, promovem a mobilização do cálcio intracelular e de inositol trifosfato (IP3) quando ativados (COLEMAN; SMITH; NARUMIYA, 1994). Assim, os efeitos biológicos da PGE2 dependerão do tipo de receptor expresso. Os receptores PGFR induzem aumento da mobilização intracelular de cálcio por mecanismo independente de IP3. Os receptores PTGDR são acoplados a proteína G estimulando a adenilato ciclase, e assim, também aumentam o AMPc (NARUMIYA; SUGIMOTO; USHIKUBI, 1999). Assim, essa variedade de receptores e suas especificidades, aliada às diversas isoformas de prostaglandinas possibilitam uma ampla diversidade de respostas biológicas.

Da mesma forma que as prostaglandinas e prostaciclinas, os tromboxanos são sintetizados a partir da PGH2 por sintases específicas que exercem suas funções biológicas através de receptores específicos localizados na superfície das células-alvo (NARUMIYA; FITZGERALD, 2001). Até o momento não foram identificadas isoformas de PGI2 ou de TBXA2 em bovinos.

Desta forma, PTGIS e TBXAS1 são as únicas enzimas responsáveis pela síntese de PGI2 e de TBXA2, respectivamente.

2.6 Análise morfométrica de glândulas endometriais e suas implicações

A morfometria foi utilizada com sucesso para monitorar mudanças patológicas no endométrio bovino (GONZALEZ et al., 1985) e para estudar os efeitos de drogas e hormônios no endométrio humano (JOHANNISSON et al., 1991). No endométrio humano, o diâmetro glandular nas fases proliferativa e secretora tem sido correlacionado com os níveis de estrogênio e P4 (JOHANNISSON et al, 1987). Mais recentemente, em ruminantes, a morfometria foi também aplicada à análise da morfogênese de glândulas uterinas (CARPENTER et al., 2003; GRAY et al., 2001).

Estudos relatam a ocorrência de alterações na morfologia celular do endométrio de bovinos durante o ciclo estral e no início da gestação (KOJIMA; SELANDER, 1970; GUILLOMOT; GUAY, 1982; MARINOV; LOVELL, 1968; STINSON et al., 1962). As características histológicas do endométrio mudam qualitativamente durante o ciclo estral. Alterações não foram observadas no perímetro ou área das glândulas endometriais quando comparou-se os dias 0, 8 e 16 do ciclo estral (WANG et al., 2007).

Em vacas Holandesas multíparas verificou-se uma correlação negativa da concentração circulante de P4 plasmática com a área total do endométrio, perímetro e área das glândulas endometriais nos dias 5 e 8 do ciclo estral. Isto indica que uma maior concentração de P4 no dia 5, está associada a uma menor área total do endométrio no dia 8, e sugere que a espessura endometrial e tamanho das glândulas durante a fase secretória precoce podem ser reguladas pela velocidade que os níveis de P4 sobem durante a formação do corpo lúteo. Em contraste, a densidade de ductos glandulares no dia 8 foi associada positivamente com as concentrações de P4 no dia 5. Esta resposta reflete provavelmente na diminuição da área do endométrio, em resposta a um

elevado nível de P4 no dia 5, o mesmo número de ductos glandulares que ocupam uma área reduzida (WANG et al., 2007).

Alguns autores relatam que o número de glândulas endometriais não muda durante o ciclo natural (JOHANNISSON et al., 1987 , 1991; WAHAB et al., 1999). Dhaliwal et al. (2002) utilizaram análises bidimensionais e tridimensionais para avaliar as alterações das glândulas endometriais bovinas entre as fases folicular e lútea. Segundo esses autores, a área superficial média das glândulas por unidade de área de endométrio no local intercaruncular em novilhas e vacas era de aproximadamente 18 mm^2/mm^2 na fase folicular e 26 mm^2/mm^2 na fase lútea, números semelhantes para a área da glândula encontrada em mulheres. Em novilhas, o volume da glândula intercaruncular aumentou significativamente, em cerca de 30%, durante a fase luteínica do ciclo estral, 0,01-0,13 por mm^3. A espessura do endométrio das vacas foi sempre maior do que das novilhas, independentemente do local de amostragem.

V. OBJETIVOS

Com o presente estudo teve-se o objetivo geral de avaliar o efeito e os mecanismos pelos quais a suplementação com semente de girassol atua na performance reprodutiva de fêmeas bovinas de corte.

Objetivou-se especificamente com o Experimento 1 avaliar o efeito da suplementação contendo semente de girassol nas taxas de concepção 23 dias após a TETF em receptoras de embriões produzidos *in vitro*.

Objetivou-se especificamente com o Experimento 2: a) comparar as concentrações plasmáticas de colesterol total, triglicerídeos, lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e P4, em vacas suplementadas ou não com semente de girassol no D1, D7, D11, D15, D19 e D22 do ciclo estral; b) identificar e comparar o perfil de ácidos graxos no tecido endometrial em vacas suplementadas ou não com semente de girassol; c) analisar a abundância relativa dos transcritos dos genes de PTGES1, PTGES2, AKR1B1, AKR1C4, PTGS2, PTGER2, PTGER4 e PLA2G10, envolvidos na biossíntese de eicosanoides, no endométrio de vacas suplementadas ou não com semente de girassol no D6, D14 e D22 do ciclo estral e d) comparar o número, diâmetro, perímetro e área total das glândulas endometriais, em vacas suplementadas ou não com semente de girassol no D7, D15 e D23 do ciclo estral.

VI. HIPÓTESE

A hipótese no presente estudo, é que a suplementação com semente de girassol promove um incremento na taxa de concepção de receptoras de embriões produzidos *in vitro* submetidas à TETF (Experimento 1) e que tal efeito decorra de modificações na composição lipídica plasmática e endometrial, alterações na expressão de transcritos envolvidos na biossíntese de eicosanoides e/ou modificações no número e/ou morfometria das glândulas endometriais (Experimento 2).

VII. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Experimento 1

5.1.1 Local do experimento

O manejo dos animais, assim como as coletas dos materiais biológicos foram conduzidos na Central de Receptoras Retorno, localizada no município de Coroados, estado de São Paulo, Brasil. O tratamento dos animais e coleta de materiais biológicos foram realizados de julho a setembro de 2012. A análise bromatológica foi realizada em outubro de 2012, no Laboratório de Bromatologia e Análise de Alimentos, sediado na Faculdade de Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Campus de Dracena/SP, Brasil. A mensuração das concentrações plasmáticas de P4, pela técnica de Radioimunoensaio, foi realizada em dezembro de 2012 no Laboratório de Endocrinologia Animal, sediado na Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP, Campus de Araçatuba/SP, Brasil, com a colaboração do Prof. Dr. Guilherme de Paula Nogueira. A mensuração das concentrações plasmáticas de colesterol total, triglicerídeos, HDL e LDL foi realizada de novembro a dezembro de 2012, no Laboratório de Fisiologia da Reprodução (LFER), sediado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP), Campus de Pirassununga/SP, Brasil, com a colaboração do Prof. Dr. Ed Hoffmann Madureira.

5.1.2 Animais

Foram utilizadas novilhas mestiças (n = 217) de idade variada, sendo estas provenientes dos seguintes cruzamentos: Nelore x Abeerdeen Angus (n

= 139), Nelore x Simental (n = 65) ou Nelore x Pardo Suíço (n = 13). As novilhas foram pesadas individualmente e avaliadas quanto ao escore de condição corporal (ECC - escala de 1 a 9) e classificadas da seguinte forma: escore 3 (n = 15; 6,91%), 4 (n = 144; 66,36%) e 5 (n = 58; 26,73%). O peso médio das novilhas foi de 356,22kg ± 1,04kg no Grupo Controle e 357,62kg ± 1,07kg no grupo tratado com semente de girassol. As novilhas foram avaliadas quanto à condição ovariana no dia de início do protocolo de sincronização do estro e ovulação e classificadas da seguinte forma: Condição 1, quando observou-se ovário com a presença de um corpo lúteo (n = 133; 61,29%); Condição 2, quando observaram-se ovários com presença de folículos grandes e ausência de corpo lúteo (n = 53; 24,42%) e Condição 3, quando observaram-se ovários pequenos com folículos pequenos (n = 31; 14,29%). Os animais foram divididos equitativamente em dois grupos (Grupo Controle e Grupo Girassol) segundo raça, peso, ECC e condição ovariana. Foram realizadas cinco repetições experimentais, onde o número de animais por tratamento foi dividido equitativamente em cada uma das repetições. Segundo as repetições, os animais foram divididos da seguinte maneira: repetição 1 (n = 30), 2 (n = 41), 3 (n = 29), 4 (n = 101) e 5 (n = 16); totalizando 217 animais. Todos os procedimentos realizados na execução do referido estudo foram aprovados pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA), da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Campus Experimental de Dracena, certificando que os procedimentos utilizando animais estão de acordo com os “Princípios Éticos de Experimentação Animal” (Protocolo nº 26/2012).

5.1.3. Sincronização do estro e ovulação

O protocolo para a realização da TETF foi realizado em dias aleatórios do ciclo estral. Para tanto, conforme representado na Figura 6, as novilhas foram submetidas à sincronização dos estros pelo uso de um dispositivo intravaginal contendo 1g de P4 impregnada em 28g de silicone

(CRONIPRESS®; Biogenesis Bago), associado a uma injeção de 2mg de benzoato de estradiol (BIOESTROGIN®; Biogenesis Bago), via intramuscular (IM). O dia da colocação do dispositivo foi considerado o D-10. Oito dias após a colocação do dispositivo (no D-2) realizou-se a retirada do mesmo, e os animais receberam uma injeção de 150µg de D-cloprostenol (CRONIBEN®; Biogenesis Bago) e 400UI de Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG; Folligon®; Intervet), ambos via IM. Após 24 horas da retirada do implante (D-1), as fêmeas receberam uma injeção de 1mg de benzoato de estradiol (BIOESTROGIN®; Biogenesis Bago), via IM. O D0 foi considerado o dia esperado para o estro. A TETF foi realizada no D7.

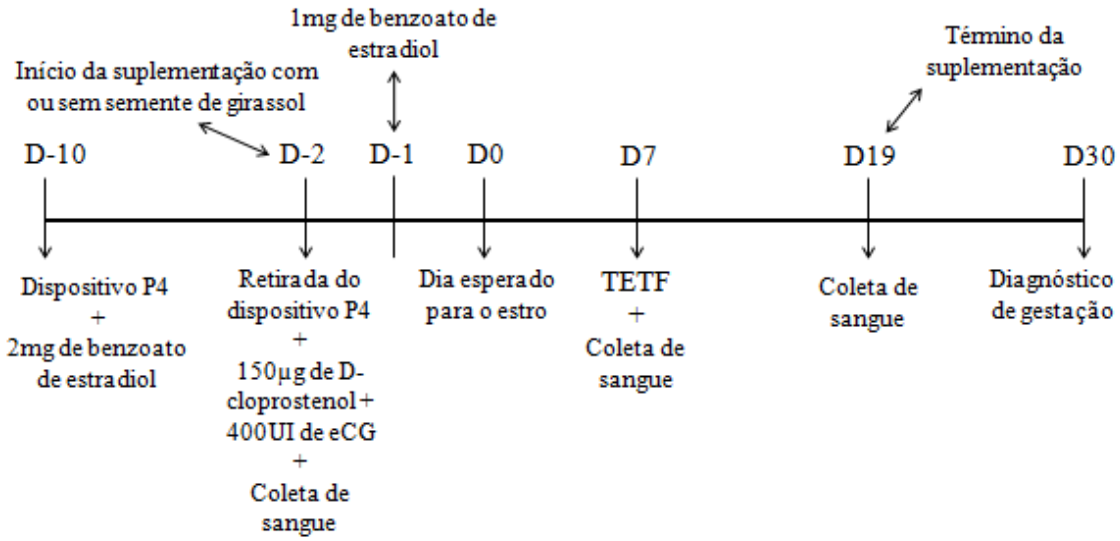


FIGURA 6 – Representação esquemática do delineamento referente ao Experimento 1, colocação do dispositivo intravaginal com P4 associado a 2mg de benzoato de estradiol (D-10), retirada do dispositivo intravaginal associado a administração de 150µg de D-cloprostenol e 400UI de eCG (D-2), fornecimento de suplemento sem (Grupo Controle; n = 111) ou com semente de girassol (Grupo Girassol; n = 106) do D-2 ao D19, administração de 1mg de benzoato de estradiol (D-1), realização da TETF (D7), coletas de sangue realizadas no D-2, D7 e D19 e diagnóstico de gestação por ultrassonografia no D30, receptoras mestiças de embrião.

5.1.4 Administração dos tratamentos

Após a remoção do implante (D-2), as fêmeas foram divididas em dois grupos para receberem, durante 22 dias, 1,7kg/animal/dia de um dos seguintes suplementos: 53% de farelo de soja com 44% de Proteína Bruta (PB) + 47% de milho (Grupo Controle; n = 111) ou 40% de farelo de soja 44% de PB + 60% de semente de girassol (Grupo Girassol; n = 106). No Grupo Girassol, utilizou-se a inclusão de 9% de semente de girassol na matéria seca (MS), quantidade máxima para que não seja ultrapassado o limite máximo de 5% de extrato etéreo (EE) do concentrado. Os suplementos utilizados em ambos os grupos foram igualmente balanceados em energia e proteína, ambos com 72% de nitrogênio digestível total (NDT) e 24% de PB. Os suplementos foram fornecidos uma vez ao dia pela manhã, a partir da remoção do dispositivo (D-2 ao D19). Para a formulação da ração de ambos os grupos estimou-se o consumo de pasto em 2% do peso vivo das fêmeas, e as exigências nutricionais seguiram as recomendações do NRC (1996). Durante o período de suplementação, as novilhas foram mantidas em piquetes formados por capim Tanzânia (*Panicum maximum Jacq vr. Tanzânia I*) recebendo água e sal mineral *ad libitum*. Os suplementos foram fornecidos em cochos, respeitando-se a medida de 22 cm lineares de cocho/animal. Apesar dos piquetes apresentarem características muito semelhantes, os animais de cada grupo foram intercalados entre dois piquetes, permanecendo cinco dias em cada um, com o intuito de reduzir ao máximo o efeito da pastagem. Além disso, os animais receberam silagem de milho como fonte de volumoso, já que na época da seca a qualidade das pastagens é limitada, devido principalmente a falta de umidade além das baixas temperaturas do período, momento em que os teores de proteína bruta da pastagem estão abaixo de 7%. Vale ressaltar que se buscou fornecer a mesma quantidade de silagem de milho para ambos os grupos para reduzir ao máximo o efeito da mesma.

5.1.5 Análise Bromatológica dos suplementos utilizados

Fez-se a análise bromatológica, tanto dos suplementos quanto da silagem de milho utilizados no experimento 1. Determinaram-se proteína bruta (PB), matéria seca (MS), matéria mineral (MM), extrato etéreo (EE) pelo método de Weende (AOAC, 1993). A fibra em detergente neutro (FDN) foi determinada através do método descrito por de Van Soest (1967). Para a análise bromatológica foram utilizadas amostras em duplicata. Matéria Seca (MS) é a porção do alimento onde estão todos os nutrientes, a massa total descontada a umidade. Proteína Bruta (PB) é determinada medindo-se o total de nitrogênio e multiplicando-se por 6,25 (as proteínas têm em média 16% de N no aminoácido). Matéria Mineral (MM) é o teor total de minerais contidos no alimento, correspondendo a fração não orgânica. Extrato Etéreo (EE) corresponde ao teor de óleo do alimento. A composição de ambos os suplementos e da silagem de milho foi ilustrada na Tabela 3. O valor médio de PB foi de 24,5% para suplemento com girassol (tratamento) e 24,95% para o suplemento sem girassol (controle), respectivamente, respeitando a inclusão estabelecida de 24% PB. Vale ressaltar que a porcentagem elevada de EE no suplemento com girassol (10,12%) é justificada pela grande quantidade de óleo, principalmente de AGPI, presente nos grãos de girassol. Em relação à silagem de milho, o valor médio de PB obtido foi de 7,14% PB, sendo que um valor de proteína para uma silagem de milho gira em torno de 8% PB. Com relação à FDN, EE e MM, o valor obtido para a silagem de milho foi de 45,15%, 2,76% e 4,85% respectivamente, valores próximos aos encontrados na literatura, que por sua vez giram em torno de 45% FDN, 3% EE e 4% MM.

Tabela 3 – Análise bromatológica dos suplementos e da silagem de milho utilizados no experimento 1

	PB (%)	MS (%)	MM (%)	EE (%)	FDN (%)
Suplemento com girassol	24,50	95,95	5,62	10,12	24,40
Suplemento sem girassol	24,95	95,79	5,61	2,93	10,69
Silagem de milho	7,14	93,03	4,85	2,76	45,15

PB: Proteína Bruta; MS: Matéria Seca; MM: Matéria Mineral; EE: Estrato Etéreo e FDN: Fibra em Detergente Neutro.

5.1.6 Colheita de sangue e processamento das amostras

Amostras de sangue foram coletadas por venopunção da veia/artéria caudal mediana nos dias D-2 (colheita realizada imediatamente antes da suplementação), D7 e D19 (colheita realizada imediatamente após a ingestão do suplemento). O sangue foi coletado em um tubo a vácuo de acrílico com capacidade para 4mL (Vacuntainer Systems, Becton, Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) contendo como anticoagulante o ácido tetracético etilenediamine de sódio (EDTA). Em cada animal, foi utilizada uma agulha para coleta (Labor Import Imp. Exp. Ltda, 25 x 0,8 mm (21G1”). Em seguida, o tubo foi invertido lentamente quatro vezes para que fosse suficientemente homogeneizado com o EDTA e foi imediatamente acondicionado a 4^{o}C. O sangue foi centrifugado (Centrífuga Marca Centribio), em temperatura ambiente, a 2900 x *g* por 30 minutos. O plasma foi retirado e alíquotado em microtubos e acondicionado a -20ºC. Foram armazenadas três alíquotas da mesma amostra para posterior mensuração das concentrações plasmáticas de lipídios (duplicata) e P4, sendo que cada amostra foi submetida ao descongelamento único.

5.1.7 Transferência dos embriões produzidos por fertilização *in vitro* (FIV)

Do total de embriões transferidos (n = 217), 13,82% eram da raça Holandesa (30/217) e 86,18% da raça Nelore (187/217). Foram utilizadas 31 matrizes doadoras de oócitos para FIV, sendo 5 da raça Holandesa e 26 da raça Nelore. Para os embriões de raça Holandesa foi utilizado o sêmen de um único touro, e para os embriões de Nelore foram utilizados sêmens de 9 touros. Os embriões foram divididos equitativamente entre os dois grupos segundo a origem materna e paterna, estágio e qualidade do embrião. No sétimo dia do cultivo *in vitro*, os embriões provenientes da FIV foram classificados segundo estágio de desenvolvimento embrionário em blastocisto inicial (Bi), blastocisto (BI), blastocisto expandido (Bx) ou blastocisto eclodido (Be) e classificados também segundo a qualidade em embriões de grau I (qualidade excelente), II (qualidade mediana) e III (qualidade ruim). Em seguida, apenas os embriões de grau I, foram envasados e transportados, em temperatura de 36°C, do laboratório até o local onde ocorreu à TETF. Com a receptora devidamente sincronizada no D7, de acordo com o protocolo apresentado anteriormente, realizou-se a palpação retal para determinar o ovário que continha o corpo lúteo. A seguir, aplicou-se a anestesia epidural com lidocaína 2% (LIDOVET®, Bravet), sendo a dose de anestésico ajustada de forma a assegurar que o animal permaneça em pé ao longo da transferência. Após tal procedimento, a palheta contendo o embrião envasado, foi encaixada em um aplicador e este coberto com uma bainha estéril. Posteriormente, o mesmo foi inserido na vagina, passado através da cérvix e guiado para o corno uterino ipsolateral ao corpo lúteo. O embrião contido na palheta foi depositado na parte distal no corno uterino. As transferências foram realizadas por um único veterinário.

5.1.8 Diagnóstico de prenhez

O diagnóstico de prenhez foi realizado no 30º dia de prenhez (23 dias após a TETF) através de exame ultra-sonográfico (Aloka Ultrasound Diagnostic Equipament, Modelo SSD-500, Tokyo-Japão) com transdutor linear de 5 mHz. As fêmeas foram classificadas em prenhes (presença do feto) ou não prenhes (ausência do feto).

5.1.9 Radioimunoensaio para a mensuração das concentrações plasmáticas de progesterona

As concentrações plasmáticas de P4 foram mensuradas pela Técnica de Radioimunoensaio, utilizando kits comerciais (Count-a-Count®, DPC, Diagnostic Products Corporation; Los Angeles, EUA). Para a avaliação do total das amostras foram realizados três ensaios. Foram utilizadas amostras de referência contendo concentrações altas (CA) e baixas (CB) de P4. Para cada um dos ensaios o coeficiente de variação intra-ensaio foi de 1,47%; 0,69% e 1,23% para CA e 0,15%; 0,34% e 0,15% para a CB. O coeficiente inter-ensaio foi 4,72% para a CA e 16,56% para a CB.

5.1.10 Mensuração das concentrações plasmáticas de lipídios

A mensuração das concentrações plasmáticas de colesterol total foi determinada por metodologia enzimática colorimétrica em Analisador Bioquímico Automático (RX Daytona® - Randox Laboratories, Reino Unido, utilizando-se KIT CHOL R1 Randox Laboratories Ltda, REF CH 3810, Lote 557CHRX), conforme método descrito por Allain et al. (1974). A mensuração das concentrações plasmáticas de triglicerídeos foi determinada por metodologia enzimática colorimétrica em Analisador Bioquímico Automático

(RX Daytona® - Randox Laboratories, Reino Unido, utilizando-se KIT TRIgs R1b Randox Laboratories Ltda, REF TR3823, Lote 83TRRX, conforme técnica descrita por Fossati et al. (1982). A mensuração das concentrações plasmáticas de HDL foi determinada por metodologia enzimática colorimétrica em Analisador Bioquímico Automático (RX Daytona® - Randox Laboratories, Reino Unido, utilizando-se KIT HDL R2 Randox Laboratories Ltda, REF CH 3811, Lote 609CHRX). A mensuração das concentrações plasmáticas de LDL foi determinada através da Equação de Friedewald, onde:

LDL mg/dL = colesterol total – HDL – (triglicerídeos/5)

5.1.11 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico SAS (SAS, 2003; SAS Institute, Cary, NC, USA). A variável taxa de concepção foi determinada pela porcentagem de fêmeas diagnosticadas como prenhes, em relação ao número total das novilhas submetidas à TETF. As variáveis contínuas foram testadas quanto à normalidade utilizando o artifício “Guided Data Analysis” do SAS e quando necessário foram transformadas conforme a sugestão do programa para alcançar a normalidade. Os dados foram analisados por análise de variância. As médias foram analisadas pelo Glimmix, no qual o modelo inicial para análise da taxa de concepção incluiu os efeitos de tratamento, qualidade do corpo lúteo, concentração de P4 no D7, concentração de colesterol total no D-2, concentração de colesterol total no D7, concentração de colesterol total no D19, concentração de triglicerídeos no D-2, concentração de triglicerídeos no D7, concentração de triglicerídeos no D19, concentração de HDL no D-2, concentração de HDL no D7, concentração de HDL no D19, concentração de LDL no D-2, concentração de LDL no D7 e concentração de LDL no D19. Para a obtenção do modelo estatístico final, as variáveis explanatórias foram sequencialmente removidas através do critério estatístico

de Wald utilizando como critério de remoção o valor de P > 0,20. No modelo estatístico final considerou-se para a análise tratamento, concentração de P4 no D7, concentração de colesterol total no D-2, concentração de colesterol total no D7, concentração de triglicerídeos no D7 e concentração de HDL no D7. Em todas as análises considerou-se um nível de significância de 5%. Todos os resultados estão apresentados na forma de média ± erro padrão não transformados.

5.1.12 Análise econômica

Com o intuito de demonstrar a viabilidade econômica da utilização da semente de girassol como suplemento alimentar para fêmeas bovinas de corte, no caso de efeito positivo sobre a taxa de concepção nas fêmeas tratadas, desenvolveu-se uma análise econômica. Vale ressaltar que para os cálculos da análise econômica considerou-se o suplemento fornecido ao Grupo Girassol onde empregou-se 40% de farelo de soja com 44% de proteína bruta (PB) + 60% de semente de girassol, disponibilizando 1,7kg de suplemento/animal/dia por 22 dias. Inicialmente foi obtida uma média dos preços reais, a partir da deflação dos preços nominais, do farelo de soja e bezerro no estado de São Paulo nos últimos dez anos e seis meses (Janeiro de 2003 a Julho de 2013) e da semente de girassol no estado do Mato Grosso nos últimos seis anos (período de registro disponível – Maio de 2007 a Maio de 2013). A média do preço real da semente de girassol foi obtida pelos preços recebidos pelos produtores do Mato Grosso, fornecidos pela Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), considerando ser o estado que mais produz semente de girassol no Brasil. Na safra 2012/2013, a produção estimada em Mato Grosso é de 71,8 mil toneladas sendo a produção estadual concentrada na cidade de Campo Novo do Parecis. Os preços nominais do farelo de soja e bezerro, nos últimos 10 anos e 6 meses, foram obtidos no banco de dados do Instituto de Economia Agrícola (IEA)

(http://www.iea.sp.gov.br/out/bancodedados.html). A deflação dos preços nominais de um determinado produto para a obtenção da média do preço real do produto ao longo de um período foi feita por meio do Índice Nacional de Preços ao Consumidor (INPC), fornecido pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (http://www.portalbrasil.net /inpc.htm) a partir do seguinte cálculo:

Preço real = (INPC ao longo do período / INPC do mês e ano de referência) x preço nominal

Para estimar o valor do frete da cidade de Campo Novo do Parecis/MS para a cidade de Araçatuba/SP utilizou-se a seguinte equação:

Frete R$/ton = 41,7233 + distância (km)

5.2 Experimento 2

5.2.1 Local do experimento

Os procedimentos experimentais conduzidos com os animais e as coletas de materiais biológicos foram realizados na Fazenda Santa Encarnação, localizada no município de Santa Rita do Pardo, estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. A aplicação dos protocolos de sincronização dos estros e da ovulação, o tratamento dos animais e a coleta de materiais biológicos foram realizados de janeiro a fevereiro de 2013. A análise bromatológica, realizada em março de 2013, foi conduzida no Laboratório de Bromatologia e Análise de Alimento, sediado na Faculdade de Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Campus de Dracena/SP, Brasil. A mensuração das concentrações plasmáticas de P4 pela técnica de

Radioimunoensaio, foi realizada em março de 2013, no Laboratório de Endocrinologia Animal, sediado na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Campus de Araçatuba/SP, Brasil. A mensuração das concentrações plasmáticas de colesterol total, triglicerídeos, HDL e LDL foi realizada em setembro de 2013, no Laboratório de Fisiologia da Reprodução (LFER), sediado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP), Campus de Pirassununga/SP, Brasil. A avaliação da constituição lipídica endometrial, por cromatografia gasosa, foi realizada em setembro de 2013, no Laboratório de Nutrição e Crescimento Animal, na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), Piracicaba/SP, Brasil. A análise de expressão gênica no tecido endometrial, por PCR em tempo real, foi realizada de julho a agosto de 2013, no Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular (LFEM), sediado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, Campus de Pirassununga/SP, Brasil. A preparação das lâminas histológicas foi realizada em julho de 2013, no Laboratório de Endocrinologia Animal, sediado na Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP, Campus de Araçatuba/SP, Brasil. O registro fotográfico das lâminas histológicas foi realizado no Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento, sediado na Faculdade Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP, Campus de Pirassununga/SP. A avaliação das imagens fotográficas das glândulas endometriais, obtidas a partir das lâminas histológicas, foi realizada em setembro de 2013, no Laboratório de Reprodução Animal, sediado na Faculdade de Zootecnia da UNESP, Campus de Dracena/SP, Brasil.

5.2.2 Animais

Foram utilizadas 60 vacas Nelore (*Bos taurus indicus*), pluríparas, não lactantes, de diferentes idades. As fêmeas foram pesadas individualmente e avaliadas quanto ao ECC (escala de 1 a 5) e classificadas em escore 2,25 (n =

5; 8,3%), 2,5 (n = 6; 10%), 2,75 (n = 8; 13,4%), 3 (n = 11; 18,3%), 3,25 (n = 9; 15%), 3,5 (n = 10; 16,7%), 3,75 (n = 5; 8,3%), 4 (n = 5; 8,3%) e 4,25 (n = 1; 1,7%). A média para o ECC dos animais utilizados no grupo controle foi de 3,25 ± 0,084 e no grupo tratado com semente de girassol foi de 3,4 ± 0,094. O peso médio dos animais foi 395,57kg ± 6,38kg no grupo controle e 386,13kg ± 5,28kg no tratado com semente de girassol. As vacas foram avaliadas quanto à condição ovariana no dia de início do protocolo de sincronização do estro e ovulação e classificadas da seguinte forma: Condição 1, quando observou-se ovário com a presença de corpo lúteo (n = 26; 43,3%); Condição 2, quando observaram-se ovários com a presença de folículos grandes e ausência de corpo lúteo (n = 31; 51,7%) e Condição 3, quando observaram-se ovários pequenos com folículos pequenos (n = 3; 5%). Os animais foram divididos equitativamente segundo peso, ECC e condição ovariana em seis grupos experimentais: Grupo Controle D6 (n = 10), Grupo Controle D14 (n = 10), Grupo Controle D22 (n = 10), Grupo Girassol D6 (n = 10), Grupo Girassol D14 (n = 10) e Grupo Girassol D22 (n = 10). Ao final do período de suplementação por 6, 14 ou 22 dias foram abatidas 4 fêmeas no D7, 5 fêmeas no D15 e 6 fêmeas no D23 do Grupo Controle e 6 fêmeas no D7, 6 fêmeas no D15 e 6 fêmeas no D23 do Grupo Girassol; totalizando o abate de 33 animais. Todos os procedimentos realizados no Experimento 2 foram aprovados pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA), da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Campus Experimental de Dracena, certificando que os procedimentos utilizando animais estão de acordo com os “Princípios Éticos de Experimentação Animal” (Protocolo nº 14/2013).

5.2.3 Sincronização dos estros e das ovulações

O início da sincronização ocorreu em dias aleatórios do ciclo estral. Os protocolos foram iniciados em dias que possibilitassem que os seis grupos experimentais, embora estivessem em dias do ciclo estral diferentes, tivessem

a coleta do material biológico e o abate em um único dia. Conforme ilustrado na Figura 7, as vacas foram submetidas à sincronização dos estros pelo uso de um dispositivo intravaginal constituído por 30g de silicone contendo 1g de P4 (DIB, Syntex Industria Bioquímica & Farmacéutica S.A.), associado a uma injeção de 2mg de benzoato de estradiol (Benzoato HC, Hertape Calier Saúde Animal S.A.), via IM. O dia da colocação do dispositivo foi considerado o D-10. Oito dias após a colocação do dispositivo (D-2) realizou-se a retirada do mesmo, e os animais receberam 2mg de cloprostenol sódico (Sincrocio®, Ourofino Saúde Animal Ltda.), 0,5mg de cipionato de estradiol (E.C.P.®, Ourofino Saúde Animal Ltda., Laboratórios PFIZER Ltda.) e 300UI de Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG; Folligon®, Intervet do Brasil Veterinária Ltda.), todos via IM. O dia esperado para o cio (D0) foi estimado 48 horas após a retirada do implante.

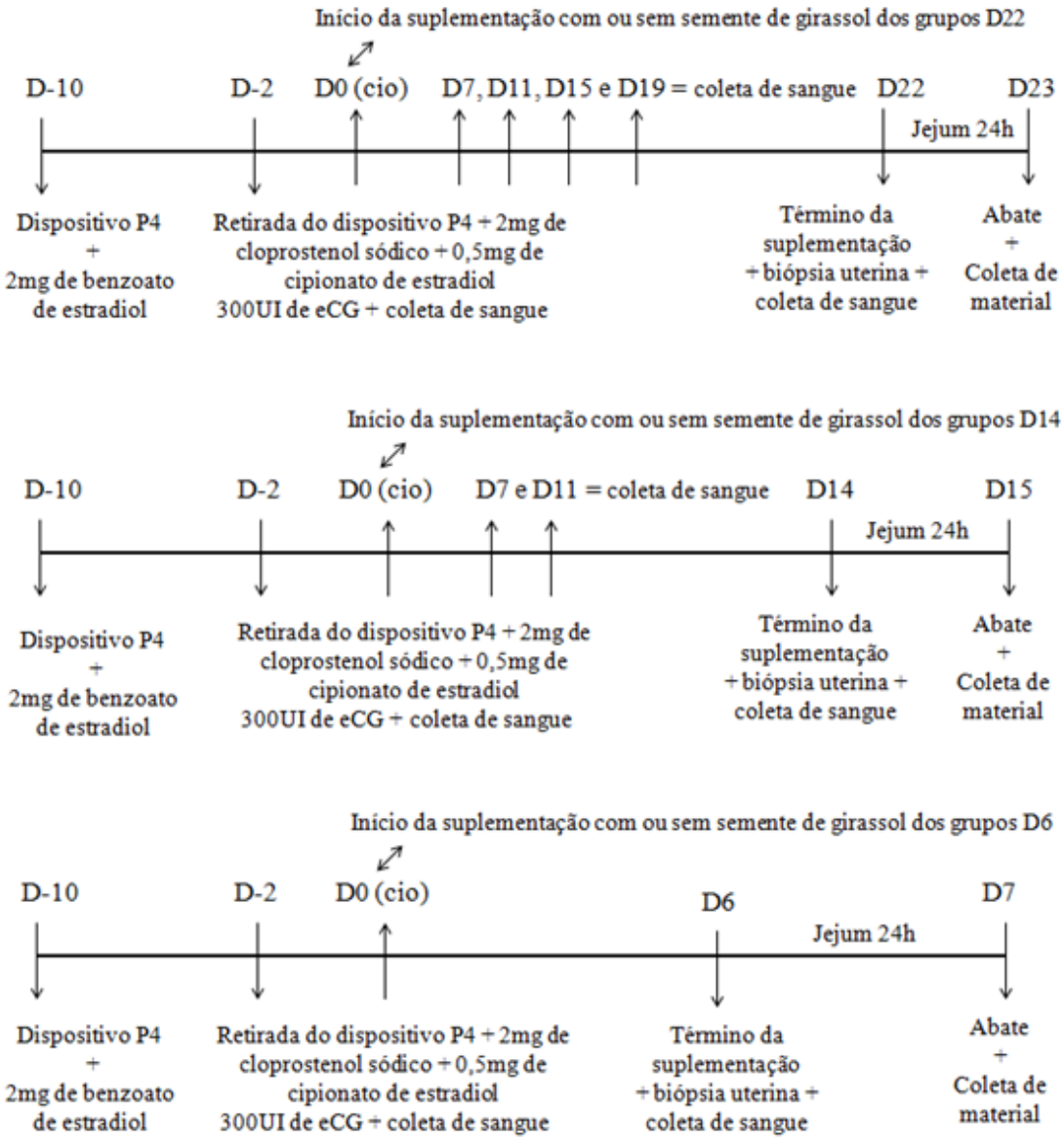


FIGURA 7 – Representação esquemática do delineamento referente ao Experimento 2 de acordo com o período (dias) de suplementação dos animais pertencentes a cada grupo experimental, colocação do dispositivo intravaginal com P4 associado a 2mg de benzoato de estradiol (D-10), retirada do dispositivo intravaginal associado a administração de 2mg de cloprostenol sódico, 0,5mg de cipionato de estradiol e 300UI de eCG (D-2), fornecimento de suplemento sem (Grupo Controle) ou com semente de girassol (Grupo Girassol) do D0 ao D22 ou D14 ou D6, biópsia uterina no D22 ou D14 ou D6, coletas de sangue apartir do D0, abate no D23 ou D15 ou D7 e coleta de materiais biológicos, em vacas Nelore (*Bos taurus indicus*).

5.2.4 Administração dos tratamentos

Após 48 horas da retirada dos dispositivos intra-vaginais (D0), as fêmeas foram divididas aleatoriamente em seis grupos: suplementação sem semente de girassol por 6 dias (Grupo Controle D6; n = 10), 14 dias (Grupo Controle D14; n = 10) ou 22 dias (Grupo Controle D22; n = 10); ou suplementação com semente de girassol por 6 dias (Grupo Girassol D6; n = 10), 14 dias (Grupo Girassol D14; n = 10) ou 22 dias (Grupo Girassol D22; n = 10). As vacas do grupo controle receberam suplemento contendo 53% de farelo de soja com 44% de PB + 47% de milho. As vacas do grupo tratado com semente de girassol receberam suplemento contendo 40% de farelo de soja com 44% de PB + 60% de semente de girassol. Ambos os suplementos fornecidos aos animais foram igualmente balanceados em energia e proteína, com 72% de NDT e 24% de PB. As vacas de ambos os tratamentos foram suplementadas diariamente com 1,7Kg de suplemento/dia, sendo oferecido em apenas um trato pela manhã. A suplementação foi realizada durante 6, 14 ou 22 dias, para ambos os grupos. Durante o período de suplementação, as vacas foram mantidas em três piquetes formados por *Brachiaria decumbens* cv. *Basilisk*. Os piquetes foram divididos da seguinte maneira: um piquete para o Grupo Controle (piquete 1), um piquete para o Grupo Girassol (piquete 2) e outro piquete para os animais que seriam introduzidos posteriormente a um dos lotes de tratamento (piquete 3). Primeiramente, iniciou-se o fornecimento da dieta controle (no piquete 1; n = 10) ou da dieta com semente de girassol (no piquete 2; n = 10) para os animais que seriam suplementados por 22 dias (n = 20); oito dias depois do início da suplementação, os animais que seriam suplementados por 14 dias (n = 20) foram retirados do piquete 3 e colocados ou no piquete 1 para receber a dieta controle (n = 10) ou no piquete 2 para receber a dieta com semente de girassol (n = 10). Dezesseis dias depois do início da suplementação, as fêmeas que seriam suplementados durante 6 dias foram inseridas em seus respectivos lotes. Os suplementos foram fornecidos em cochos, respeitando-se a medida de 22cm lineares de cocho/animal. As

fêmeas receberam sal mineral e água *ad libitum.* Apesar dos piquetes apresentarem características muito semelhantes os animais de cada grupo foram intercalados de forma que permaneceram sete dias em cada piquete, com o objetivo de reduzir ao máximo o efeito da pastagem. Para a formulação da ração de ambos os grupos estimou-se o consumo de pasto em 2% do peso vivo das fêmeas, e as exigências nutricionais seguiram as recomendações do NRC (1996). No Grupo Girassol, utilizou-se a inclusão de 9% de semente de girassol na MS total, quantidade máxima para que não fosse ultrapassado o limite de 5% de EE do concentrado.

5.2.5 Análise bromatológica dos suplementos utilizados

A análise bromatológica, tanto dos suplementos quanto da semente de girassol utilizados no experimento 2, foi procedida e os dados obtidos estão descritos na Tabela 4. Determinaram-se PB, MS, MM, EE pelo método de Weende (1864). Para a análise bromatológica, foram utilizadas amostras em duplicata. Vale ressaltar que a porcentagem elevada de EE na semente de girassol (40,72%) é justificada pela grande quantidade de óleo, principalmente de AGPI, presente nos grãos.

Tabela 4 – Análise bromatológica dos suplementos utilizados no experimento 2

	MS (%)	**MM (%)**	**PB (%)**	**EE (%)**	**Água (%)**
Semente de girassol	94,65	2,62	19,94	40,72	5,35
Suplemento com girassol	85,79	4,41	31,39	17,09	14,21
Suplemento sem girassol	88,58	4,64	28,50	2,25	11,43

MS: Matéria Seca; MM: Matéria Mineral; PB: Proteína Bruta; EE: Estrato Etéreo.

5.2.6 Colheita de sangue e processamento das amostras

Amostras de sangue foram colhidas por venopunção da veia/artéria caudal mediana no D0 (antes da suplementação), D7, D11, D15, D19 e D22 dias para os animais suplementados por 22 dias; no D0, D7, D11 e D14 para os animais suplementados por 14 dias e no D0 e D6 para os animais suplementados por 6 dias. O sangue coletado em tubo a vácuo de acrílico com capacidade para 4mL (Vacuntainer Systems, Becton, Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) contendo como anticoagulante o EDTA. Em cada animal, foi utilizada uma agulha para coleta (Labor Import Imp. Exp. Ltda, 25 x 0,8 mm (21G1"). Em seguida, o tubo foi invertido lentamente por quatro vezes para que fosse suficientemente homogeneizado com o EDTA e imediatamente acondicionado a 4^{o}C. Posteriormente, o sangue foi centrifugado (Centrífuga Marca Centribio), em temperatura ambiente, a 2900 x *g* por 30 minutos. O plasma foi alíquotado em microtubos e acondicionado a -20ºC. Foram armazenadas três alíquotas de plasma para cada amostra, para posterior mensuração das concentrações plasmáticas de P4 e lipídios (duplicata). Assim, cada amostra foi submetida ao descongelamento único.

5.2.7 Avaliação do corpo lúteo

Para mensuração do diâmetro e área total do corpo lúteo utilizou-se um ultrassom bi-dimensional DP-50 Vet (Mindray DS USA, Inc.) com probe transretal linear multifrequencial. Quando o corpo lúteo apresentou-se cavitário, a área representada pela cavidade foi subtraída da área total mensurada no corpo lúteo.

5.2.8 Biópsia uterina

A biópsia uterina foi realizada com o uso da pinça para biópsia Yoann (Hauptner, Solingen, Alemanha), através da via transcervical. A biópsia foi realizada em 81,67% das fêmeas – (Grupo Controle D6; n = 9), (Grupo Controle D14; n = 9), (Grupo Controle D22; n = 10); (Grupo Girassol D6; n = 8), (Grupo Girassol D14; n = 7) e (Grupo Girassol D22; n = 6) – totalizando 28 fragmentos coletados do Grupo Controle e 21 fragmentos coletados do Grupo Girassol, pois em determinadas vacas não foi possível a passagem da pinça de biópsia pela via transcervical. A coleta do tecido endometrial foi procedida na porção distal do corno uterino ipsolateral ao ovário contendo o corpo lúteo, logo após a bifurcação. As biópsias foram feitas nos animais dos seis grupos experimentais nos dias 6, 14 ou 22 após o início da suplementação. Foram realizadas de duas a três biópsias consecutivas em locais diferentes do corno uterino (na porção superior do corno uterino e/ou do lado direito do corno uterino e/ou do lado esquerdo do corno uterino). Após a coleta, o tecido endometrial foi imediatamente armazenado a -196^{o}C.

5.2.9 Radioimunoensaio para a mensuração das concentrações plasmáticas de progesterona

As concentrações plasmáticas de P4 foram mensuradas pela Técnica de Radioimunoensaio, utilizando kits comerciais (Count-a-Count®, DPC, Diagnostic Products Corporation; Los Angeles, EUA). Foram utilizadas amostras de referência contendo concentrações altas (CA) e baixas (CB) de P4. Para a avaliação do total das amostras foi realizado um único ensaio e com coeficiente de variação de 11,22% para CA e de 0,07% para CB.

5.2.10 Mensuração das concentrações plasmáticas de lipídios

A mensuração das concentrações plasmáticas de colesterol total foi determinada por metodologia enzimática colorimétrica em Analisador Bioquímico Automático (RX Daytona® - Randox Laboratories, Reino Unido, utilizando-se KIT CHOL R1 Randox Laboratories Ltda, REF CH 3810, Lote 557CHRX), conforme método descrito por Allain et al. (1974). A mensuração das concentrações plasmáticas de triglicerídeos foi determinada por metodologia enzimática colorimétrica em Analisador Bioquímico Automático (RX Daytona® - Randox Laboratories, Reino Unido, utilizando-se KIT TRIgs R1b Randox Laboratories Ltda, REF TR3823, Lote 83TRRX, conforme técnica descrita por Fossati et al. (1982). A mensuração das concentrações plasmáticas de HDL foi determinada por metodologia enzimática colorimétrica em Analisador Bioquímico Automático (RX Daytona® - Randox Laboratories, Reino Unido, utilizando-se KIT HDL R2 Randox Laboratories Ltda, REF CH 3811, Lote 609CHRX). A mensuração das concentrações plasmáticas de LDL foi determinada através da Equação de Friedewald, onde:

LDL mg/dL = colesterol total – HDL – (triglicerídeos/5)

5.2.11 Cromatografia gasosa

Levando em consideração que o tecido endometrial contém baixa concentração de ácidos graxos, para a realização da cromatografia gasosa tornou-se necessária a formação de “pools” dos tecidos endometriais. Para tanto, constituíram-se dois “pools” com quantidades, em gramas, aproximadas de tecido endometrial. Foram utilizados fragmentos de tecido endometrial de fêmeas abatidas no D7 (n = 4; 0,69g/animal), D15 (n = 5; 0,56g/animal) e D23 (n = 6; 0,76g/animal) pertencentes ao Grupo Controle para a constituição do “pool” do Grupo Controle com aproximadamente 10g. Foram utilizados

fragmentos de tecido endometrial de fêmeas abatidas no D7 (n = 4; 0,79g/animal), D15 (n = 5; 0,49g/animal) e D23 (n = 6; 0,66g/animal) pertencentes ao Grupo Girassol para a constituição do “pool” do Grupo Girassol com aproximadamente 9,6g. Os “pools” foram extraídos conforme o método descrito por Hara e Radin (1978) para posteriormente passarem pelo processo de transmetilação conforme o método descrito por Christie (1982). Os “pools” transmetilados foram analisados em cromatógrafo a gás (modelo Focus CG- Finnigan), com detector de ionização de chama e coluna capilar CP-Sil 88 (Varian) com 100m de comprimento por 0,25 μm de diâmetro interno e 0,20μm de espessura do filme. O hidrogênio foi utilizado como gás de arraste, numa vazão de 1,8mL/minuto. O programa de temperatura do forno inicialmente foi de 70ºC e tempo de espera de 4 minutos; posteriormente houve um aumento de 13ºC/minuto até atingir 175ºC e tempo de espera de 27 minutos; em seguida houve um aumento de 4ºC/minuto até atingir 215ºC e tempo de espera de 9 minutos e finalmente um aumento de 7ºC/minuto até atingir 230ºC e tempo de espera de 5 minutos, totalizando 65 minutos. A temperatura do vaporizador foi de 250ºC e a do detector de 300ºC. Uma alíquota de 1μL do extrato esterificado foi injetada no cromatógrafo, a identificação dos ácidos graxos foi feita pela comparação dos tempos de retenção e as porcentagens dos ácidos graxos foram obtidas através do “software” Chromquest 4.1 (Thermo Electron, Italy). Identificaram-se os ácidos graxos por comparação dos tempos de retenção dos ésteres metílicos das amostras com padrões de ácidos graxos e se quantificou os ácidos graxos por normalização das áreas dos ésteres metílicos onde os resultados foram expressos em percentual de área (%). Analisou-se o perfil de 54 ácidos graxos (C4:0, C6:0, C8:0, C10:0, C10:1, C11:0, C12:0, C12:1, C13:0 ISO, C13:0 ANTEISO, C13:0, C14:0 ISO, C14:0, C15:0 ISO, C15:0 ANTEISO, C14:1 C9, C15:0, C16:0 ISO, C15:1, C16:0, C17:0 ISO, C16:1 C9, C17:0, C17:1, C18:0, C18:1 T6-T7-T8-T9, C18:1 T10-T11-T12, C18:1 C9, C18:1 C11, C18:1 C12, C18:1 C13, C18:1 T16, C18:1 C15, C18:2 C9-C12, C20:0, C18:3 n6, C18:3 n3, C20:1, C18:2 C9-T11, C18:2 T10

C12, C21:0, C20:2, C20:3n6, C22:0, C22:1, C20:4, C20:3n3, C23:0, C22:2, C20:5, C24:0, C24:1, C22:5 e C22:6).

5.2.12 Análise de expressão gênica

5.2.12.1 Extração de RNA

Os tecidos endometriais, armazenados a -196^{o}C, foram macerados em aparato de aço inoxidável pela aplicação de pressão, resultando na maceração do tecido endometrial. Durante o referido procedimento o tecido foi mantido a -196^{o}C. Em seguida, foi realizada a extração de RNA das amostras utilizando-se PureLink® RNA Mini Kit (Ambion by Life Technologies^{TM}, Frederick, Maryland, USA, Cat. nº 12183018A, Lot. 1348826) de acordo com instruções do fabricante. Previamente à transcrição reversa (RT), as amostras de RNA foram tratadas com DNase I (PureLink^{TM} Genomic DNA Purification; Deoxyribonuclease I – Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), segundo indicações do fabricante. O tratamento com DNase I foi realizado na coluna de extração de RNA de cada amostra sob temperatura ambiente utilizando 1,0µg de RNA em reação com volume total de 10µL. A concentração do extrato de RNA foi mensurada por espectrofotômetro de baixo volume (NanoVue Plus, GE Healthcare, Life Sciences).

5.2.12.2 Síntese de cDNA

Para a transcrição reversa, preparou-se 10µL/por amostra de solução Master Mix contendo RT buffer (2,0µL), dNTP mix (0,8µL), primers randômicos (2,0µL), inibidor de RNase (1,0µL), transcriptase reversa (1,0µL) e água livre de nucleases (3,2µL), seguindo instruções do fabricante (High Capacity cDNA

Reverse Transcrição Transcription Kit, Life Technologies™, Frederick, Maryland, USA). Em seguida, o Master Mix (10µL) foi adicionado as amostras tratadas com DNase I. As amostras permaneceram sob incubação durante 10 minutos a 25ºC e por 2 horas a 37ºC, seguido por inativação da transcriptase reversa à 85ºC por 5 minutos, e estocadas a 4ºC para posterior armazenamento a -80ºC.

5.2.12.3 Desenho de “primers”

Os “primers” senso e anti-senso, disponíveis na Tabela 5, foram obtidos por meio de publicação científica ou desenhados utilizando o “software” PrimerQuest. Todas as identificações dos genes alvo utilizadas no desenho de “primers” foram encontradas por pesquisas nas bases de dados da NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/). Utilizando-se a identidade adquirida pelo NCBI foram obtidas as sequencias de “primers” senso e anti-senso pelo “software” PrimerQuest disponível no “site” Integrated DNA Technologies (IDT) (http://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index). Em seguida, a ferramenta Oligo Analyzer 3.1 (http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/) foi utilizada para avaliar a qualidade dos “primers” levando em consideração a probabilidade de formação de homodímeros, heterodímeros e “harpins”. O programa Blast® (Basic Local Alignmennt Search Tool) (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/) foi utilizado para avaliar a especificidade dos “primers” obtidos pelo “software” Oligo Analyzer. Os “primers” foram sintetizados por laboratório terceirizado (https://commerce.invitrogen.com/).

Tabela 5 – Nomenclatura do gene, “primers forward” (F) e “reverse” (R), sequência dos “primers”, identificação representativa (ID) e números de pares de bases (pb) dos genes

Nomenclatura do gene	Gene	Sequência 5'-3'	ID	Nº pb
Aldo-ceto reductase family1, member B1[A]	AKR1B1_F AKR1B1_R	ATACAAGCCGGCGGTTAAC TGTCTGCAATCGCTTTGATC	NM_001012519	188
Aldo-ceto reductase family1, member C4[B]	AKR1C4_F AKR1C4_R	TCCTGTCCTGGGATTTGGAACCTT ATCGGCAATCTTGCTTCGAATGGC	NM_181027.2	166
Prostaglandin E receptor 2[A]	PTGER2_F PTGER2_R	CTACTTGCCTTTTCCATGACC GATGAAGCACCACGTCCC	NM_174588	210
Prostaglandin E receptor 4[A]	PTGER4_F PTGER4_R	CGATGAGTATTGAGCGCTACC AGCCCGCATACATGTAGGAG	NM_174589	237
Prostaglandin E synthase[B]	PTGES_F PTGES_R	GCTGCGGAAGAAGGCTTTTGCC GGGCTCTGAGGCAGCGTTCC	NM_174443.2	101
Prostaglandin E synthase 2[B]	PTGES2_F PTGES2_R	GTGGGCGGACGACTGGTTGG CGGAGGTGGTGCCTGCGTTT	NM_001166554.1	192
Fosfolipase A2 G10[B]	PLA2G10_F PLA2G10_R	TGTGCCCGAAGGTAGGGCTGTT GGCGAGGGCCAACACAGTCAAT	XM_864950.4	138
Prostaglandin endoperoxide synthase2[B]	PTGS2_F PTGS2_R	CCAGAGCTCTTCCTCCTGTG GGCAAAGAATGCAAACATCA	NM_174445.2	161
Peptidylprolyl isomerase A (Cyclophilin A)	PPIA_F PPIA_R	GCCATGGAGCGCTTTGG CCACAGTCAGCAATGGTGATCT	NM_178320.2	

Software utilizado no delineamento das sequências de primers ou referência de artigo de origem: [A]Ulbrich et al. (2009); [B]PrimerQuest.

Fonte: Adaptada de Oliveira (2013).

5.2.12.4 Validação de “primers”

Os primers utilizados nesse experimento foram previamente validados por Oliveira (2013). As reações de polimerização em cadeia em tempo real

(qPCR) foram executadas em termociclador StepOne Plus™ Real Time System (Applied Biosystems® – Life Technologies Corporation, Frederick, Maryland, USA). O termociclador foi programado para iniciar com estágio de espera (95ºC por 10 minutos), seguido por 40 ciclos compostos por fase de desnaturação (95ºC por 15 segundos), anelamento e extensão (60ºC por 1 minuto). A curva de dissociação ("melting") foi obtida imediatamente após a amplificação permanecendo a 95ºC por 15 minutos, passando a 60ºC por 1 minuto e voltando a 95ºC por 15 minutos. Os "primers" liofilizados foram diluídos em água DEPC (livre de nucleases) originando soluções de estoque com concentração de 100 mM. As soluções de trabalho com concentração de 20mM foram preparadas por rediluição das soluções de estoque. Ambas soluções foram armazenadas a -20ºC. De forma simplificada, as reações de qPCR continham uma mistura de soluções contendo os "primers" senso e anti-senso, solução Master Mix pré-preparada (Power SYBR® Green PCR Master Mix, Life Technologies Corporation, Frederick, Maryland, USA) e água totalizando 16,0µL. A essa solução foram adicionados 4,0µL de solução contendo cDNA, exceto os poços que serviram como controle negativo que receberam 4,0µL de água DEPC no lugar dos 4,0µL de solução de cDNA. Quando utilizada, a solução de cDNA foi diluída em água DEPC a 1:80, a menos que especificamente mencionado. Realizaram-se testes com o intuito de encontrar concentrações de "primers" que estabelecessem maior eficiência nas reações de qPCR. Os critérios para escolha da melhor concentração de "primers" foram: (1) eficiência de amplificação entre 85 e 110% (2) ausência de amplificação no controle negativo (3) único pico na curva de "melting" e (4) menor ciclo limiar (cycle threshold; CT). Primeiramente foram realizados testes nas concentrações de 150 ou 300 nM para cada par de "primers" (senso e anti-senso), e quando necessário, concentrações maiores ou menores foram testadas. Cada concentração foi testada em duplicata e com um poço usado como controle negativo. Para verificação da eficiência, dados extraídos do termociclador foram avaliados pelo programa LinReg (RUIJTER et al., 2009; http://www.gene-quantification.de/download.html#linregpcr). Foram escolhidas

as concentrações de “primers” que apresentaram melhores resultados segundo os critérios acima. A seguir, foi testada uma curva padrão composta por cinco pontos, em duplicatas, contendo “pool” de cDNA diluído em série, normalmente de 1:20 a 1:320, em água DEPC. Os dados de amplificação foram analisados pelo programa StepOne Plus™ (Software v2.2.2, Life Technologies Frederick, Maryland, USA). A eficiência de amplificação foi calculada pela seguinte equação: Eficiência = $-1+10^{(-1/\text{inclinação})}$. Foram consideradas validadas as curvas padrão com eficiência entre 85 e 110% e coeficiente de determinação (R^2) próximo a 1. Estabelecidas as validações foram realizadas reações para comparar a abundância de cada transcrito entre os dias (D6, D14 e D22) e entre os grupos (Grupo Controle D6 x Grupo Girassol D6; Grupo Controle D14 x Grupo Girassol D14; Grupo Controle D22 x Grupo Girassol D22) . Todas as amostras com cDNA e os controles negativos foram analisadas em triplicata na comparação. A quantificação de transcritos presentes nas amostras de cada vaca que compunha o Grupo Controle D6, Grupo Girassol D6, Grupo Controle D14, Grupo Girassol D14, Grupo Controle D22 e Grupo Girassol D22 foi realizada de forma relativa à quantidade de transcritos de um gene referência (ciclofilina), pelo método delta CT ajustado para a eficiência de amplificação, segundo descrito por Pfaffl (2001).

5.2.13 Confecção das lâminas histológicas

Imediatamente após o abate das fêmeas, fragmentos de tecido endometrial do terço médio do corno uterino contralateral ao corpo lúteo foram imediatamente coletados e acondicionados em solução fixadora de formol tamponado (PAF), pH 7,0 (500ml de formol 40%, 20g de NaH_2PO_4 + H_2O, 32,5g de NaH_2PO_4 e 5 litros de água destilada) por 24 horas. Posteriormente os fragmentos foram lavados por seis vezes consecutivas, a cada 12 horas, com solução de PBS, pH 7,5; para posterior desidratação e inclusão em parafina. Após a fixação, o tecido foi desidratado, através de imersão numa

sequencia de soluções alcoólicas em concentrações graduais e crescentes. A graduação foi iniciada imergindo-se o tecido por 1 hora em álcool 70%, depois em álcool 90% por 1 hora, em uma dupla lavagem com álcool absoluto totalizando 2 horas, e finalmente uma dupla lavagem com xilol P.A – ACS totalizando 2 horas. Após a desidratação do tecido o material foi primeiramente incluso por duas horas em parafina histológica (Histosec), uma hora por vez, para posterior “emblocamento” de forma a obter blocos de resina com o fragmento de tecido em seu interior. Após a inclusão das amostras, secções endometriais de 4µm de espessura foram cortadas em micrótomo (Leica RM 2155 – Rotary Microtome) e dispostas em lâminas de vidro previamente identificadas. Em seguida, as lâminas foram colocadas por 2 horas em estufa sob temperatura de 56°C a 58°C, com intuito de derreter o excesso de parafina, e posteriormente foram transferidas para cubetas de coloração para dar seguimento a desparafinação. Na Bateria I de coloração (Bateria I: submeteram-se as cubetas à xilol I por 10 minutos, xilol II por 10 minutos, álcool 100% I por 5 minutos, álcool 100% II por 5 minutos, álcool 90% por 5 minutos, álcool 70% por 5 minutos). Após os passos supracitados seguiu-se com o protocolo de coloração Hematoxilina - Eosina (HE). Nesse, as cubetas foram submetidas à água destilada por 15 minutos, corante hematoxilina de Harris por 1 minuto, água corrente por 4 minutos, corante eosina a 5% por 1 minuto. Após a coloração com HE, os cortes foram desidratados com a Bateria II de coloração (Bateria II: submeteram-se as cubetas à álcool 95% por 5 minutos, álcool 100% I por 5 minutos, álcool 100% II por 5 minutos, xilol diafranizador por 5 minutos, xilol intermediário por 5 minutos e xilol de montagem por no mínimo 15 minutos). A partir deste momento, colocou-se sobre cada corte corado uma gota de bálsamo do Canadá (Entellan, Marca: Merk) e cobriu-se esse com lamínula. O tempo estimado para que o material ficasse seco e pronto para a análise por microscopia de luz foi de 72 horas.

5.2.14 Análise morfométrica e número de glândulas endometriais

Após a obtenção das lâminas histológicas coradas, estas foram submetidas a um sistema de análise de imagem computadorizada programado a um microscópio de luz com câmera fotográfica (Axioplan 2, Modelo: MC 80 DX - Microscope Camera, Marca: ZEISS), com o objetivo de obter fotos tiradas de 10 campos ópticos selecionados aleatoriamente, 5 a partir de uma região superficial do endométrio e 5 a partir de uma região de profundidade, com uma lente de aumento 10x. Posteriormente, as fotos foram analisadas através do "software" Image-Pro® PLUS-The Proven Solution^{TM} para obtenção das áreas (μm^2), perímetros (µm) e diâmetros (µm) das glândulas endometriais. A contagem do número de glândulas endometriais foi feita visualmente, a partir de cada um dos 10 campos ópticos selecionados anteriormente.

5.2.15 Análise estatística

5.2.15.1 Análise estatística utilizada para avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real

Para a averiguação da abundância relativa de transcritos envolvidos na biossíntese de eicosanoides no endométrio, nos dias 6, 14 e 22 pós-cio (sendo D0 o dia esperado para o cio e 1º dia de suplementação), das vacas que receberam (Grupo Girassol) ou não (Grupo Controle) suplementação com semente de girassol avaliou-se o efeito de grupo, dia e interação entre grupo e dia para uma análise global pelo Proc Mixed do programa SAS. Posteriormente, compararam-se os grupos em cada dia e os dias em cada grupo, análise realizada por ANOVA seguida por teste de comparação múltipla SNK. Consideraram-se valores de $P < 0,05$ como significativos e valores de P entre 0,05 e 0,10 como se aproximando da significância.

5.2.15.2 Análise estatística utilizada para avaliação dos componentes plasmáticos

A análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico SAS (versão 9.2; SAS Institute Inc., Cary, NC), considerando as vacas como unidade experimental. Utilizaram-se medidas repetidas em um modelo único considerando efeito do tratamento, efeito do tempo e interação entre tratamento x tempo. Com o intuito de manter o maior número de associações temporais entre os tratamentos (tratamento controle ou tratamento com semente de girassol) para as variáveis contínuas concentrações plasmáticas de P4, colesterol total, triglicerídeos, HDL e LDL formou-se um banco de dados somente com as fêmeas abatidas no D23 (n = 20). Amostras de plasma coletadas no primeiro dia de suplementação (dia esperado para o cio), 7, 11, 15, 19 e 22 dias pós-cio foram utilizadas para analisar o efeito do tratamento e do tempo e a interação entre tratamento x tempo nas fêmeas abatidas no D23. Os dados foram analisados por análise de variância. As variáveis contínuas foram testadas quanto à normalidade utilizando o artifício “Guided Data Analysis” do SAS e quando necessário foram transformadas conforme a sugestão do programa para alcançar a normalidade. As médias foram analisadas pelo Proc Glimmix do SAS. Os resultados encontrados para as mensurações das concentrações dos componentes plasmáticos foram selecionados para outliers por avaliação visual das distribuições. Os outliers extremos (observações 3 vezes maiores que os intervalos interquartis a partir do primeiro ou terceiro quartil do conjunto de dados) foram descartados. Em todas as análises considerou-se um nível de significância entre 5 e 10%. Todos os resultados serão apresentados na forma de média ± erro padrão não transformados.

5.2.15.3 Análise estatística utilizada para avaliação da morfometria do corpo lúteo, morfometria das glândulas endometriais e avaliação do número de glândulas endometriais considerando o efeito de tratamento em determinado tempo

A análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico SAS (versão 9.2; SAS Institute Inc., Cary, NC), considerando as vacas como unidade experimental. Fez-se uma análise pontual levando em conta, no modelo, o efeito do tratamento (tratamento controle ou tratamento com semente de girassol) em determinado tempo (dia 6, 14 e 22 pós-início da suplementação para corpo lúteo e dia 7, 15 ou 23 pós-início da suplementação para glândulas endometriais). Considerou-se vaca com efeito aleatório e vaca dentro de cada tratamento. As variáveis contínuas foram testadas quanto à normalidade utilizando o artifício “Guided Data Analysis” do SAS e quando necessário foram transformadas conforme a sugestão do programa para alcançar a normalidade. Os dados foram analisados por análise de variância. As médias foram analisadas pelo Proc Glimmix do SAS. Em todas as análises considerou-se um nível de significância entre 5 e 10%. Todos os resultados serão apresentados na forma de média ± erro padrão não transformados.

5.2.15.4 Análise estatística utilizada para avaliação da morfometria e número de glândulas endometriais considerando somente efeito de tratamento e avaliação do perfil de ácidos graxos no endométrio

A análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico SAS (versão 9.2; SAS Institute Inc., Cary, NC), considerando as vacas como unidade experimental. Fez-se uma análise pontual levando em conta, no modelo, somente o efeito do tratamento (tratamento controle ou tratamento com semente de girassol). Considerou-se vaca com efeito aleatório e vaca dentro de cada tratamento. As variáveis contínuas foram testadas quanto à

normalidade utilizando o artifício “Guided Data Analysis” do SAS e quando necessário foram transformadas conforme a sugestão do programa para alcançar a normalidade. Os dados foram analisados por análise de variância. As médias foram analisadas pelo Proc Glimmix do SAS. Em todas as análises considerou-se um nível de significância entre 5 e 10%. Todos os resultados serão apresentados na forma de média ± erro padrão não transformados.

VI. RESULTADOS

6.1 Experimento 1

6.1.1 Efeito de tratamento nas taxas de concepção

No experimento 1, verificou-se o efeito do tratamento (Figura 8), onde a taxa de concepção foi maior (P ≤ 0,01) no Grupo Girassol (55,66%; 59/106) comparado ao Grupo Controle (36,94%; 41/111). Observou-se uma diferença de 18,72% na taxa de concepção das receptoras tratadas com semente de girassol, que representou um aumento de 50% na concepção.

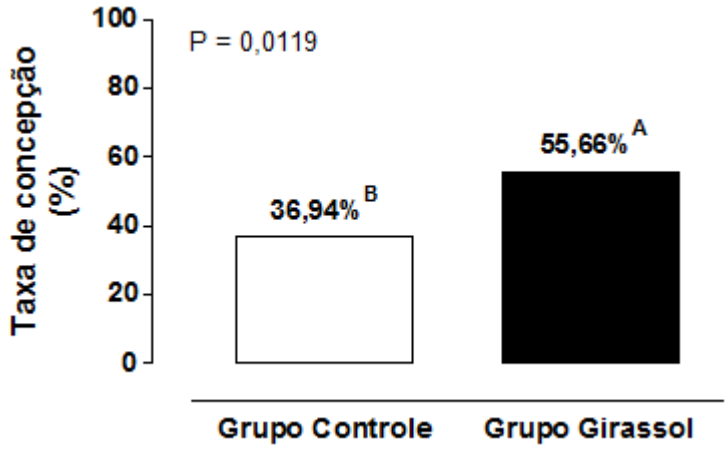
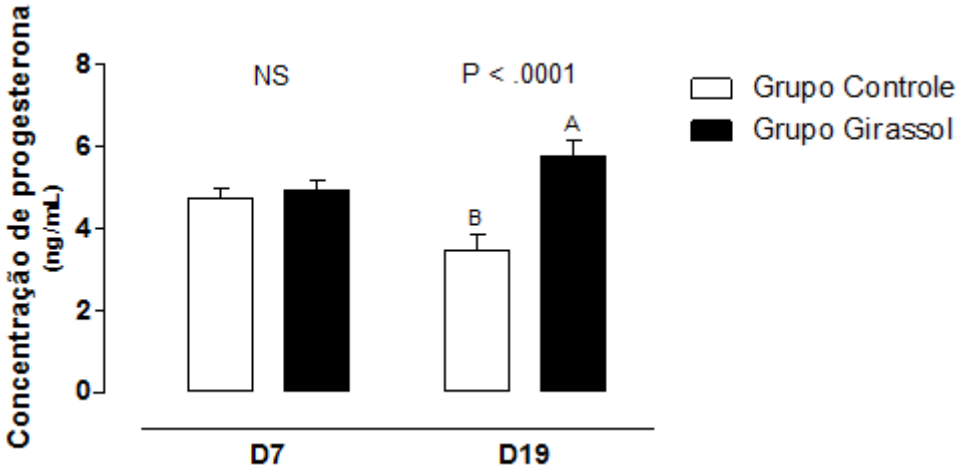


FIGURA 8 – Experimento 1: Efeito de tratamento sobre as taxas de concepção 23 dias pós TETF, em receptoras de embriões produzidos *in vitro,* tratadas durante 22 dias após a remoção do dispositivo (D-2 a D19), com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol; n = 106) ou não (Grupo Controle; n = 111).
[A,B] Letras maiúsculas diferentes nas respectivas colunas ilustram que os valores diferiram estatisticamente de maneira altamente significativa (P ≤ 0,01).

6.1.2 Avaliação das concentrações plasmáticas de progesterona

As concentrações plasmáticas de P4 estão representadas na Figura 9. No D7 não foram observadas diferenças (P > 0,05) entre o Grupo Controle (4,72 ± 0,23ng/mL) e Girassol (4,92 ± 0,24ng/mL). Entretanto, no D19 observaram-se maiores concentrações de P4 (P < 0,01) no Grupo Girassol (5,75 ± 0,39ng/mL) que no Controle (3,48 ± 0,38ng/mL).



FIGUIRA 9 – Experimento 1: Efeito do tratamento sobre as concentrações plasmáticas de P4 no D7 e D19 em receptoras de embriões produzidos *in vitro,* tratadas durante 22 dias após a remoção do dispositivo (D-2 a D19), com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol; n = 106) ou não (Grupo Controle; n = 111).
^{A,B} Letras maiúsculas diferentes nas respectivas colunas ilustram que os valores diferiram estatisticamente de maneira altamente significativa (P ≤ 0,01).
^{NS} Demonstra que o valor de P não foi significativo.

6.1.3 Avaliação das concentrações plasmáticas de lipídios

Conforme representado na Figura 10, maiores concentrações plasmáticas de colesterol total foram observadas no Grupo Girassol comparado ao Controle no D7 (306,02 ± 11,61 vs. 277,10 ± 11,88mg/dL, respectivamente; P < 0,05) e D19 (260,51 ± 7,98 vs. 231,95 ± 7,95mg/dL, respectivamente; P <

0,01). Entretanto no D –2 não foram encontradas diferenças nas concentrações plasmáticas de colesterol entre o Grupo Girassol e Controle (269,79 ± 7,55 vs. 267,93 ± 7,70mg/dL, respectivamente; P > 0,05).

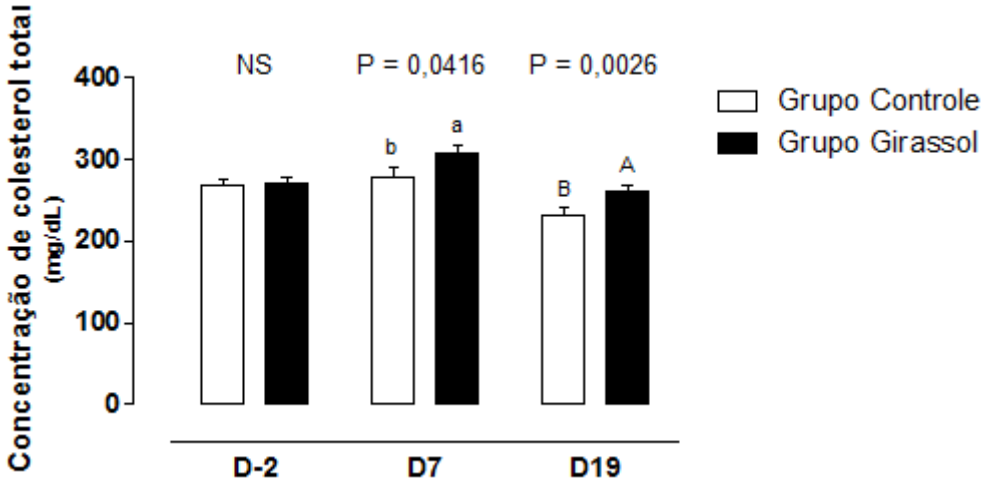


FIGURA 10 – Experimento 1: Efeito do tratamento sobre as concentrações plasmáticas de colesterol total no D-2, D7 e D19 em receptoras de embriões produzidos *in vitro,* tratadas durante 22 dias após a remoção do dispositivo (D-2 a D19), com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol; n = 106) ou não (Grupo Controle; n = 111).
[A,B] Letras maiúsculas diferentes nas respectivas colunas ilustram que os valores diferiram estatisticamente de maneira altamente significativa (P ≤ 0,01).
[a,b] Letras minúsculas diferentes nas respectivas colunas ilustram que os valores diferiram estatisticamente de maneira significativa (P ≤ 0,05).
[NS] Demonstra que o valor de P não foi significativo.

Conforme representado na Figura 11, não foram observadas diferenças significativas (P > 0,05) nas concentrações plasmáticas de triglicerídeos entre o Grupo Girassol e Controle no D-2 (24,13 ± 1,18 vs. 23,99 ± 1,17mg/dL, respectivamente), D7 (32,66 ± 3,20 vs. 34,65 ± 3,54mg/dL, respectivamente) e D19 (25,49 ± 1,31 vs. 24,96 ± 1,29mg/dL, respectivamente).

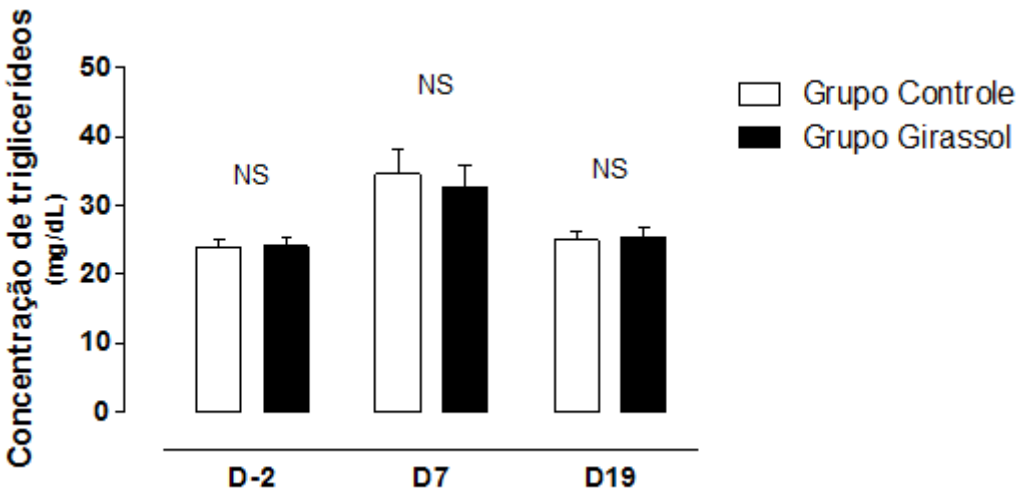


FIGURA 11 – Experimento 1: Efeito do tratamento sobre as concentrações plasmáticas de triglicerídeos no D-2, D7 e D19 em receptoras de embriões produzidos *in vitro,* tratadas durante 22 dias após a remoção do dispositivo (D-2 a D19), com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol; n = 106) ou não (Grupo Controle; n = 111).
^{NS} Demonstra que o valor de P não foi significativo.

As concentrações de HDL estão ilustradas na Figura 12, onde foram observadas maiores concentrações de HDL no Grupo Girassol comparado ao Controle no D7 (166,82 ± 5,88 vs. 139,43 ± 5,74mg/dL, respectivamente; P < 0,01) e D19 (162,01 ± 4,67 vs. 135,57 ± 4,76mg/mL, respectivamente; P < 0,01). Entretanto, tais diferenças não foram observadas no D-2 (151,79 ± 4,20 vs. 146,92 ± 4,34mg/dL, respectivamente).

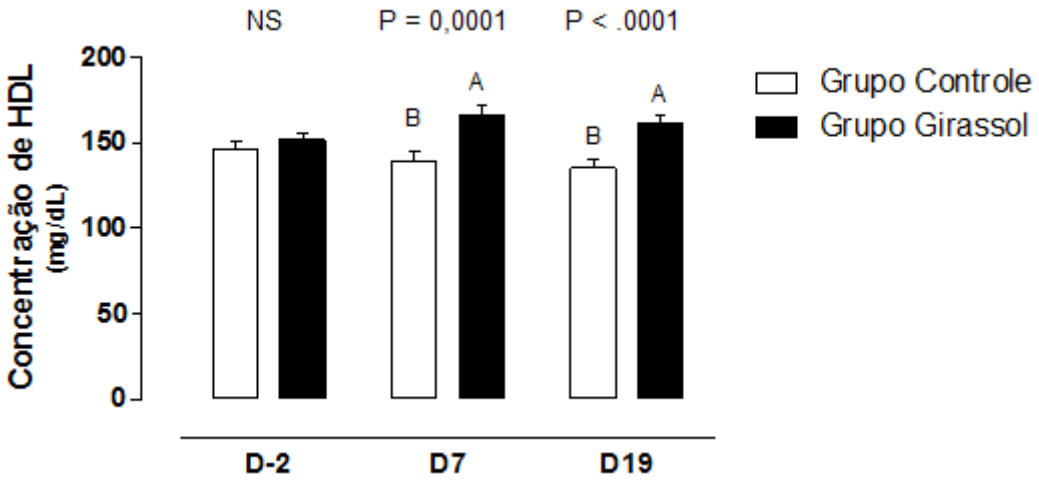


FIGURA 12 – Experimento 1: Efeito do tratamento sobre as concentrações de HDL no D-2, D7 e D19 em receptoras de embriões produzidos *in vitro,* tratadas durante 22 dias após a remoção do dispositivo (D-2 a D19), com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol; n = 106) ou não (Grupo Controle; n = 111).
^{A,B} Letras maiúsculas diferentes nas respectivas colunas ilustram que os valores diferiram estatisticamente de maneira altamente significativa (P ≤ 0,01).
^{NS} Demonstra que o valor de P não foi significativo.

Conforme representado na Figura 13, não foram observadas diferenças significativas (P > 0,05) nas concentrações de LDL entre o Grupo Girassol e Controle no D-2 (111,86 ± 4,36 vs. 116.56 ± 4,51mg/dL, respectivamente), D7 (127,70 ± 7,14 vs. 127,77 ± 8,33mg/dL, respectivamente) e D19 (93,22 ± 3,92 vs. 91,89 ± 4,12mg/dL, respectivamente).

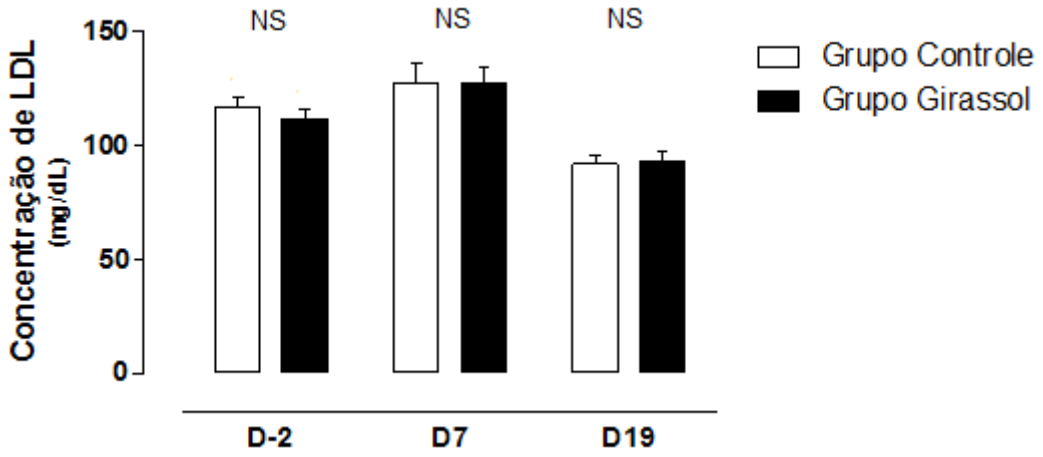


FIGURA 13 – Experimento 1: Efeito do tratamento sobre as concentrações de LDL no D-2, D7 e D19 pós-cio das receptoras de embriões produzidos *in vitro,* tratadas durante 22 dias após a remoção do dispositivo (D-2 a D19), com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol; n = 106) ou não (Grupo Controle; n = 111).
^{NS} Demonstra que o valor de P não foi significativo.

6.1.4 Análise da viabilidade econômica da suplementação com semente de girassol

A média do preço real, pago pela agricultura no estado de São Paulo, para o farelo de soja foi de R$ 0,96/kg. A média do preço real, recebido pelo produtor no estado do Mato Grosso, para a semente de girassol foi de R$ 0,65/kg. A média do preço real, recebido pelo agricultor no estado de São Paulo, para o bezerro foi de R$ 643,19 a unidade. Na referida análise econômica será considerado o preço do bezerro comercial, que permitirá a simulação do rendimento mínimo obtido pelo emprego da referida suplementação com semente de girassol. Entretanto, deve-se salientar que bezerros nascidos da produção de embriões *in vitro* são provenientes de mães geneticamente superiores, fato que certamente agrega maior valor aos bezerros.

Obtendo-se a média dos preços reais dos produtos, determina-se que

para suplementar 100 vacas fornecendo 1,7kg de suplemento por animal/dia por 22 dias são necessários 3.740 Kg de suplemento e que tal suplemento é constituído por 60% de semente de girassol e 40% de farelo de soja, ou seja, 2.244kg de semente de girassol e 1.496Kg de farelo de soja. Calculou-se para semente de girassol um custo (2.244kg x R$ 0,65/kg) de R$ 1.458,60 acrescido do valor do frete de R$ 155,88 (frete de Campo Novo do Parecis/MS para Araçatuba/SP, 1.504 km), totalizando R$ 1.614,48. Calculou-se para o farelo de soja um custo (1.496kg x R$ 0,96/kg) de R$ 1.436,16. Assim, o custo total do suplemento fornecido a 100 matrizes por 22 dias seria de R$ 3.050,64, ou seja, R$ 30,51/matriz/22 dias.

Considerando que neste estudo a taxa de concepção com uso da TETF foi de 36,94% e que houve um incremento de 18,72% nas receptoras suplementadas com semente de girassol, conclui-se que em um lote de 100 matrizes essa percentagem coresponderia a um incremento de aproximadamente 19 bezerros concebidos, portanto ter-se-ia um ganho financeiro adicional com bezerros (19 bezerros x R$ 643,19/unidade) de R$ 12.220,61 na região de Araçatuba/SP.

6.2 Experimento 2

6.2.1 Avaliação das concentrações plasmáticas de progesterona

Conforme representado na Figura 14, as concentrações plasmáticas de P4, tanto para o Grupo Controle quanto para o Girassol, apresentaram efeito significativo de tempo ($P < 0,05$) onde do D0 até D11 caracterizou-se um aumento crescente nas concentrações de P4. No Grupo Controle as concentrações de P4 no D0, D7 e D11 foram de 2,24 ± 0,56ng/mL; 7,65 ± 0,69ng/mL e 14,24 ± 1,49ng/mL, respectivamente. No Grupo Girassol as concentrações de P4 no D0, D7 e D11 foram de 2,15 ± 0,32ng/mL; 7,13 ±

1,12ng/mL e 12,07 ± 1,76ng/mL, respectivamente. No D15, D19 e D22 tais concentrações decresceram sendo que no Grupo Controle foram de 14,03 ± 1,06ng/mL; 7,15 ± 2,18ng/mL e 2,43 ± 0,59ng/mL, respectivamente; e no Grupo Girassol foram de 15,66 ± 2,93ng/mL; 9,71 ± 2,38ng/mL e 4,55 ± 1,36ng/mL, respectivamente. Não houve interação entre tratamento x tempo, desta forma as concentrações plasmáticas de P4 não diferiram estatisticamente (P > 0,10) entre o Grupo Controle e Girassol no D0, D7, D11, D15, D19 e D22.

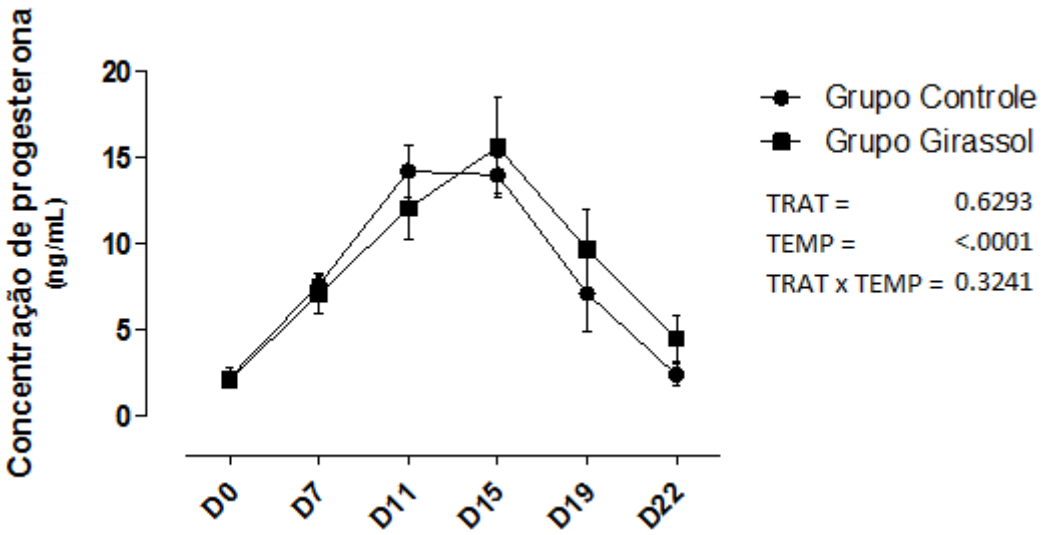


FIGURA 14 – Experimento 2: Efeito do tratamento, tempo e interação entre tratamento x tempo sobre as concentrações plasmáticas de P4 no D0, D7, D11, D15, D19 e D22 de vacas Nelore tratadas com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol; n = 10) ou não (Grupo Controle; n = 10); durante 22 dias, com início da suplementação 48 horas após a remoção do dispositivo (D0 a D22).

6.2.2 Avaliação das concentrações plasmáticas de lipídios

Conforme ilustrado na Figura 15, as concentrações plasmáticas de triglicerídeos, tanto para o Grupo Controle quanto para o Girassol, apresentaram efeito significativo de tempo (P < 0,05) apresentando oscilações de concentração ao longo do período estudado. As concentrações plasmáticas de triglicerídeos no D0, D7, D11, D15, D19 e D22 para o Grupo Controle foram

22,91 ± 1,42; 25,00 ± 1,53; 26,16 ± 2,70; 20,71 ± 1,60; 22,15 ± 1,42 e 27,47 ± 1,67mg/dL; respectivamente. Para o Grupo Girassol as concentrações foram 23,36 ± 1,04; 27,67 ± 1,62; 28,41 ± 1,36; 26,23 ± 1,30 e 26,30 ± 1,83mg/dL respectivamente. Não houve interação entre tratamento x tempo assim, as concentrações plasmáticas de triglicerídeos não diferiram estatisticamente (P > 0,10) entre o Grupo Controle e Girassol no D0, D7, D11, D15, D19 e D22.

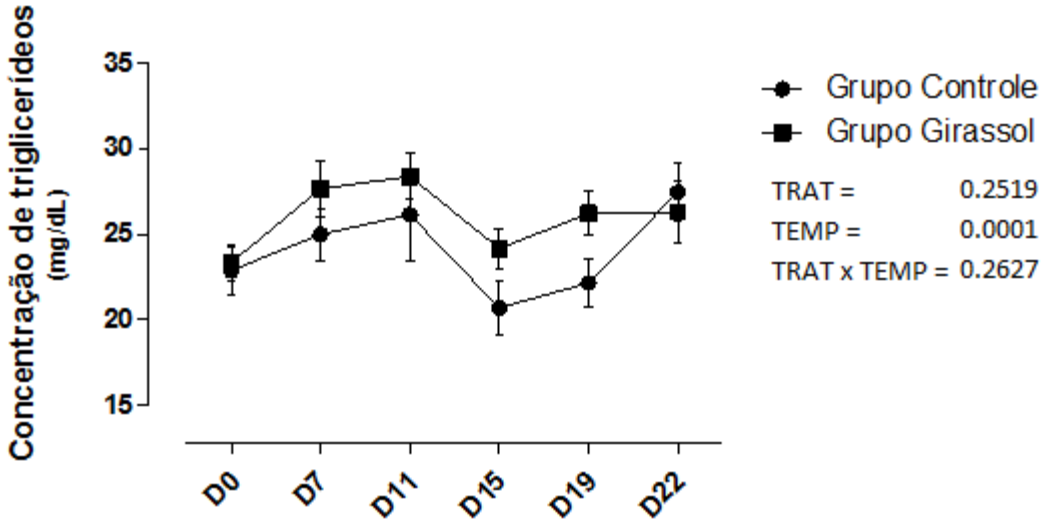


FIGURA 15 – Experimento 2: Efeito do tratamento, tempo e interação entre tratamento x tempo sobre as concentrações plasmáticas de triglicerídeos no D0, D7, D11, D15, D19 e D22 de vacas Nelore tratadas com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol; n = 10) ou não (Grupo Controle; n = 10) durante 22 dias, com início da suplementação 48 horas após a remoção do dispositivo (D0 a D22).

As concentrações plasmáticas de colesterol total estão ilustradas na Figura 16. Verificou-se que tanto no Grupo Controle com no Girassol houve efeito significativo de tempo (P < 0,05), tendo havido um aumento crescente nas concentrações de colesterol ao longo do D15, D19 e D22. As concentrações plasmáticas de colesterol total no D0, D7, D11, D15, D19 e D22 para o Grupo Controle foram 137,95 ± 6,14; 136,93 ± 5,55; 134,79 ± 6,25; 128,93 ± 7,18; 133,03 ± 7,27 e 142,32 ± 8,18mg/dL respectivamente. Para o Grupo Girassol foram de 128,76 ± 5,61; 135,67 ± 8,05; 142,44 ± 7,19; 142,49 ±

7,24; 150,03 ± 7,93 e 161,63 ± 6,65mg/dL respectivamente. Houve interação entre tratamento x tempo assim, observaram-se maiores concentrações plasmáticas de colesterol total (P < 0,05) no Grupo Girassol comparado ao Controle no D19 (150,03 ± 7,93 vs. 133,03 ± 7,27mg/dL) e D22 (161,63 ± 6,65 vs. 142,32 ± 8,18mg/dL).

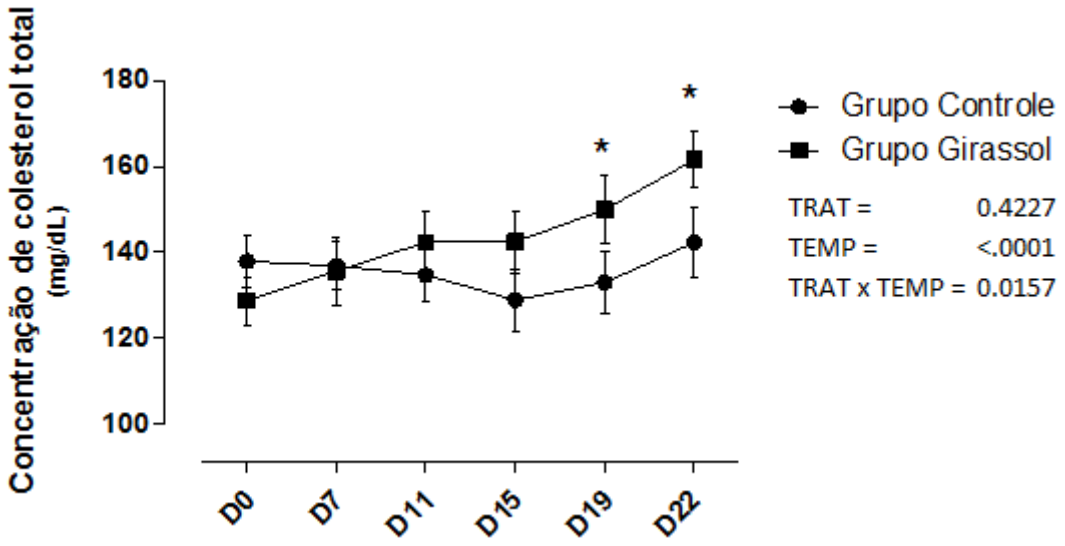


FIGURA 16 – Experimento 2: Efeito do tratamento, tempo e interação entre tratamento x tempo sobre as concentrações plasmáticas de colesterol total no D0, D7, D11, D15, D19 e D22 de vacas Nelore tratadas com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol; n = 10) ou não (Grupo Controle; n = 10); durante 22 dias, com início da suplementação 48 horas após a remoção do dispositivo (D0 a D22). (*) representam os pontos onde houve interação (P ≤ 0,05) entre tratamento e dia de suplementação.

Conforme ilustrado na Figura 17, as concentrações plasmáticas de HDL em ambos os grupos apresentaram efeito significativo de tempo (P < 0,05). As concentrações foram crescentes do D15 ao D22. No Grupo Controle, as concentrações plasmáticas de HDL no D0, D7, D11, D15, D19 e D22 foram de 36,88 ± 1,21; 37,08 ± 1,17; 37,05 ± 1,62; 36,94 ± 1,94; 38,78 ± 2,14 e 39,99 ± 2,47mg/dL. No Grupo Girassol as concentrações no D0, D7, D11, D15, D19 e D22 foram de 34,56 ± 1,22; 38,85 ± 1,75; 41,03 ± 1,65; 41,82 ± 1,82; 43,26 ± 1,85 e 45,17 ± 1,51mg/dL; respectivamente. Houve interação (P < 0,05) entre

tratamento x tempo assim, observaram-se maiores concentrações plasmáticas de HDL no Grupo Girassol comparado ao Controle no D11 (41,03 ± 1,65 vs. 37,05 ± 1,62mg/dL); D15 (41,82 ± 1,82 vs. 36,94 ± 1,94mg/dL); D19 (43,26 ± 1,85 vs. 38,78 ± 2,14mg/dL) e D22 (45,17 ± 1,51 vs. 39,99 ± 2,47mg/dL).

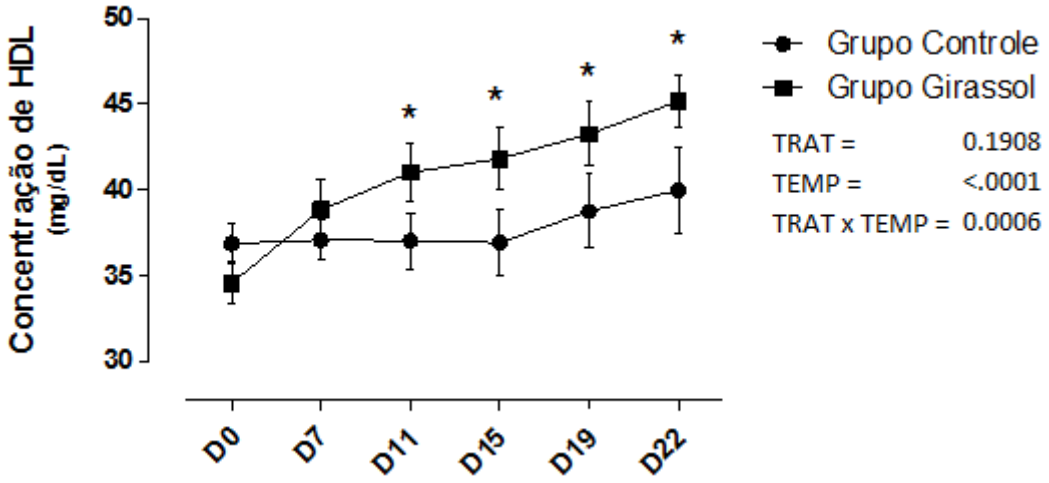


FIGURA 17 – Experimento 2: Efeito do tratamento, tempo e interação entre tratamento x tempo sobre as concentrações plasmáticas de HDL no D0, D7, D11, D15, D19 e D22 de vacas Nelore tratadas com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol; n = 10) ou não (Grupo Controle; n = 10); durante 22 dias, com início da suplementação 48 horas após a remoção do dispositivo (D0 a D22).
(*) representam os pontos onde houve interação (P ≤ 0,05) entre tratamento e dia de suplementação.

As concentrações plasmáticas de LDL estão ilustradas na Figura18. Em ambos os grupos houve efeito significativo de tempo (P < 0,05). As concentrações de LDL aumentaram do D15 ao D22. No Grupo Controle as concentrações plasmáticas de LDL no D0, D7, D11, D15, D19 e D22 foram 96,48 ± 5,26; 94,85 ± 4,78; 92,51 ± 4,98; 87,85 ± 5,60; 89,83 ± 5,62 e 96,82 ± 6,33mg/dL; respectivamente. No Grupo Girassol foram 89,52 ± 4,43; 91,29 ± 6,23; 95,74 ± 5,80; 95,84 ± 5,66; 101,52 ± 6,39 e 111,20 ± 5,40mg/dL; respectivamente. Houve interação entre tratamento x tempo (P < 0,05), onde observou-se maior concentração plasmática de LDL no Grupo Girassol

comparado ao Controle no D22 (111,20 ± 5,40 vs. 96,82 ± 6,33mg/dL, respectivamente).

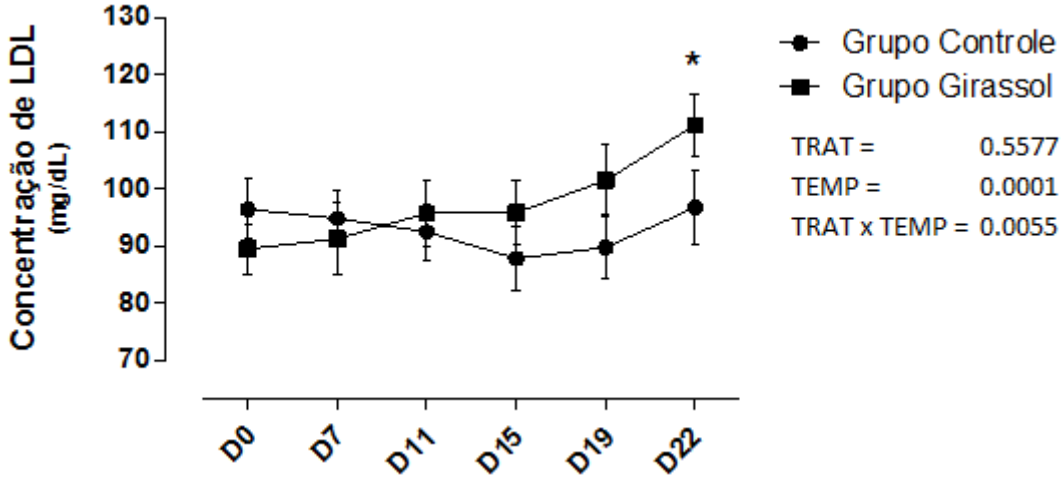


FIGURA 18 – Experimento 2: Efeito do tratamento, tempo e interação entre tratamento x tempo sobre as concentrações plasmáticas de LDL no D0, D7, D11, D15, D19 e D22 de vacas Nelore tratadas com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol; n = 10) ou não (Grupo Controle; n = 10); durante 22 dias, com início da suplementação 48 horas após a remoção do dispositivo (D0 a D22).
(*) representa o ponto onde houve interação (P ≤ 0,05) entre tratamento e dia de suplementação.

6.2.3 Avaliação do diâmetro e da área do corpo lúteo

A avaliação pertinente ao diâmetro do corpo lúteo está representada na Figura 19. Observou-se que o valor médio do diâmetro do corpo lúteo foi maior (P ≤ 0,05) no Grupo Girassol comparado ao Controle no D6 (1,59 ± 0,13 vs. 1,24 ± 0,13cm; respectivamente). Entretanto, não foram observadas diferenças (P > 0,10) entre os Grupos Controle e Girassol no D14 (1,77 ± 0,11 vs. 1,94 ± 0,11cm, respectivamente) e D22 (1,23 ± 0,10 vs. 1,39 ± 0,10cm, respectivamente).

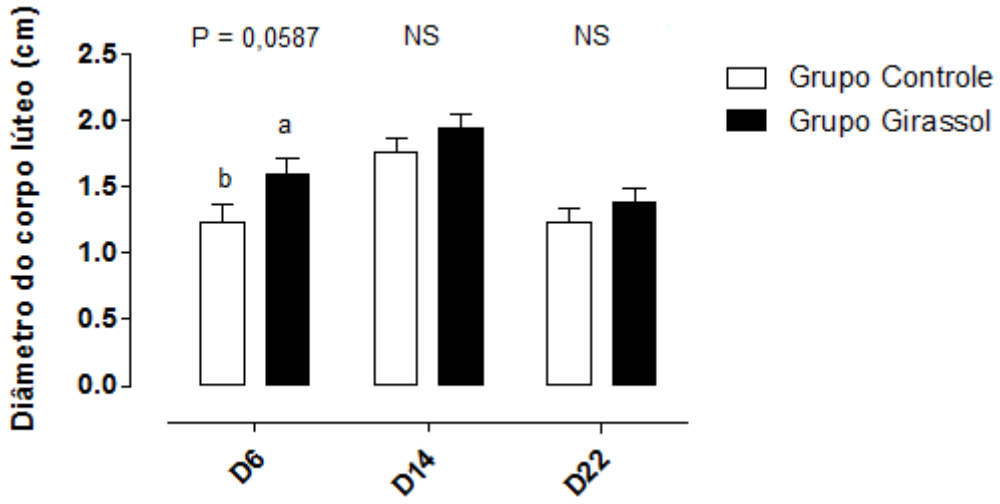


FIGURA 19 – Experimento 2: Diâmetro do corpo lúteo (média ± erro padrão da média) de vacas Nelore tratadas com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol; n = 30) ou não (Grupo Controle; n = 30); durante 6, 14 ou 22 dias, com início da suplementação 48 horas após a remoção do dispositivo.
[NS] Demonstra que o valor de P não foi significativo.

A avaliação pertinente a área total do corpo lúteo está representada na Figura 20. Observou-se que o valor médio da área do corpo lúteo foi maior ($P < 0,10$) no Grupo Girassol comparado ao Controle no D6 (2,02 ± 0,26 vs. 1,30 ± 0,26cm^2; respectivamente). Entretanto, não foram observadas diferenças estatísticas significativas ($P > 0,10$) entre os Grupos Controle e Girassol no D14 (2,51 ± 0,26 vs. 2,91 ± 0,26cm^2, respectivamente) e D22 (1,34 ± 0,22 vs. 1,57 ± 0,22cm^2, respectivamente).

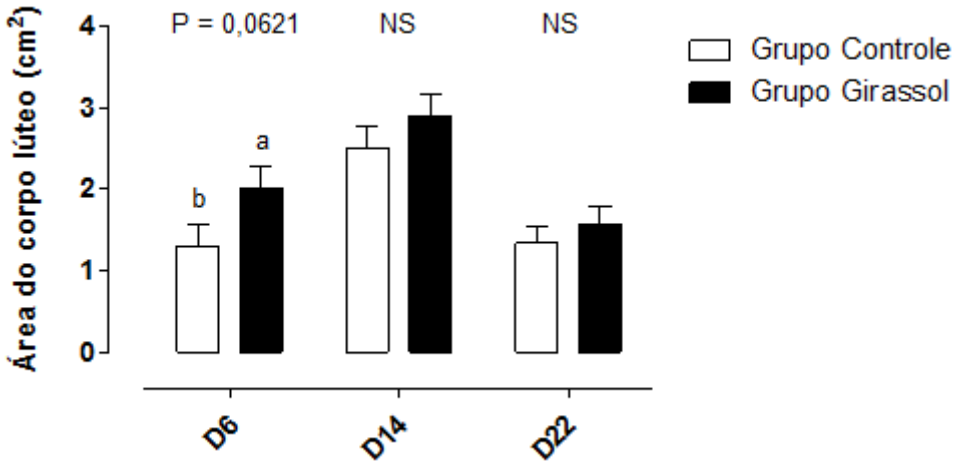


FIGURA 20 – Experimento 2: Área total do corpo lúteo (média ± erro padrão da média) de vacas Nelore tratadas com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol; n = 30) ou não (Grupo Controle; n = 30); durante 6, 14 ou 22 dias, com início da suplementação 48 horas após a remoção do dispositivo.
[NS] Demonstra que o valor de P não foi significativo.

6.2.4 Avaliação do perfil de ácidos graxos endometriais por cromatografia gasosa

A avaliação do perfil de ácidos graxos endometriais está ilustrada na Tabela 6. Foram avaliados o total de 54 ácidos graxos. Destes, verificou-se a presença de 43 ácidos graxos no tecido endometrial. Os ácidos graxos que não estavam presentes no referido tecido foram: C4:0, C11:0, C12:1, C:13:0, C13:0 ISO, C13:0 ANTEISO, C14:0 ISO, C15:1, C18:1 T16, C18:2 T10 C12 e C21:0 Considerando os ácidos graxos presentes, oito apresentaram diferenças significativas em percentual entre o Grupo Controle e Grupo Girassol.

Tabela 6 – Perfil de ácidos graxos identificados em “pools” de tecido endometrial obtido a partir de amostras de endométrio coletadas no D7, D15 e D23 de vacas Nelore tratadas com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol) ou não (Grupo Controle) com início da suplementação 48 horas após a remoção do dispositivo (D0 ao D22). Para confecção do “pool” do Grupo Girassol foram utilizadas 4 fêmeas no D7, 5 fêmeas no D15 e fêmeas no D23 e para confecção do “pool” do Grupo Controle utilizou-se a mesma quantidade de animais/dia

Ácido Graxo	Abreviatura	Grupo Controle (%)	Grupo Girassol (%)	Valor P
Cadeia curta				
Hexanóico	C6:0	0,0155 ± 0,0045	0,0470 ± 0,0330	NS
Octanóico	C8:0	0,0163 ± 0,0018	0,0340 ± 0,0180	NS
Decanóico	C10:0	0,0263 ± 0,0038	0,0650 ± 0,0390	NS
Decenóico	C10:1	0,0233 ± 0,0020^{y}	0,0297 ± 0,0018^{x}	0,0864
Cadeia média				
Dodecanóico	C12:0	0,0323 ± 0,0306	0,0780 ± 0,0306	NS
Tetradecanóico	C14:0	0,9380 ± 0,0219	1,2043 ± 0,2487	NS
cis-9-tetradecenóico	C14:1 C9	0,0187 ± 0,0023	0,0680 ± 0,0420	NS
Pentadecanóico	C15:0	0,3463 ± 0,02330	0,3573 ± 0,02330	NS
iso-pentadecanóico	C15:0 ISO	0,3467 ± 0,01548^{a}	0,2857 ± 0,01548^{b}	0,0495
Anteiso-pentadecanóico	C15:0 ANTEISO	0,3313 ± 0,02289	0,2813 ± 0,02289	NS
Hexadecanóico	C16:0	16,3367 ± 0,5587	17,0197 ± 0,5587	NS
iso-hexadecanóico	C16:0 ISO	0,2327 ± 0,04962	0,1600 ± 0,04962	NS
cis-9-hexadecenóico	C16:1 C9	0,6460 ± 0,04822	0,6367 ± 0,04822	NS
Cadeia longa				
Heptadecanóico	C17:0	0,7300 ± 0,03453	0,6457 ± 0,03453	NS
iso-heptadecanóico	C17:0 ISO	0,1393 ± 0,01239	0,1477 ± 0,01239	NS
Heptadecenóico	C17:1	0,1710 ± 0,04568	0,2063 ± 0,04568	NS
Octadecanóico	C18:0	19,8227 ± 0,6146	19,3790 ± 0,6146	NS
trans-6,7,8,9-octadecenóico	C18:1 T6-T7-T8-T9	0,1130 ± 0,02858	0,1720 ± 0,02858	NS
trans-10,11,12-octadecenóico	C18:1 T10-T11-T12	0,5933 ± 0,08999^{b}	1,1267 ± 0,08999^{a}	0,0138
cis-9-octadecenóico	C18:1 C9	23,8170 ± 0,7231	24,2173 ± 0,7231	NS
cis-11-octadecenóico	C18:1 C11	2,6440 ± 0,1496	2,6510 ± 0,1496	NS
cis-12-octadecenóico	C18:1 C12	0,6540 ± 0,02586	0,7103 ± 0,02586	NS
cis-13-octadecenóico	C18:1 C13	0,1127 ± 0,02335	0,1667 ± 0,02335	NS
cis-15-octadecenóico	C18:1 C15	0,0417 ± 0,0082	0,0323 ± 0,0082	NS
cis-9-trans-11 octadienóico	C18:2 C9-T11	0,1497 ± 0,02809	0,1907 ± 0,02809	NS
cis-9,12-octadienóico	C18:2 C9-C12	6,2910 ± 0,4552	6,5630 ± 0,4552	NS
n3-octatrienóico	C18:3 n3	0,3040 ± 0,03233	0,2590 ± 0,03233	NS
n6-octatrienóico	C18:3 n6	0,1697 ± 0,08539	0,2237 ± 0,08539	NS
Eicosanóico	C20:0	0,2767 ± 0,01326	0,2873 ± 0,01326	NS
Eicosenóico	C20:1	0,5330 ± 0,03519	0,5453 ± 0,03519	NS

Eicosadienóico	C20:2	0,3613 ± 0,04500	0,4433 ± 0,04500	NS
n3-eicosatrienóico	C20:3n3	0,5840 ± 0,03367[x]	0,4530 ± 0,03367[y]	0,0513
n6-eicosatrienóico	C20:3n6	2,1107 ± 0,2229	1,8840 ± 0,2229	NS
Eicosatetraenóico	C20:4	10,9203 ± 0,7357	10,5740 ± 0,7357	NS
Eicosapentaenóico	C20:5	0,5743 ± 0,04493[a]	0,3907 ± 0,04493[b]	0,0446
Docosanóico	C22:0	0,1167 ± 0,01919	0,08633 ± 0,01919	NS
Docosenóico	C22:1	0,07833 ± 0,01216	0,05233 ± 0,01216	NS
Docosadienóico	C22:2	0,04850 ± 0,02155	0,04300 ± 0,01760	NS
Docosapentaenóico	C22:5	3,8953 ± 0,1646[x]	3,3490 ± 0,1646[y]	0,0788
Docosahexaenóico	C22:6	3,4370 ± 0,2576	2,8453 ± 0,2576	NS
Tricosanóico	C23:0	0,0673 ± 0,0012[x]	0,0430 ± 0,0103[y]	0,0781
Tetracosananóico	C24:0	0,08467 ± 0,01028[x]	0,05067 ± 0,01028[y]	0,0796
Tetracosenóico	C24:1	0,7940 ± 0,2665	1,3140 ± 0,2665	NS
	Percentual total de ácidos graxos no tecido endometrial (%)	98,941	99,319	

[a,b] Letras diferentes na mesma linha indicam que os grupos diferem de maneira significativa (P < 0,05);
[x,y] Letras diferentes na mesma linha indicam uma tendência a significância (P < 0,10).
[NS] Demonstra que o valor de P não foi significativo.

Conforme representado na Figura 21, os ácidos graxos que apresentaram maior percentual no Grupo Girassol comparado ao Controle foram C18:1 T10-T11-T12 e C10:1. Os ácidos graxos que apresentaram menor percentual no Grupo Girassol comparado ao Controle foram C15:0 ISO, C20:5, C20:3n3, C23:0, C24:0 e C22:5.

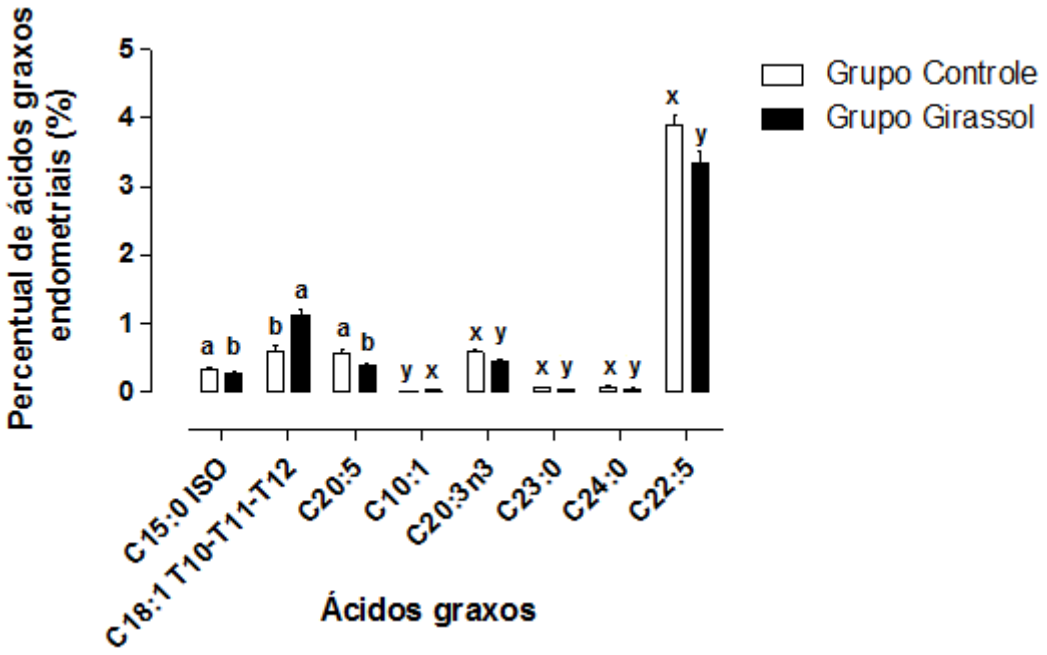


FIGURA 21 – Experimento 2: Percentual de lipídios endometriais identificados em “pools” de tecido endometrial obtido a partir de amostras de endométrio coletadas no D7, D15 e D23 de vacas Nelore tratadas com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol) ou não (Grupo Controle) com início da suplementação 48 horas após a remoção do dispositivo (D0).

6.2.5 Análise de expressão gênica por PCR em tempo real

Todos os “primers” utilizados nas análises de PCR em tempo real foram validados conforme descrito anteriormente no item 5.2.12.4 e os resultados das validações encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7 – Características das reações de amplificações e da curva padrão para validação dos "primers"

Nomenclatura Gene	Gene	Inclinação da Curva Padrão (Slope)	R^2	Eficiência Curva-padrão (%)
Phospholipase A2	PLA2G10	-3,26	0,97	100,3
Prostaglandin endoperoxide synthase2	PTGS2	-2,87	0,97	88,5
Prostaglandin E synthase	PTGES1	-3,33	0,99	99,6
Prostaglandin E synthase 2	PTGES2	-3,44	0,99	95,3
Aldo-ceto reductase, family1, member B1	AKR1B1	-3,48	1,00	93,9
Aldo-ceto reductase, family1, member C4	AKR1C4	-3,51	1,00	92,6
Prostaglandin E receptor 2	PTGER2	-3,24	0,96	103,3
Prostaglandin E receptor 4	PTGER4	-3,24	0,99	103,6

A abundância relativa de transcritos envolvidos na biossíntese de eicosanoides no endométrio nos dias 6, 14 e 22 pós-início da suplementação das fêmeas do Grupo Controle e Grupo Girassol está representada na Tabela 8. Observaram-se diferenças estatísticas significativas entre grupos e/ou dias pós-início da suplementação para os transcritos PTGER4, AKR1B1, AKR1C4 e PTGS2.

Tabela 8 – Abundância relativa (média ± erro padrão da média) de transcritos envolvidos na biossíntese de eicosanoides no endométrio nos dias 6, 14 e 22 pós-início da suplementação de vacas Nelore tratadas com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol) ou não (Grupo Controle) com início da suplementação 48 horas após a remoção do dispositivo (D0 ao D22)

Transcrito	D6		D14		D22	
	Grupo Controle	Grupo Girassol	Grupo Controle	Grupo Girassol	Grupo Controle	Grupo Girassol
PTGES1	0,027 ± 0,012	0,023 ± 0,011	0,022 ± 0,004	0,039 ± 0,010	0,030 ± 0,014	0,025 ± 0,006
PTGES2	0,036 ± 0,010	0,038 ± 0,007	0,0039 ± 0,010	0,040 ± 0,009	0,038 ± 0,015	0,058 ± 0,007
PTGER2	0,027 ± 0,012	0,012 ± 0,005	0,036 ± 0,018	0,020 ± 0,007	0,024 ± 0,006	0,021 ± 0,003
PTGER4	0,024 ± 0,015	0,022 ± 0,012b	0,035 ± 0,014	0,055 ± 0,019a	0,033 ± 0,007A	0,016 ± 0,004b, B
AKR1B1	6,958 ± 4,207	7,844 ± 3,900ab	17,462 ± 6,810	16,531 ± 10,451a	4,385 ± 1,648	2,231 ± 0,759b
AKR1C4	0,041 ± 0,023c	0,054 ± 0,032c	0,615 ± 0,105a	0,653 ± 0,402a	0,185 ± 0,091b	0,229 ± 0,099b
PTGS2	0,129 ± 0,114b	0,021± 0,004b	0,230 ± 0,056a	0,137 ± 0,026a	0,094 ± 0,023ab, Y	0,405 ± 0,196a, X
PLA2G10	0,006 ± 0,003	0,003 ± 0,001	0,025 ± 0,008	0,038 ± 0,037	0,010 ± 0,009	0,005 ± 0,004

^{A,B} Letras diferentes na mesma linha em cada dia indicam que os grupos diferem (P < 0,05);
^{X,Y} Letras diferentes na mesma linha em cada dia indicam que os grupos diferem (P < 0,1);
^{a,b,c} Letras diferentes na mesma linha em cada grupo indicam que os dias diferem (P < 0,05).

Conforme representado na Figura 22, o endométrio das vacas tratadas com semente de girassol apresentou maior expressão (P < 0,05) do transcrito do receptor de membrana PTGER4 (receptor 4 de prostaglandina E) no D14 quando comparada à expressão do mesmo transcrito no D6 e D22 (0,055 ± 0,019 vs. 0,022 ± 0,012 vs. 0,016 ± 0,004, respectivamente). No Grupo Controle, a expressão do transcrito não apresentou diferença estatística (P > 0,10) entre os dias 6, 14 e 22 (0,024 ± 0,015 vs. 0,035 ± 0,014 vs. 0,033 ± 0,007, respectivamente). No D22 houve interação tempo e tratamento, portanto a expressão do transcrito diferiu entre os grupos sendo maior no Grupo Controle comparado ao Girassol (0,033 ± 0,007 vs. 0,016 ± 0,004, respectivamente; P < 0,05).

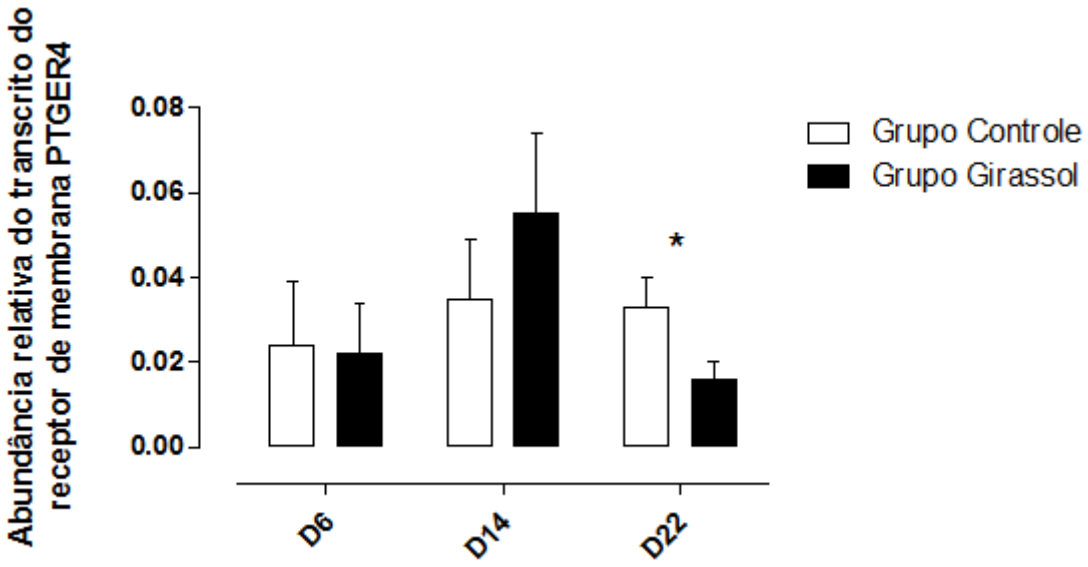


FIGURA 22 – Experimento 2: Abundância relativa (média ± erro padrão da média) do transcrito do receptor de membrana PTGER4 no endométrio nos dias 6, 14 e 22 de vacas Nelore tratadas com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol; n = 19) ou não (Grupo Controle; n = 20) com início da suplementação 48 horas após a remoção do dispositivo (D0).
(*) representa o ponto onde houve interação entre tratamento e dia de suplementação.

Conforme representado na Figura 23, No Grupo Girassol houve maior expressão do transcrito da COX-2 no D14, apresentando diferença estatística significativa ($P < 0,05$), quando comparada à expressão do transcrito no D6 (0,137 ± 0,026 vs. 0,021 ± 0,004, respectivamente), porém a expressão do mesmo não diferiu significativamente entre o D14 e D22 (0,137 ± 0,026 vs. 0,405 ± 0,196, respectivamente; $P > 0,10$). No Grupo Controle, a expressão do transcrito foi maior no D14 quando comparada a expressão do mesmo no D6 (0,230 ± 0,056 vs. 0,129 ± 0,114, respectivamente; $P < 0,05$), entretanto a expressão desse não apresentou diferença estatística ($P > 0,10$) entre o D6 e D22 (0,129 ± 0,114 vs. 0,094 ± 0,023, respectivamente). No D22 houve interação tratamento x tempo e, portanto, a expressão do transcrito diferiu entre os grupos sendo maior no Grupo Girassol comparado ao Controle (0,405 ± 0,196 vs. 0,094 ± 0,023, respectivamente; $P < 0,10$).

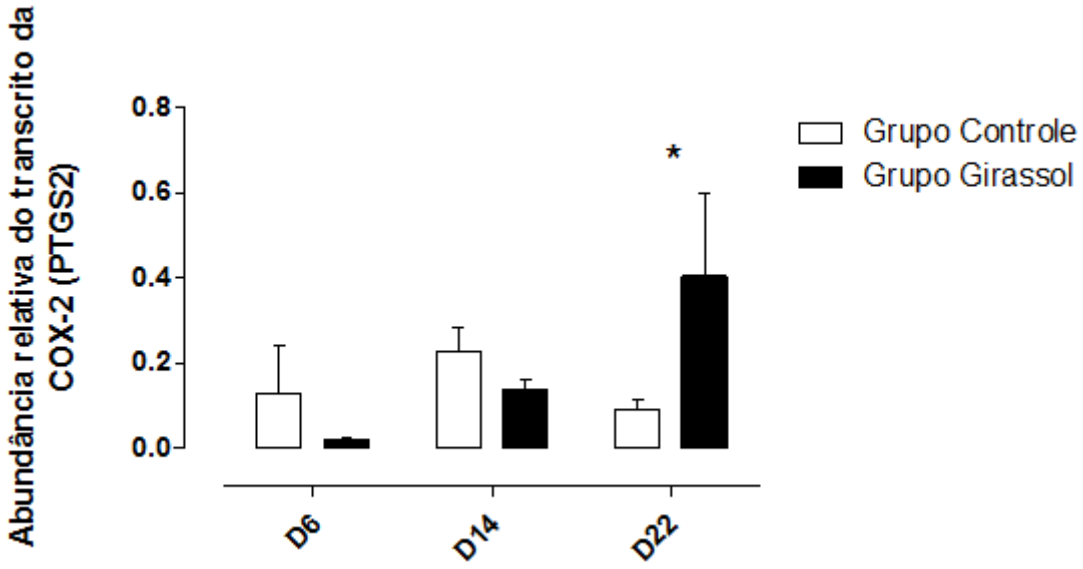


FIGURA 23 – Abundância relativa (média ± erro padrão da média) do transcrito da COX-2 (PTGS2) no endométrio nos dias 6, 14 e 22 de vacas Nelore tratadas com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol; n = 19) ou não (Grupo Controle; n = 20) com início da suplementação 48 horas após a remoção do dispositivo (D0).
(*) representa o ponto onde houve interação entre tratamento e dia de suplementação.

Conforme ilustrado na Figura 24, em ambos os grupos houve maior ($P < 0,05$) expressão do transcrito da enzima AKR1C4 no D14 quando comparada à expressão do transcrito no D22 e D6 (Grupo Controle – 0,615 ± 0,105 vs. 0,185 ± 0,091 vs. 0,041 ± 0,023, respectivamente e Grupo Girassol – 0,653 ± 0,402 vs. 0,229 ± 0,099 vs. 0,054 ± 0,032, respectivamente). De acordo com os dados supracitados, observou-se também que houve maior expressão da enzima no D22 quando comparada à expressão do transcrito no D6 ($P < 0,05$). Não houve diferença estatística entre o Grupo Controle e o Grupo Girassol.

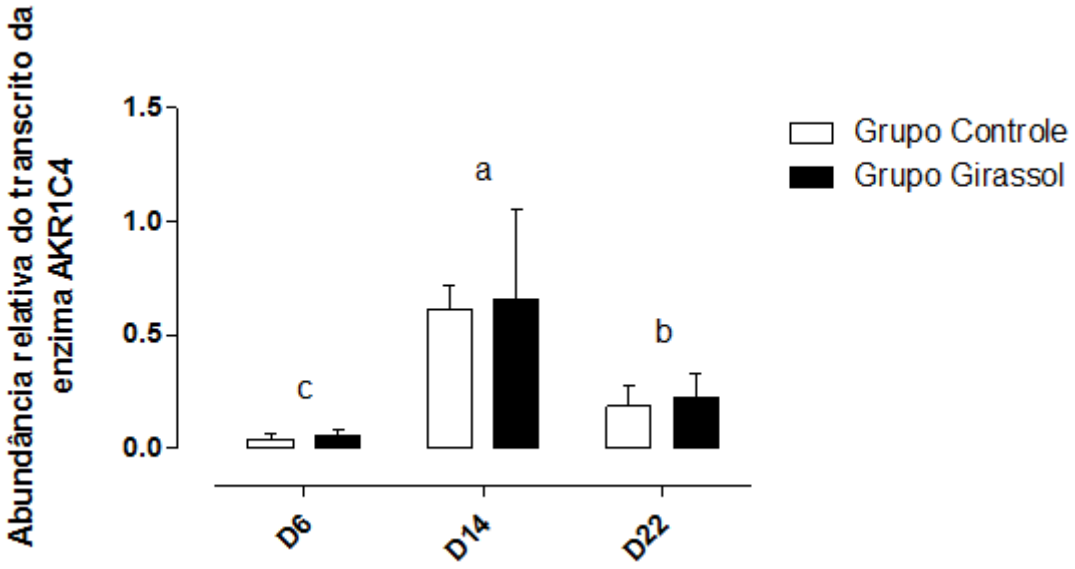


FIGURA 24 – Abundância relativa (média ± erro padrão da média) do transcrito da enzima AKR1C4 no endométrio nos dias 6, 14 e 22 de vacas Nelore tratadas com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol; n = 19) ou não (Grupo Controle; n = 20) com início da suplementação 48 horas após a remoção do dispositivo (D0).

Conforme ilustrado na Figura 25, em ambos os grupos a expressão do transcrito da enzima AKR1B1 não diferiu estatisticamente (P > 0,10) entre D6 e D14 (Grupo Controle – 6,958 ± vs. 17,462 ± 6,810, respectivamente e Grupo Girassol – 7,844 ± 3,900 vs. 16,531 ± 10,451, respectivamente) e entre D6 e D22 (Grupo Controle – 6,958 ± 4,207 vs. 4,385 ± 1,648, respectivamente e Grupo Girassol – 7,844 ± 3,900 vs. 2,231 ± 0,759, respectivamente). Não houve diferença estatística entre o Grupo Controle e o Grupo Girassol.

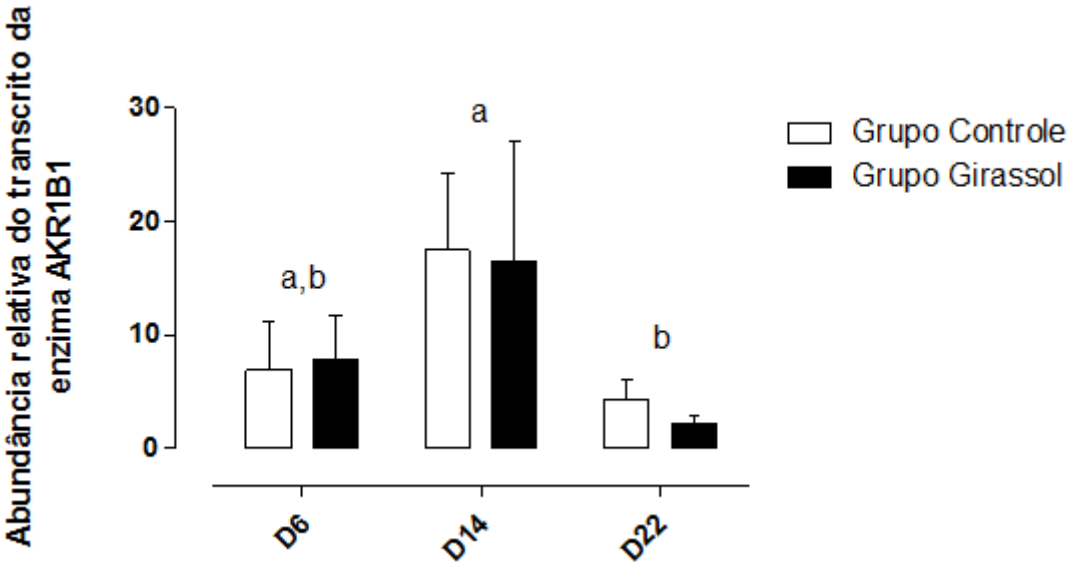


FIGURA 25 – Abundância relativa (média ± erro padrão da média) do transcrito da enzima AKR1B1 no endométrio nos dias 6, 14 e 22 de vacas Nelore tratadas com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol; n = 19) ou não (Grupo Controle; n = 20) com início da suplementação 48 horas após a remoção do dispositivo (D0).

6.2.6 Análise morfométrica e número de glândulas endometriais

A análise morfométrica pertinente ao diâmetro das glândulas endometriais está representada na Figura 26. Observou-se que o valor médio para o diâmetro das glândulas endometriais foi maior ($P < 0,01$) no Grupo Controle comparado ao Girassol no D15 (62,38 ± 1,66 vs. 54,78 ± 1,52µm, respectivamente). Entretanto, não foram observadas diferenças estatísticas significativas ($P > 0,10$) entre os Grupos Controle e Girassol no D7 (59,62 ± 2,65 vs. 55,75 ± 2,17µm, respectivamente) e D23 (57,46 ± 1,90 vs. 54,67 ± 1,90µm, respectivamente).

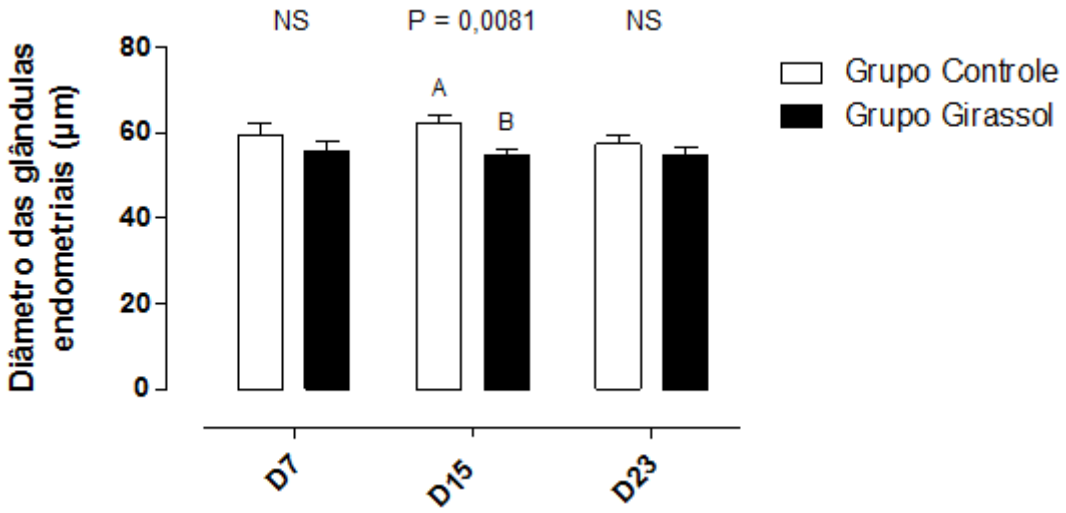


FIGURA 26 – Experimento 2: Diâmetro das glândulas endometriais (média ± erro padrão da média) de vacas Nelore tratadas com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol; n = 18) ou não (Grupo Controle; n = 15); durante 6,14 ou 22 dias, com início da suplementação 48 horas após a remoção do dispositivo (D0).
NS Demonstra que o valor de P não foi significativo.

A análise morfométrica pertinente ao diâmetro das glândulas endometriais considerando somente o efeito do tratamento está representada na Figura 27. Observou-se que o valor médio para o diâmetro das glândulas endometriais foi maior no Grupo Controle comparado ao Girassol (59,68 ± 1,17 vs. 55,07 ± 1,07, respectivamente; $P < 0,05$).

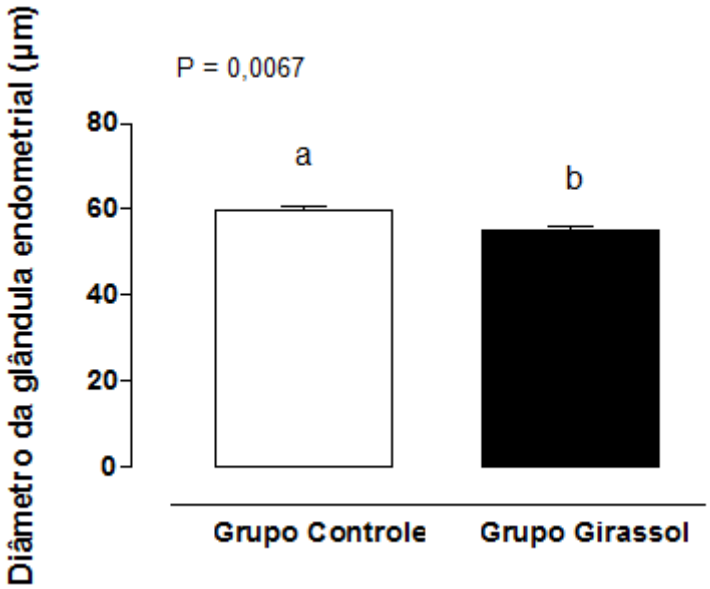


FIGURA 27 – Experimento 2: Diâmetro das glândulas endometriais (média ± erro padrão da média), considerando efeito de tratamento, de vacas Nelore tratadas com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol; n = 18) ou não (Grupo Controle; n = 15).

A análise morfométrica pertinente ao perímetro das glândulas endometriais está representada na Figura 28. Observou-se que o valor médio para perímetro das glândulas endometriais não diferiu estatisticamente (P > 0,10) entre o Grupo Controle e Girassol no D7 (255,30 ± 18,81 vs. 237,00 ± 15,36µm, respectivamente), D15 (237,13 ± 13,96 vs. 215,01 ± 12,75µm, respectivamente) e D23 (219,61 ± 12,19 vs. 197,98 ± 12,19µm, respectivamente).

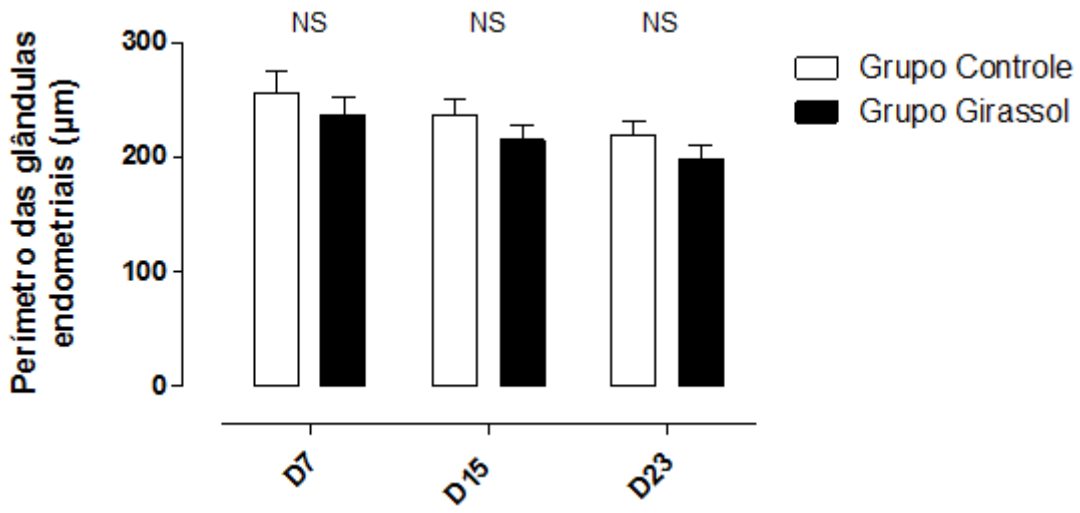


FIGURA 28 – Experimento 2: Perímetro das glândulas endometriais (média ± erro padrão da média) de vacas Nelore tratadas com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol; n = 18) ou não (Grupo Controle; n = 15); durante 6,14 ou 22 dias, com início da suplementação 48 horas após a remoção do dispositivo (D0).
^{NS} Demonstra que o valor de P não foi significativo.

A análise morfométrica pertinente ao perímetro das glândulas endometriais considerando somente o efeito do tratamento está representada na Figura 29. Observou-se que o valor médio para perímetro das glândulas endometriais não diferiu estatisticamente entre o Grupo Controle e Girassol (234,97 ± 8,88 vs. 216,67 ± 8,11, respectivamente; P > 0,10).

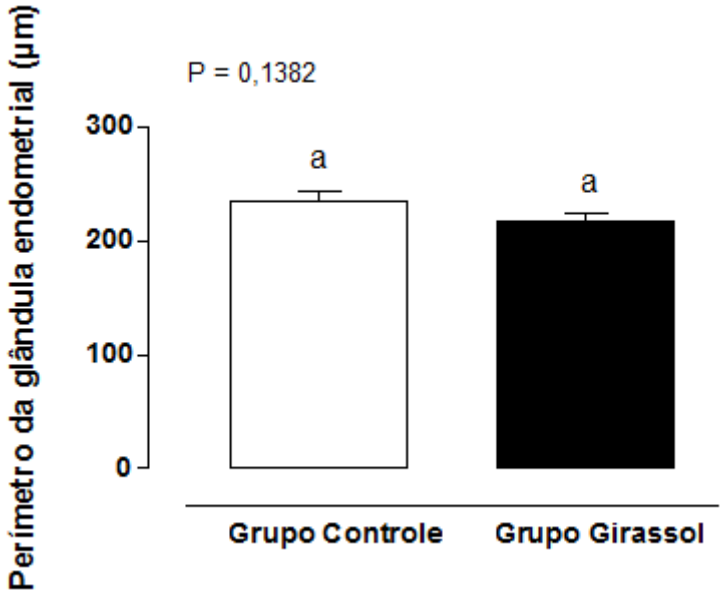


FIGURA 29 – Experimento 2: Perímetro das glândulas endometriais (média ± erro padrão da média), considerando efeito de tratamento, de vacas Nelore tratadas com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol; n = 18) ou não (Grupo Controle; n = 15).

A análise morfométrica pertinente a área das glândulas endometriais está representada na Figura 30. Observou-se que o valor médio para área das glândulas endometriais não diferiu estatisticamente (P > 0,10) entre o Grupo Controle e Girassol no D7 (3863,26 ± 536,21 vs. 3310,47 ± 426,99µm^2, respectivamente), D15 (3308,45 ± 45,45 vs. 2996,96 ± 420,39µm^2, respectivamente) e D23 (3024,96 ± 324,34 vs. 2622,10 ± 69,14µm^2, respectivamente).

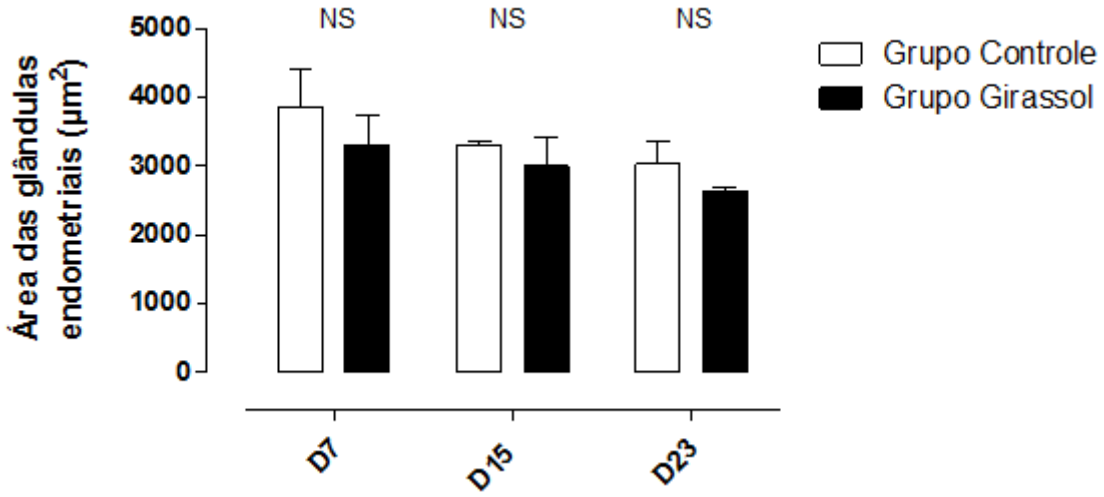


FIGURA 30 – Experimento 2: Área das glândulas endometriais (média ± erro padrão da média) de vacas Nelore tratadas com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol; n = 18) ou não (Grupo Controle; n = 15); durante 6,14 ou 22 dias, com início da suplementação 48 horas após a remoção do dispositivo (D0).
[NS] Demonstra que o valor de P não foi significativo.

A análise morfométrica pertinente a área das glândulas endometriais considerando somente o efeito do tratamento está representada na Figura 31. Observou-se que o valor médio para área das glândulas endometriais não diferiu estatisticamente entre o Grupo Controle e Girassol (3343,00 ± 199,32 vs. 2976,51 ± 200,82, respectivamente; P > 0,10).

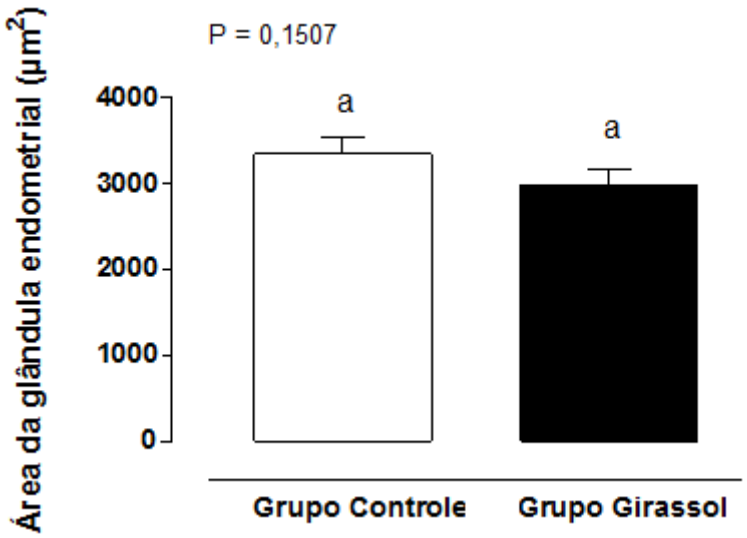


FIGURA 31 – Experimento 2: Área das glândulas endometriais (média ± erro padrão da média), considerando efeito de tratamento, de vacas Nelore tratadas com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol; n = 18) ou não (Grupo Controle; n = 15).

A análise pertinente a contagem do número de glândulas endometriais por campo óptico no D7, D15 e D23 pós-início da suplementação está representada na Figura 32. Observou-se que o valor médio para número de glândulas endometriais por campo óptico não diferiu estatisticamente (P > 0,10) entre o Grupo Controle e Girassol no D7 (201 ± 25,52 vs. 286 ± 49,43, respectivamente), D15 (197 ± 32,34 vs. 369 ± 79,01, respectivamente) e D23 (255 ± 30,42 vs. 327 ± 45,93, respectivamente).

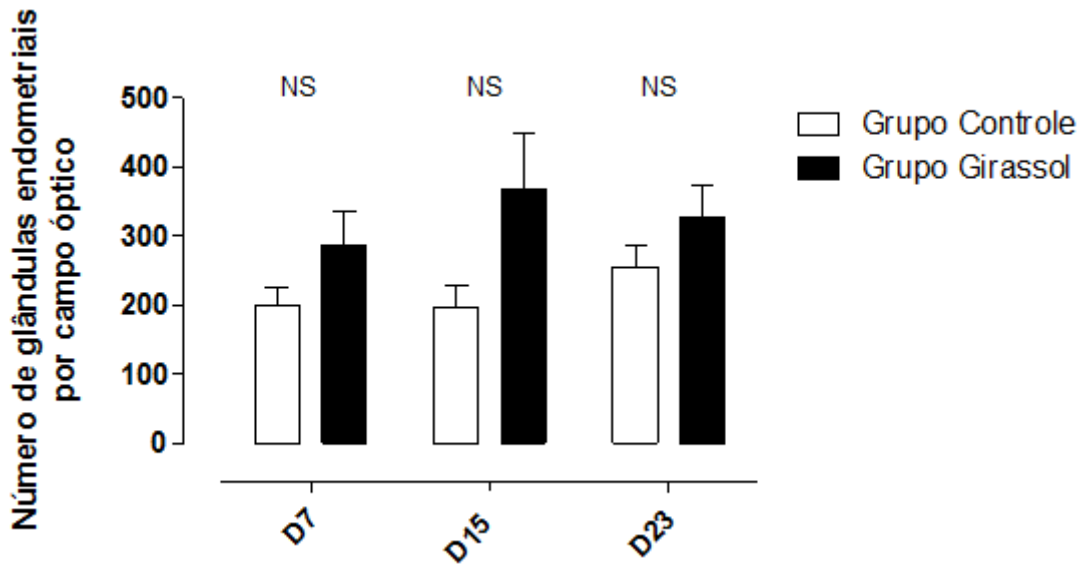


FIGURA 32 – Experimento 2: Número de glândulas endometriais por campo óptico (média ± erro padrão da média) de vacas Nelore tratadas com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol; n = 18) ou não (Grupo Controle; n = 15); durante 6,14 ou 22 dias, com início da suplementação 48 horas após a remoção do dispositivo (D0).
^{NS} Demonstra que o valor de P não foi significativo.

A análise pertinente a contagem do número de glândulas endometriais por campo óptico considerando somente o efeito do tratamento está representada na Figura 33. Observou-se que valor médio para número de glândulas endometriais por campo óptico foi maior no Grupo Girassol comparado ao Controle (327 ± 33,56 vs. 221 ± 18,00, respectivamente; $P < 0,05$).

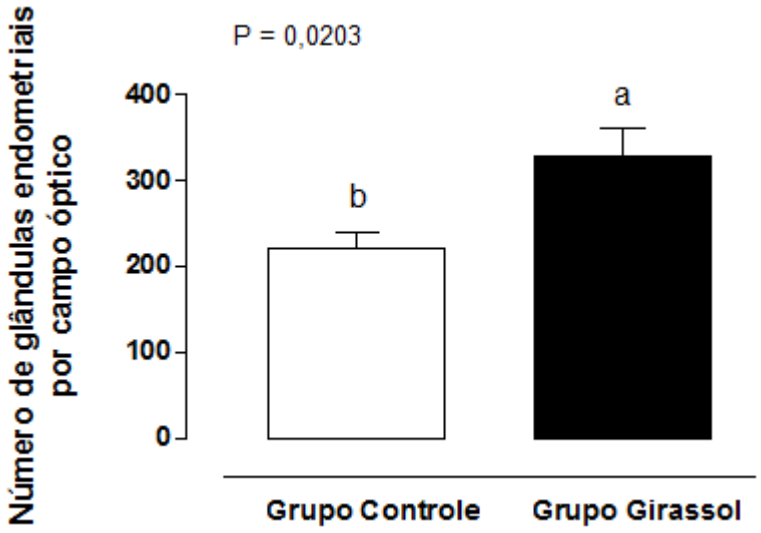


FIGURA 33 – Experimento 2: Número de glândulas endometriais por campo óptico (média ± erro padrão da média), considerando efeito de tratamento, de vacas Nelore tratadas com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol; n = 18) ou não (Grupo Controle; n = 15).

As imagens das glândulas endometriais, em aumento 10x, das fêmeas suplementadas com semente de girassol (Grupo Girassol) ou não (Grupo Controle) por 6, 14 ou 22 dias e abatidas no dia 7, 15 ou 23 pós-início da suplementação podem ser observadas na Figura 34.

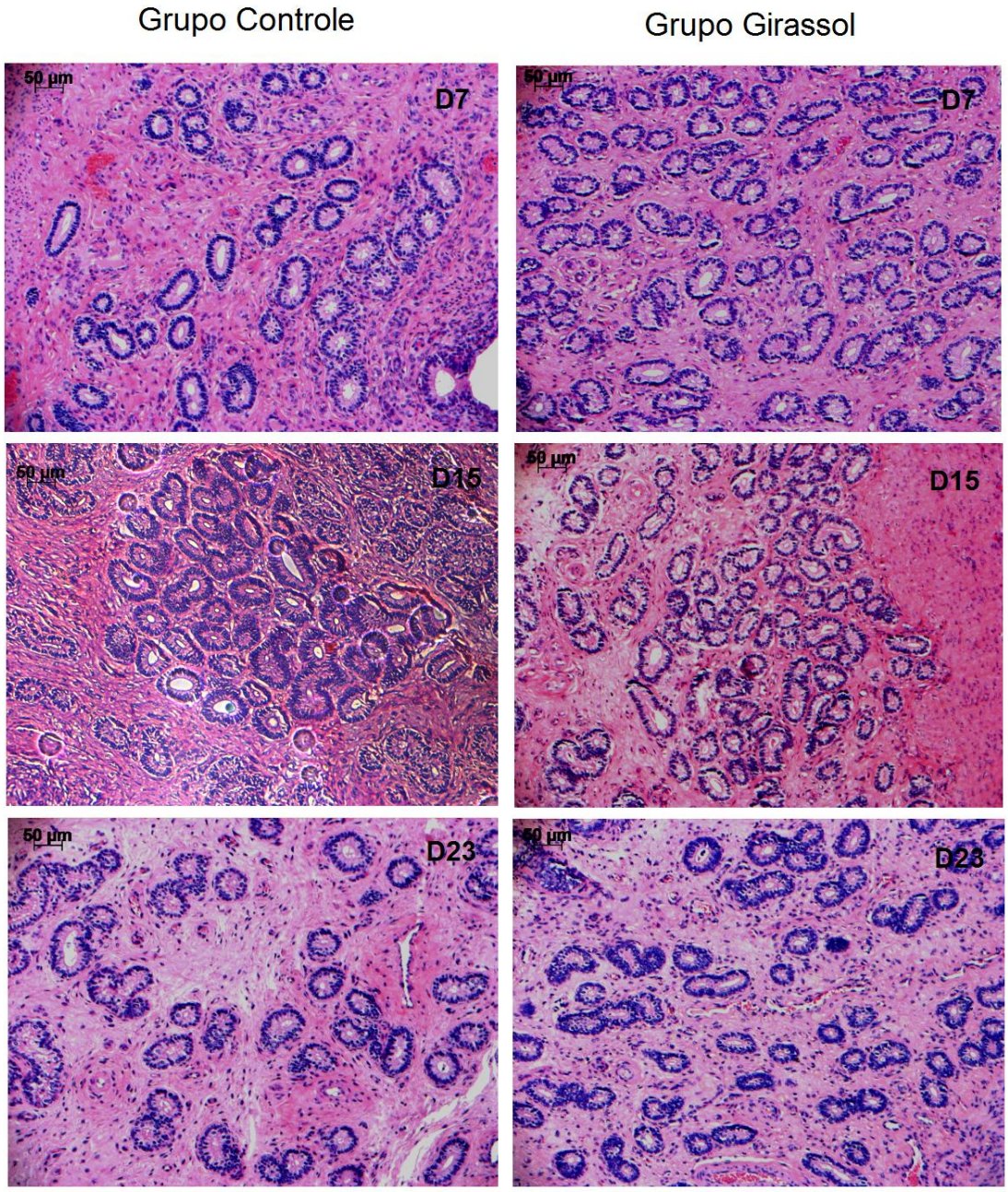


FIGURA 34 – Experimento 2: Imagens de glândulas endometriais, em aumento 10x, de vacas Nelore tratadas com 1,7kg de suplemento contendo semente de girassol (Grupo Girassol; n = 18) ou não (Grupo Controle; n = 15); durante 6,14 ou 22 dias, e abatidas nos dias 7, 15 ou 23 pós-início da suplementação.

VII. DISCUSSÃO

7.1 Experimento 1

7.1.1 Taxa de concepção

No Experimento 1, verificou-se que a taxa de concepção foi maior no Grupo Girassol que no Controle (55,66% vs. 36,94% respectivamente; P < 0,01) o que apresentou uma diferença de 18,72% na taxa de concepção das receptoras tratadas com semente de girassol, que representou um aumento de 50% na concepção quando associada ao programa de TETF. Considerando que no presente estudo o suplemento do grupo controle era isoprotéico e isoenergético em relação ao suplemento do grupo tratado, sugere-se que a ação benéfica do tratamento possivelmente tenha decorrido da composição diferenciada dos ácidos graxos contidos na semente de girassol. Em estudo realizado anteriormente por este grupo, Peres et al. (2008) avaliaram os mesmos suplementos em vacas Nelore, pluríparas, no período pós-parto. Os mesmo autores verificaram que tal suplemento, fornecido durante 22 dias a partir da IATF, determinou maior taxa de concepção nos animais tratados (66,7% vs. 46,3%; P = 0,02). Considerando que Peres et al. (2008) observaram um incremento nas taxas de concepção de aproximadamente 20,4%, valor próximo ao encontrado no Experimento 1, presume-se que os efeitos benéficos da suplementação com semente de girassol são alcançados em fêmeas bovinas submetidas a IATF e TETF, resultando em um incremento de 44 a 50% na taxa de concepção.

De fato, em vários estudos utilizando a suplementação com diferentes tipos de gordura em fêmeas bovinas verificou-se incrementos nas taxas de concepção (FERGUSON et al., 1990; MCNAMARA et al., 2003; SCHNEIDER et al., 1988; SKLAN et al., 1991), em concordância com o presente estudo. Em

contrapartida, outros autores não verificaram incrementos nas taxas de concepção em vacas leiteiras suplementadas com gordura protegida (SCOTT et al., 1995; SKLAN et al., 1994) ou sementes oleaginosas (SCHINGOETHE; CASPER, 1991). Quando vacas foram suplementadas com 750g de semente de linhaça rica em ácido linolênico, ou semente de girassol rica em ácido linoléico, maiores taxas de prenhez foram alcançadas nas fêmeas suplementadas com semente de linhaça (AMBROSE et al., 2006). No entanto tais efeitos benéficos determinados pela semente de linhaça não foi descrito por outros autores que também utilizaram a mesma (FUENTES et al., 2008; PETIT; TWAGIRAMUNGU, 2006). Em outro estudo, o fornecimento de ácido linolênico proveniente de óleo de peixe não promoveu o aumento das taxas de prenhez na primeira IA pós-parto quando comparadas com o fornecimento de sebo bovino (JUCHEM, 2007). Wilkins et al. (1996) alimentaram vacas de corte com uma dieta de caroço de algodão descascado, tratado com formol. Tal dieta era rica em ácido linoléico protegido, que escapa a biohidrogenação no rúmen. Vacas controle receberam farinha de caroço de algodão peletizada. As taxas de concepção no primeiro (61% vs. 46%) e segundo (71% vs. 56%) ciclo estral foram maiores para as vacas que receberam a dieta rica em ácido linoléico, tendo havido um incremento na taxa de concepção de 15% em ambos os ciclos. Desta forma, estudos que utilizaram outras fontes de ácido linoléico também verificaram incremento na taxa de concepção, como no referido estudo. Até o momento, não temos conhecimento de estudos, realizados com suplementação de gordura em vacas de corte, que tenham determinado um incremento de 44 a 50% na taxa de concepção como se verificou com a semente de girassol.

A grande maioria dos estudos que avaliaram o efeito dos ácidos graxos na performance reprodutiva de fêmeas de corte Nelore e receptoras, utilizaram a suplementação com Megalac-E. Lopes et al. (2009) forneceram Megalac-E, no período compreendido entre o início do protocolo de IATF até 28 dias pós IATF em vacas Nelore lactentes e verificaram um incremento na taxa de concepção de 11,6% em relação ao grupo não tratado (51,2% vs. 39,6%). No

mesmo estudo, o Megalac-E foi fornecido a receptoras de embriões (n = 435) do final do protocolo de sincronização até 21 dias após a TETF e verificou-se uma diferença de 11,9% entre os grupos, o que representou um aumento de 31,5% na taxa de concepção nas receptoras suplementadas (49,6% vs. 37,7%). Desta forma, em vacas Nelore e receptoras mestiças de embrião, o Megalac-E incrementa com menor eficiência a taxa de concepção quando comparado à semente de girassol. Além disso, o Megalac apresenta baixa palatabilidade, circunstância que restringe seu consumo e compromete a meta de ingestão almejada. Deve-se salientar que no presente estudo e no de Peres et al. (2008), o suplemento contendo semente de girassol apresentou excelente palatabilidade, não tendo havido restrições quanto à ingestão.

Embora vários estudos tenham observado o impacto positivo da suplementação com gordura na reprodução de fêmeas bovinas de corte e leite (FERGUSON et al., 1990; GARCIA-BOJALIL et al., 1998; SKLAN et al., 1991; STAPLES et al., 1998), os mecanismos pelos quais a suplementação com lipídios altera a fisiologia do sistema reprodutivo de forma a favorecer a concepção, ainda são pouco conhecidos. Várias hipóteses foram geradas, dentre as principais o desenvolvimento de um maior folículo e corpo lúteo (VASCONCELOS et al., 2001), atraso da luteólise (STAPLES et al., 2009) e maior desenvolvimento do embrião e concepto (CERRI et al., 2004; FOULDI-NASHTA et al., 2007; HAGGARTY et al., 2006; RYAN et al., 1992; THANGAVELU et al., 2007; THOMAS; WILLIAMS, 1995). No presente estudo, considerando que o incremento na taxa de concepção pós-TETF foi semelhante ao estudo anterior de Peres et al. (2008) com IATF, pressupõe-se que os efeitos diretos de tal suplementação no embrião, que poderiam determinar um incremento da taxa de concepção, sejam ocasionados a partir do 7^{o} dia de desenvolvimento embrionário, considerando que receptoras que receberam embriões no 7^{o} dia de desenvolvimento apresentaram taxa de concepção similar a vacas submetidas à IATF cujos efeitos da semente foram exercidos desde o início do desenvolvimento embrionário. Entretanto, se a semente de girassol exerce efeitos na preparação do microambiente uterino

para favorecer o desenvolvimento embrionário a partir do 7º dia, tal efeito foi igualmente exercido nas receptoras de embriões.

Outros estudos relatam que o efeito benéfico dos ácidos graxos decorra da melhor qualidade oocitária (KIM et al., 2001; ZERON et al., 2002). Considerando que no presente estudo, a suplementação foi fornecida a receptoras, cujos oócitos não foram fertilizados, e que no estudo de Peres et al. (2008) a suplementação foi exercida após a IATF, o incremento registrado na taxa de concepção não estabelece nenhuma relação da suplementação com a melhoria na qualidade oocitária.

Em estudo recente, Guardieiro et al. (2010) não observou efeito positivo da suplementação com Megalac-E na produção de embriões em doadoras da raça Nelore. Os mesmos autores relatam que não houve diferença entre o grupo tratado com 100g/dia de Megalac-E e grupo controle (P > 0,10) sobre a resposta superovulatória, número total de embriões / óvulos, embriões viáveis, embriões degenerados ou óvulos não fertilizados recuperados. No entanto, o grupo controle teve uma resposta maior à superovulação do que o tratado com Megalac-E (18,0 ± 1,3 vs.15,7 ± 1,2, respectivamente P = 0,06). Embriões do grupo controle apresentaram maior taxa de eclosão, independentemente do método de criopreservação, às 48 horas (33,1 ± 4,0%, n = 148 vs. 17,3 ± 3,3%, n = 137, P = 0,009) e às 72 horas (44,3 ± 4,2%, n = 148 vs. 30,9 ± 4,0%, n = 137, P = 0,04) da cultura *in vitro*. Considerando que no presente estudo, o incremento na taxa de concepção pós-TETF foi semelhante ao estudo anterior de Peres et al. (2008) com IATF, possivelmente a suplementação com semente de girassol não exerça seus efeitos benéficos sobre o embrião nos primeiros sete dias de desenvolvimento.

7.1.2 Concentração de lipídios no plasma

Em estudos em que foi realizada a adição de gordura na dieta verificou-se consistentes aumentos na concentração plasmática de colesterol, assim

como um incremento na concentração de colesterol contido no conteúdo folicular e luteal (HAWKINS et al., 1995; LAMMOGLIA et al., 1996; RYAN et al., 1992; STAPLES et al., 1998; WILLIAMS, 1989). O colesterol é o precursor para a síntese de P4 nas células luteais (GRUMMER; CARROLL, 1991). Desta forma, o aumento das concentrações plasmáticas de colesterol promoveria um aumento na capacidade de síntese de 17β-estradiol pelo folículo e P4 pelo corpo lúteo.

No Experimento 1, considerando que a suplementação foi iniciada no D-2, maiores concentrações de colesterol total foram observadas no Grupo Girassol comparado ao Controle no D7 (306,02 ± 11,61 vs. 277,10 ± 11,88mg/dL, respectivamente; $P < 0,05$) e D19 (260,51 ± 7,98 vs. 231,95 ± 7,95mg/dL, respectivamente; $P < 0,01$). Neste estudo, ainda verificou-se maiores concentrações de HDL no Grupo Girassol comparado ao Controle no D7 (166,82 ± 5,88 vs. 139,43 ± 5,74mg/dL, respectivamente; $P < 0,01$) e D19 (162,01 ± 4,67 vs. 135,57 ± 4,76mg/mL, respectivamente; $P < 0,01$). No entanto, mesmo tendo havido aumento de colesterol total e HDL, constatou-se que a concentração de P4 no D7 não diferiu ($P > 0,05$) entre o Grupo Girassol e Controle (4,92 ± 0,24 *vs.* 4,72 ± 0,23ng/mL, respectivamente). Assim, presume-se que embora os precursores da P4 tenham sido aumentados na corrente sanguínea a produção da mesma no corpo lúteo não foi incrementada no D7, mas sim no D19 quando a concentração de P4 circulante pode ter seu aumento influenciado pelo estabelecimento da prenhez de 46% das novilhas utilizadas nesse experimento. Mesmo assim, deve-se salientar que o aumento dos lipídios plasmáticos pode ter favorecido modificações no tecido endometrial, microambiente uterino, embrião e/ou concepto.

7.1.3 Concentração de progesterona no plasma

Son et al. (1996) verificaram um aumento na produção de P4 nos animais que receberam gordura animal, observação feita também por Willians

(1989) e Lammoglia et al. (1996). Tal aumento na síntese de P4 foi relacionado com o aumento de colesterol, sendo que o HDL é a principal fração lipídica que estimula a síntese de P4 (WILLIANS, 1989). De fato, Mancio et al. (1999) encontraram correlação positiva entre os teores de colesterol total e de HDL e a concentração de P4. No presente estudo, houve um aumento nas concentrações de colesterol e HDL, mas tal aumento não foi verificado para as concentrações de P4 no D7.

Segundo Aswhort (1995) a concentração de P4 circulante influencia a quantidade e a composição dos polipeptídicos secretados pelo tecido endometrial, muitos dos quais são responsáveis pelo desenvolvimento do embrião e concepto. O'Callaghan et al. (2000) afirmaram que baixas concentrações de P4 no período inicial do desenvolvimento embrionário, podem comprometer a sobrevivência do embrião. De fato, Lopes (2009) relata que o aumento da concentração de P4 no sexto dia após a ovulação mostrou-se associado ao aumento da taxa de prenhez. No presente estudo, embora tenha sido evidenciadas maiores concentrações de HDL no Grupo Girassol comparado ao Controle no D7 e D19, tal evento fisiológico não alterou a concentração circulante de P4 no D7, desta forma alterações benéficas no tecido endometrial e microambiente uterino certamente não foram promovidas por um incremento nas concentrações circulantes de P4.

Vasconcelos et al. (2001); Staples; Thatcher (2005) e Staples et al. (1998) relataram que o efeito benéfico da suplementação com gordura promoveria aumento no tamanho dos folículos ovarianos e corpo lúteo, o que resultaria em maiores quantidades de P4. No presente estudo, considerando que a concentração circulante de P4 não foi alterada no D7 no grupo suplementado com semente de girassol, supõe-se que o efeito benéfico da suplementação com semente de girassol sobre a taxa de concepção não decorra do aumento no tamanho dos folículos ovarianos e corpo lúteo e nem do aumento nas concentrações plasmáticas de P4. Concordando com os resultados do presente estudo, alguns autores (AMBROSE et al., 2006; CHILDS et al., 2008a) verificaram que dietas ricas em ácido linoléico ou

linolênico não alteraram a concentração plasmática de P4. Desta forma, sugere-se que o efeito da semente de girassol no incremento da taxa de concepção, possivelmente seja multifatorial, sendo seu efeito promovido por alterações no endométrio, microambiente uterino, embrião e/ou concepto, mas não no corpo lúteo.

7.1.4 Análise econômica da utilização da semente de girassol

Considerando que no presente estudo, receptoras de embriões produzidos *in vitro* suplementadas com semente de girassol apresentaram um aumento de aproximadamente 19% na taxa de concepção, simulou-se a relação custo benefício de tal suplementação em um rebanho de 100 matrizes. Desta forma, com a utilização do referido suplemento haveria um incremento anual na produção de 19 bezerros. Considerando a produção bezerros comerciais, produzidos pelo emprego da IATF em larga escala, tal incremento representaria R$12.000,00. Entretanto, deve-se considerar que bezerros nascidos de TETF apresentam um valor genético superior quando comparado ao bezerro comercial, o que significa um incremento ainda maior que pode ser facilmente estimado determinando-se o valor do bezerro produzido. O custo da suplementação com semente de girassol a R$ 30,51/matriz determina uma boa relação custo-benefício em programas de IATF e uma excelente relação custo-benefício quando aliada a programas de TETF.

7.2 Experimento 2

7.2.1 Concentrações de lipídios no plasma

No presente estudo, verificaram-se maiores concentrações plasmáticas de colesterol total no Grupo Girassol comparado ao Controle no D19 e D22 pós-início da suplementação (150,03 ± 7,93 vs. 133,03 ± 7,27 e 161,63 ± 6,65

vs. 142,32 ± 8,18mg/dL respectivamente; P < 0,05); maiores concentrações plasmáticas de HDL no Grupo Girassol comparado ao Controle no D11, D15, D19 e D22 pós-início da suplementação (41,03 ± 1,65 vs. 37,05 ± 1,62; 41,82 ± 1,82 vs. 36,94 ± 1,94; 43,26 ± 1,85 vs. 38,78 ± 2,14 e 45,17 ± 1,51 vs. 39,99 ± 2,47mg/dL respectivamente; P < 0,05) e ainda maiores concentrações plasmática de LDL no Grupo Girassol comparado ao Controle no D22 pós-início da suplementação (111,20 ± 5,40 vs. 96,82 ± 6,33mg/dL, respectivamente; P < 0,05). Este aumento na concentração de colesterol total e HDL em fêmeas bovinas suplementadas com semente de girassol, também foi verificado no Experimento 1, entretanto, o incremento nas concentrações de LDL não foi evidenciado no mesmo. A semelhança dos resultados em ambos os experimentos, com relação ao colesterol total e HDL, evidenciam grande consistência em tais achados.

Comparando-se os valores das médias do Experimento 1 com o 2, observou-se no Experimento 1 maiores valores quando comparado ao Experimento 2. Este fato possivelmente decorra das diferenças no grupo genético e condição nutricional encontrada em cada um dos experimentos. No Experimento 1, foram utilizadas novilhas cruzadas zebuínas suplementadas com silagem de milho. Tais novilhas apresentaram maiores médias que as vacas Nelore, alimentadas exclusivamente com forragem, utilizadas no Experimento 2.

No presente estudo, apesar do aumento de colesterol total, HDL e LDL não houve diferença estatística (P > 0,10) nas concentrações de P4 no D0, D7, D11, D15, D19 e D22 pós-início da suplementação entre Grupo Girassol e Controle (2,15 ± 0,32 vs.2,24 ± 0,56; 7,13 ± 1,12 vs. 7,65 ± 0,69 e 12,07 ± 1,76 vs. 14,24 ± 1,49ng/mL, respectivamente, P > 0,10). Desta forma, o aumento de colesterol total, HDL e LDL não alterou a produção de P4 pelo corpo lúteo. Concordando com os resultados do presente estudo, diversos autores (AMBROSE et al., 2006; CHILDS et al., 2008a; GUARDIEIRO et al., 2010) verificaram que dietas ricas em ácido linoléico ou linolênico não alteraram a concentração plasmática de P4. Os resultados observados no Experimento 2

estão em concordância com os resultados encontrados no Experimento 1. Tais resultados reforçam as colocações apresentadas no Experimento 1, onde presume-se que o incremento na taxa de concepção ocasionado pela semente de girassol decorra de alterações na composição lipídica do embrião, concepto, endométrio e/ou microambiente uterino e não por alterações ocasionadas no corpo lúteo.

7.2.2 Tamanho do corpo lúteo e concentrações plasmáticas de P4

Observou-se maior valor médio para diâmetro do corpo lúteo foi observado no Grupo Girassol comparado ao Controle no D7 (1,59 ± 0,13 vs. 1,24 ± 0,13cm; respectivamente; $P < 0,10$) e, no entanto, não foram observadas diferenças estatísticas significativas ($P > 0,10$) entre os Grupos Controle e Girassol no D15 (1,77 ± 0,11 vs. 1,94 ± 0,11cm, respectivamente) e D23 (1,23 ± 0,10 vs. 1,39 ± 0,10cm, respectivamente).

No presente estudo, observou-se que o valor médio para área do corpo lúteo foi maior em vacas que receberam suplementação a base de semente de girassol (Grupo Girassol) comparado à vacas que receberam uma dieta controle (Grupo Controle) no D7 (2,02 ± 0,26 vs. 1,30 ± 0,26cm^2; respectivamente; $P < 0,10$). Entretanto, não foram observadas diferenças estatísticas significativas ($P > 0,10$) entre os Grupos Controle e Girassol no D15 (2,51 ± 0,26 vs. 2,91 ± 0,26cm^2, respectivamente) e D23 (1,34 ± 0,22 vs. 1,57 ± 0,22cm^2, respectivamente).

Embora a área do corpo tenha sido maior no D7 em vacas suplementadas com semente de girassol não houve aumento nas concentrações plasmáticas de P4 no D7. Tal diferença não foi verificada para os dias D11, D15, D19 e D22 pós-início da suplementação no Grupo Girassol quando comparado ao Controle. Considerando que o incremento na taxa de concepção de vacas suplementadas com semente de girassol foi semelhante em programas de IATF e TETF, o aumento do diâmetro e área do corpo lúteo

no D7 possivelmente não tenha efeito em tal incremento. Os resultados encontrados no D15 e D23 do presente estudo, estão em concordância com os achados de diversos autores (AMBROSE et al., 2006; CHILDS et al., 2008a; GUARDIEIRO et al., 2010) que verificaram que dietas ricas em ácido linoléico ou linolênico não alteraram a área e o diâmetro do corpo lúteo.

Desta forma, em concordância com o Experimento 1, presume-se que o incremento nas taxas de concepção em vacas suplementadas com semente de girassol não decorra do aumento da produção de P4.

7.2.3 Composição lipídica endometrial

Diante das alterações promovidas na concentração de lipídios plasmáticos, verificadas no Experimento 1 e 2, pode-se pressupor que tal modificação lipídica poderia estar sendo ocasionada também no tecido endometrial. Alguns estudos relatam que modificações lipídicas no tecido endometrial poderiam restringir a quantidade de ácido araquidônico destas células. Nesse contexto, o ácido araquidônico é considerado a principal substrato para a síntese de PGF2α. No presente estudo, analisou-se o perfil de 54 ácidos graxos dos quais 43 estavam presentes no tecido endometrial. Conforme apresentado na Tabela 6 (ítem 6.2.2) verificou-se diferenças significativas em percentual entre o Grupo Controle e Grupo Girassol para oito ácidos graxos.

No Grupo Girassol verificou-se que o ácido graxo monoinsaturado de cadeia curta C10:1 (ácido graxo decenóico) teve maior percentual, quando comparado ao Grupo Controle (0,0297 ± 0,0018 vs. 0,0233 ± 0,0020%, respectivamente; $P < 0,10$). Os ácidos graxos monoinsaturados de cadeia longa C18:1 T10-T11-T12 (ácidos graxos octadecenóicos; entre eles o ácido graxo vacênico - C18:1 T11) também tiveram maior percentual no Grupo Girassol comparado ao Controle (1,1267 ± 0,08999 vs. 0,5933 ± 0,08999%, respectivamente; $P < 0,05$). No Grupo Controle o percentual de ácidos graxos

saturados no endométrio foi maior que no Grupo Girassol. Os ácidos graxos saturados que apresentaram maior percentual no Grupo Controle comparado ao Girassol foram iso-pentadecanóico (C15:0 ISO - 0,3467 ± 0,01548 vs. 0,2857 ± 0,01548%, respectivamente; P < 0,05), tricosanóico (C23:0 - 0,0673 ± 0,0012 vs. 0,0430 ± 0,0103%, respectivamente; P < 0,10) e tetracosananóico (C24:0 - 0,08467 ± 0,01028 vs. 0,05067 ± 0,01028%, respectivamente; P < 0,10). De fato, conforme observado no presente estudo, outros estudos também reportam a possibilidade de controlar os eventos reprodutivos através de manipulações da dieta, visto que controlando os ingredientes da dieta se pode alterar a composição lipídica do útero tornando-o menos favorável à luteólise (LOPES, 2009; MATTOS et al., 2000; MATTOS et al., 2002; MATTOS et al., 2004; PETIT et al., 2004; ROBINSON et al., 2002; STAPLES et al., 2009; THATCHER et al., 1997; WILKINS et al., 1996).

Neste contexto, até o momento ainda não há um consenso se os ácidos graxos são mais importantes para o embrião ou para sua implantação (PETIT et al., 2008), uma vez que podem reduzir a síntese endometrial de PGF2α, auxiliar o embrião a produzir interferon-τ, assim como alterar o microambiente uterino. Estes efeitos contribuiriam para o desenvolvimento embrionário, redução da mortalidade embrionária e consequente estabelecimento da prenhez (BINELLI et al., 2001; MATTOS et al. 2004; CHILDS et al., 2008b). Em outro estudo, a infusão de gordura contendo alta quantidade de ácido linoléico (OLDICK et al., 1997) ou a suplementação com ácidos n-6 protegidos (CHENG et al., 2001) determinaram menor liberação de PGF2α em resposta à ocitocina. Desta forma, outra possibilidade de atuação da semente de girassol seria reduzir a síntese e/ou liberação de PGF2α endometrial, desta forma favorecendo o estabelecimento da prenhez. No presente estudo, especula-se que as alterações lipídicas promovidas no endométrio pela suplementação com semente de girassol pode torná-lo menos luteolítico, aumentando desta forma as taxas de concepção. De fato, Petit et al. (2006); Williams; Stanko (1999) e Staples et al. (1998) sugerem que a suplementação com ácidos graxos poliinsaturados promove um atraso na luteólise por inibir a síntese de PGF2α.

No organismo o ácido linoléico, representante do ômega 6, é convertido em ácido araquidônico, precursor das prostaglandinas dienóicas, como a PGF2α. O ácido linoléico e o linolênico utilizam as mesmas enzimas para a metabolização. As enzimas elongase e dessaturase atuam na conversão do ácido linoléico em ácido araquidônico e também na conversão do ácido linolênico a ácido eicosapentaenóico, precursor das prostaglandinas trienóicas, como a prostaglandina 3α (PGF3α). A série de prostaglandina a ser produzida depende da quantidade do substrato. Sabe-se que o aumento de ácido linolênico na dieta diminuirá a produção de prostaglandina dienóica (WATHES et al., 2007). Entretanto, pode-se aumentar a produção de PGF2α quando se aumenta a disponibilidade de ácido araquidônico (STAPLES et al., 1998). Sugere-se que exista uma relação entre a proporção de AGPI e a ação dos mesmos, inibindo ou estimulando a produção de PGF2α, porém não foram encontrados estudos citando especificamente a melhor relação entre ambos na dieta (WATHES et al., 2007).

No presente estudo, o percentual do ácido graxo insaturado n3-eicosatrienóico (C20:3n3) no endométrio foi maior no Grupo Controle comparado ao Girassol (0,5840 ± 0,03367 vs. 0,4530 ± 0,03367%, respectivamente; P < 0,10), assim como os ácidos graxos poliinsaturados docosapentaenóico (C22:5 - 3,8953 ± 0,1646 vs. 3,3490 ± 0,1646%, respectivamente; P < 0,10) e eicosapentaenóico (C20:5 - 0,5743 ± 0,04493 vs. 0,3907 ± 0,04493%, respectivamente; P < 0,05), precursor das prostaglandinas trienóicas, como a prostaglandina 3α (PGF3α). No entanto, o percentual de ácido linoléico no endométrio das vacas (cis-9,12-octadienóico) não diferiu estatisticamente entre Grupo Controle e Girassol (6,2910 ± 0,4552 vs. 6,5630 ± 0,4552, respectivamente; P = 0,6944).

Neste estudo, não foi observada diferença em percentual de CLA (C18:2 C9-T11) no endométrio das fêmeas do Grupo Controle comparado ao Grupo Girassol (0,1497 ± 0,02809 vs. 0,1907 ± 0,02809, respectivamente; P = 0,3603). Deve-se salientar que, o principal impedimento para o estudo da influência dos ácidos graxos na reprodução é a incapacidade de predizer a

chegada do lipídio específico, particularmente os ácidos graxos poliinsaturados no intestino delgado para serem absorvidos, e a exata necessidade de ácidos graxos dos diferentes tecidos na reprodução.

Considerando os resultados obtidos, pode-se concluir que a semente de girassol promoveu alterações no perfil de lipídios endometriais que poderiam limitar a capacidade de síntese de PGF2α proporcionando o aumento na taxa de concepção.

7.2.4 Análise de expressão gênica

Cogitando que fêmeas bovinas de corte suplementadas com semente de girassol apresentam maiores taxas de concepção por apresentarem alterações na expressão de transcritos envolvidos na biossíntese de eicosanoides, no presente estudo foram analisadas expressões gênicas, por PCR em tempo real, de oito transcritos (PTGES1, PTGES2, AKR1B1, AKR1C4, PTGS2, PTGER2, PTGER4 e PLA2G10) envolvidos na biossíntese de eicosanoides no endométrio nos dias 6, 14 e 22 pós-início da suplementação em vacas de corte que receberam (Grupo Girassol) ou não (Grupo Controle) suplemento contendo semente de girassol. Nessa pesquisa constatou-se interação entre tratamento e dia do ciclo estral somente para os transcritos PTGER4 e PTGS2, onde a expressão do transcrito do receptor de membrana PTGER4 no D22 foi maior no Grupo Controle comparado ao Girassol (0,033 ± 0,007 vs. 0,016 ± 0,004, respectivamente; $P < 0,05$); e a expressão do transcrito da COX-2 (PTGS2) no D22 foi maior no Grupo Girassol comparado ao Controle (0,405 ± 0,196 vs. 0,094 ± 0,023, respectivamente; $P < 0,10$).

Mesmo não tendo sido observadas diferenças estatísticas entre os Grupos Controle e Girassol para as expressões dos transcritos das enzimas AKR1B1 e AKR1C4 observou-se uma redução na expressão desses transcritos no D22 quando comparado ao D14.

Em estudo anterior reportou-se que no cultivo de células endometriais com doses crescentes de ocitocina ou de AA há um aumento na expressão de PTGS2, e consequentemente aumento das concentrações de PGE2 e PGF2α, evidenciando que a enzima PTGS2 está intimamente relacionada com a síntese de prostaglandinas (PARENT; VILLENEUVE; FORTIER, 2003). Segundo Pereira et al. (2001), a suplementação com AA ao longo de toda a cultura de células da placenta influencia positivamente o desenvolvimento dos embriões até ao estádio de mórula, prejudicando o seu desenvolvimento posterior, provavelmente por causar um aumento da síntese de prostaglandina. O mesmo autor relata que no grupo da placenta suplementado com AA verifica-se uma descida significativa na taxa de embriões de D7 para D8 (23,1 para 15,14%, P = 0,02). Esta descida da taxa de embriões entre D7 e D8 também se verifica quando células da granulosa e embriões são suplementados com indometacina e PGE2 ou apenas PGE2, corroborando o envolvimento da PGE2 neste processo.

Tendo em vista os dados supracitados e considerando que ambas isoformas das COX1 e 2 (PTGS1 e PTGS2) possuem a função de converter o AA à Prostaglandina G2 (PGG2); que de forma subsequentemente peroxidases realizam a redução de PGG2 à Prostaglandina H2 (PGH2), conhecida como o principal substrato predecessor na síntese de todos os prostanoides (SMITH; DEWITT; GARAVITO, 2000); e que as enzimas pertencentes à família aldo-cetoredutase (AKR) AKR1B1, AKR1C3 e AKR1C4, convertem a PGH2 a PGF2α (GAUVREAU et al., 2010) sugere-se que ocorra maior expressão do transcrito PTGS2 no endométrio de vacas de corte suplementadas com semente de girassol a partir do D14 pelo fato de que nesse período o suplemento rico em ácido linoléico pode atuar primeiramente inibindo a síntese de enzimas AKR1B1 e AKR1C4 fazendo com que a PGH2 reduza a síntese de PGF2α, tornando-se mais disponível à síntese de outros prostanoides como PGE2, prostaciclinas e tromboxanos e dessa forma influenciando positivamente a taxa de concepção de vacas de corte.

7.2.5 Análise morfométrica das glândulas endometriais

No experimento 2, verificou-se maior valor médio para o diâmetro das glândulas endometriais no Grupo Controle comparado ao Girassol no D15 (62,38 ± 1,66 vs. 54,78 ± 1,52µm, respectivamente; P < 0,01). Não foram observadas diferenças estatísticas significativas (P > 0,10) entre os Grupos Controle e Girassol no D7 (59,62 ± 2,65 vs. 55,75 ± 2,17µm, respectivamente) e D23 (57,46 ± 1,90 vs. 54,67 ± 1,90µm, respectivamente). Da mesma forma, observou-se que o valor médio para área das glândulas endometriais não diferiu estatisticamente (P > 0,10) entre o Grupo Controle e Girassol no D7 (3863,26 ± 536,21 vs. 3310,47 ± 426,99µm^2, respectivamente), D15 (3308,45 ± 45,45 vs. 2996,96 ± 420,39µm^2, respectivamente) e D23 (3024,96 ± 324,34 vs. 2622,10 ± 69,14µm^2, respectivamente); assim como não se observaram diferenças estatísticas (P > 0,10) para valor médio para perímetro das glândulas endometriais entre o Grupo Controle e Girassol no D7 (255,30 ± 18,81 vs. 237,00 ± 15,36µm, respectivamente), D15 (237,13 ± 13,96 vs. 215,01 ± 12,75µm, respectivamente) e D23 (219,61 ± 12,19 vs. 197,98 ± 12,19µm, respectivamente). Esse dados corroboram aos encontrados por Wang et al. (2007) que não observaram alterações no perímetro ou área das glândulas endometriais quando comparou-se os dias 0, 8 e 16 do ciclo estral.

Ainda, pode-se verificar que o valor médio para número de glândulas endometriais por campo óptico não diferiu estatisticamente (P > 0,10) entre o Grupo Controle e Girassol no D7 (201 ± 25,52 vs. 286 ± 49,43, respectivamente), D15 (197 ± 32,34 vs. 369 ± 79,01, respectivamente) e D23 (255 ± 30,42 vs. 327 ± 45,93, respectivamente), quando se fez uma análise considerando o efeito do tratamento em determinado tempo, ou seja, no dia 7, 15 ou 23 pós-início da suplementação. Esses resultados estão em concordância com alguns autores que relatam que o número de glândulas endometriais não muda durante o ciclo natural (JOHANNISSON et al., 1987 ,1991; WAHAB et al., 1999). No entanto, no D15 os valores estatísticos encontrados se aproximaram da significância (P = 0,1024) o que mostra que

houve uma tendência a ter um maior número de glândulas endometriais no Grupo Girassol comparado ao Controle. Analisando-se o número de glândulas endometriais considerando somente o efeito de tratamento constatou-se que valor médio para número de glândulas endometriais por campo óptico foi maior no Grupo Girassol comparado ao Controle (327 ± 33,56 vs. 221 ± 18,00, respectivamente; $P < 0,05$).

Visto que as características histológicas do endométrio mudam qualitativamente durante o ciclo estral (WANG et al., 2007) e que a espessura do endométrio de vacas é maior do que de novilhas, independentemente do local de amostragem (DHALIWAL et al., 2002) presume-se que a semente de girassol esteja influenciando positivamente a taxa de concepção em vacas de corte por aumentar o número de glândulas em uma área endometrial mais espessa.

VIII. CONCLUSÃO

No presente estudo, conclui-se que a suplementação com semente de girassol aumenta em 50% a taxa de concepção em receptoras de embriões produzidos *in vitro* submetidas à TETF. Adicionalmente, fêmeas bovinas de corte suplementadas com semente de girassol apresentam modificações na composição lipídica plasmática e endometrial, na expressão de transcritos envolvidos na biossíntese de eicosanoides e também no número e morfometria das glândulas endometriais.

REFERÊNCIAS

ACTIVITY, H. P. D. et al. Identification of a Principal mRNA Species for Human 3a-Hydroxysteroid Dehydrogenase Isoform (AKR1C3). **That Exhibits**, v. 946, p. 940-946, 1998.

AFERRI, G. et al. Desempenho e características de carcaça de novilhos alimentados com dietas contendo diferentes fontes de lipídios. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 5, p. 1651-1658, 2005.

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

AMBROSE, D.J. et al. Lower pregnancy losses in lactating dairy cows fed a diet enriched in á-linolenic acid. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 3066-3074, 2006.

ANDRADE, P. M. M.; CARMO, M. G. T. Ácidos graxos n-3: um link entre eicosanoides, inflamação e imunidade. **Revista MN-Metabólica**, v. 8, n. 3, p. 135-143, 2006.

ANGULO-GUERRERO, O.; OLIART, R. R. Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on adenylate cyclase, 5'nucleotidase and Na+K(+)-ATPase activities in rat brain-plasma membrane. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 48, n. 4, p. 293-298, 1998.

ANUALPEC; **Anuário da pecuária brasileira**, 2013. São Paulo: FNP.

AOAC; Association of Official and Agricultural Chemistry. **Official Methods of Analysis**, 1993. ed.12 , Washington, D.C. 1094 p.

ASBIA; **Associação Brasileira de Inseminação Artificial**, 2012. Uberaba, MG. Disponível em: <http://www.asbia.org.br/novo/relatorios/>. Acesso em: 16 out. 2013.

ASWHORT, C. J. Maternal and conceptus factors affecting historophic nutrition and survival of embryos. **Livestock Production Science**, v. 44, p. 99-105, 1995.

BARUSELLI, P. S. et al. Impacto da IATF na eficiência reprodutiva em bovinos de corte. In: **Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**, 2; 2006. Londrina - PR, p. 113 – 132, 2006.

BARUSELLI, P. S. et al. Novos avanços na superovulação de bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 36-SUP. p. 433-448, 2008.

BEORLEGUI, C. B. Cambios en el perfil de ácido grasos en productos animales en relación con la alimentación animal y humana. Importancia del ácido linoleico conjugado. 1. Rumiantes. In: CURSO DE ESPECIALIZACION FEDNA, 20. 2004, Barcelona. **Anais...** Barcelona: Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal, p. 79, 2004.

BERCHIELLI, T.T.; GARCIA, A.V.; OLIVEIRA, S.G. Principais técnicas de avaliação aplicadas em estudos de nutrição. In: BERCHIELLI, T.T.; PIREZ, A.V.; OLIVEIRA, S.G. (Eds.) **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: FUNEP, 2006. 583p.

BETT, V. et al. Digestibilidade in vitro e degradabilidade in situ de diferentes variedades de grãos de girassol (Helianthus annuus L.). **Acta Scientiarum Animal Sciences**, Maringá, v. 26, n. 4, p. 513-519, 2004.

BILBY, T. R.; BLOCK, J.; DO AMARAL, B. C. et al. Effects of dietary unsaturated fatty acids on oocyte quality and follicular development in lactating dairy cows in summer. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 3891-3903, 2006.

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

BOSETTI, F.; WEERASINGHE, G. R. The expression of brain cyclooxygenase-2 is down-regulated in the cytosolic phospholipase A2 knockout mouse. **Journal of Neurochemistry**, v. 87, n. 6, p. 1471-1477, 2003.

CARPENTER, K. D. et al. Prolactin regulation of neonatal ovine uterine gland morphogenesis. **Endocrinology**, v. 144, p. 110–120, 2003.

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

CHENG, Z.; ROBINSON, R. S.; PUSHPAKUMARA, P. G. A. et al. Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on uterine prostaglandin synthesis in the cow. **Journal of Endocrinology**, v. 171, p. 463-473, 2001.

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

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

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

COLEMAN, R. A.; SMITH, W. L.; NARUMIYA, S. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. **Pharmacological Reviews**, v. 46, n. 2, p. 205-229, 1994.

COPPOCK, C. E.; WILKS, D. L. Supplemental Fat in High-Energy Rations for Lactating Cows: Effects on Intake, Digestion, Milk Yield, and Composition. **Journal of Animal Science**, v. 69, p. 3826-3837, 1991.

CHRISTIE, W. W. A simple procedure for rapid transmethilation of glycerolipids and cholesterol esters. **Journal of Lipid Research**, v. 23, p. 1072, 1982.

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

DAY, M. L. Efeito de estratégias de sincronização da ovulação no desenvolvimento folicular e na concepção. In: **Curso Novos Enfoques da Produção e Reprodução de Bovinos**, 9., CD-ROOM, 2005.

DEMÉTRIO, D. G. B. et al. Factors affecting conception rates following artificial insemination or embryo transfer in lactating Holstein cows. **Journal of Animal Science**, v.90, p.5073-5082, 2007.

DENKER, M. A. Effects of cocoa butter on serum lipids in humans historical higlihts. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 60, p. 1014-1020, 1994.

DHALIWAL, G. S. et al. Quantitative unbiased estimates of endometrial gland surface area and volume in cycling cows and heifers. **Research in Veterinary Science**, v. 73, p. 259–265, 2002.

DISKIN, M. G.; SREENAN, J. M. Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial insemination. **Journal of reproduction and fertility**, v. 59, p. 463-468, 1980.

EMBRAPA; Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, **Girassol** <http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=54&cod_pai=38>. Acesso em 14 out. 2013.

FAEMG; **Federação da Agricultura e Pecuária do Estado de Minas Gerais**, 2013. Belo Horizonte, MG. Disponível em: <http://www.sistemafaemg.org.br/News.aspx?Code=1765&Portal=1&PortalNews=1&ParentCode=139&ParentPath=None&ContentVersion=R>. Acesso em: 16 out. 2013.

FERGUSON, J. D. et al. Effect of hard fats on in vitro and in vivo rumen fermentation, milk production and reproduction in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 2864-2879, 1990.

FERNANDES, A. R. M. et al. Composição química e perfil de ácidos graxos da carne de bovinos de diferentes condições sexuais recebendo silagem de milho e concentrado ou cana-de-açúcar e concentrado contendo grãos de girassol. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Jaboticabal, v. 38, n. 4, p. 705-712, 2009.

FIGUEIROA, F. J. F. **Perfil de ácidos graxos do leite, textura da manteiga e comportamento ingestivo de vacas da raça holandesa alimentadas com grão de girassol peletizado e/ou lignosulfonato.** 2010. 41f. Dissertação

(Mestrado) - Departamento de Área de Concentração Produção Animal, Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR, 2010.

FOSSATI P.; LORENZO P. Serum triglycerides determined colorimeterically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. **Clinical Chemistry**, v.28, p.2077-2080, 1982.

FOULADI-NASHTA, A. et al. Impact of Dietary Fatty Acids on Oocyte Quality and Development in Lactating Dairy Cows. **Biology of Reproduction**, v. 77, p. 9-17, 2007.

FUENTES, M. C. et al. Effect of extruded linseed on productive and reproductive performance of lactating dairy cows. **Livest Science**, v. 113, p 144-154, 2008.

FUNCK, L. G.; ARELLANO, D. B.; BLOCK, J. M. Ácido linoléico conjugado (CLA) e sua relação com a doença cardiovascular e os fatores de risco associados. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Venezuela, v. 56, n. 2, 2006.

GABLER, C. et al. Endometrial expression of selected transcripts involved in prostaglandin synthesis in cows with endometritis. **Theriogenology**, v. 71, n. 6, p. 993-1004, 2009.

GARCIA-BOJALIL, C. M. et al. Protein Degradability and Calcium Salts of Long-Chain Fatty Acids in the Diets of Lactating Dairy Cows: Reproductive Responses. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 1385–1395, 1998.

GONÇALVES, A.; DOMINGUES, J. L. Uso de gordura protegida na dieta de bovinos. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 4, n. 5, p. 475-486, 2007.

GONZÁLEZ, F.H.D. Pode o leite refletir o metabolismo da vaca? In: DÜRR, J.W.; CARVALHO, M.P.; SANTOS, M.V dos. **O compromisso com a qualidade do leite no Brasil.** Passo Fundo: UPF Editora, 2004. p.195-209.

GONZALEZ, H. E. et al. Morphometric studies of the bovine uterus: miscroscopic lesions and retrospective reproductive history. **American Journal of Veterinary Research**, v. 46, p. 2588–2595, 1985.

GRAY, C. A.; BAZER, F. W.; SPENCER, T. E. Effects of neonatal progestin exposure on female reproductive tract structure and function in the adult ewe. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 797–804, 2001.

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

GRUNDY, S. M.; DENKE, M. A. Dietary influences on serum lipids and lipoproteins. **Journal Lipid Reserch**. v. 31, p. 1149-1172, 1990.

GUARDIEIRO, M. M.; MACHADO, G. M.; BASTOS, M. R. et al. Post cryopreservation viability of embryos from Nellore heifers supplemented with rumen-protected fat. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, p. 205-206, 2010. (abstr.).

GUILLOMOT, M.; GUAY, P. Ultrastructural features of the cell surfaces of uterine and trophoblastic epithelia during embryo attachment in the cow. **Anatomical Record**, v. 204, p. 315–322, 1982.

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

HARA, A.; RADIN, N. S. Lipid extraction of tissues with low-toxicity solvent. **Analitical Biochemistry**, v. 90, p. 420-426, 1978.

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

HUMBLOT, P. Use of pregnancy specific proteins and progesterone assays to monitor pregnancy and determine the timing, frequencies and sources of embryonic mortality in ruminants. **Theriogenology**, v. 56, n. 9, p. 1413-1433, 2001.

IFA; Institut fur Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung. **GESTIS Substance Database.** Disponível em: <http://gestis-en.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_en/000000.xml?f=templates$fn=default.htm$3.0>. Acesso em: 10 ago. 2013.

IBGE; Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Índice Nacional de Preços ao Consumidor (INPC)**. Disponível em: <http://www.portalbrasil.net/inpc.htm>. Acesso em: 09 ago. 2013.

IEA; Instituto de Economia Agrícola. **Banco de Dados**. Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br/out/bancodedados.html>. Acesso em: 24 ago. 2013.

JOHANNISSON, E. et al. Endometrial morphology and peripheral hormone levels in women with regular menstrual cycles. **Fertility and Sterility**, v. 48 p. 401–408, 1987.

JOHANNISSON, E. et al. Morphometric study of the human endometrium following continuous exposure to levonorgestrel released from vaginal rings during 90 days. **Contraception**, v. 43, p. 361–371, 1991.

JUCHEM, S. O. Lipid Digestion and Metabolism in dairy cows: effects on production, reproduction and health. Phd thesis, University of California Davis, 2007.

KANKOFER, M.; WIERCINSKI, J. Prostaglandin E29-keto reductase from bovine term placenta. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 61, p. 29-32, 1999.

KANKOFER, M.; WIERCINSKI, J.; ZERBE, H. Prostaglandin E(2) 9-keto reductase activity in bovine retained and not retained placenta. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 66, n. 4, p. 413-417, 2002.

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

KATCH, F. I.; McARDLE, W. D. **Nutrição, exercício e saúde**. 4.ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1996.

KEPLER, C.R. et al. Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens.* **Journal of Biological Chemistry**, v. 241, p. 1350-1354,1966.

KIM, Y. J. et al. Effect of Linoleic Acid Concentration on Conjugated Linoleic Acid Production by *Butyrivibrio fibrisolvens* A38. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5226–5230, 2000.

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

KOJIMA, Y.; SELANDER, U. Cyclical changes in the fine structure of bovine endometrial gland cells. **Zeitschrift fur Zellforschung und Mikroskopische Anatomie**, v. 104, p. 69–86, 1970.

KONIG, D. et al. Essential Fatty Acids, Immune Function and Exercise. **Exercise Immunology Review**, v. 3, p. 1-31, 1997.

KUNZ, T. L. et al. Mortalidade embrionária em bovinos: inter-relações embrião patôgeno. **Revista CFMV**, v. 8, p. 26, 27-36, 2002.

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

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

LINN, J. G.; MARTIN, N. P. Forage quality analyses and interpretation. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 72, n. 2, p. 509-523, 1991.

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

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

LUCY, M. C.; STAPLES, C. R.; MICHEL, F. M. et al. Effect of feeding calcium soaps to early postpartum dairy cows on plasma prostaglandin F2a, luteinizing hormone, and follicular growth. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 483-489, 1991.

MACEDO, V. P. et al. Composições tecidual e química do lombo de cordeiros alimentados com rações contendo semente de girassol em comedouros privativos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Marília-SP, v. 37, n. 10, p. 1860-1868, 2008.

MAIA, M. O.; PARENTE, H. N.; ARAÚJO, V. M. Utilização de lipídeos na dieta de pequenos ruminantes. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Umuarama, v. 14, n. 2, p. 127-131, jul./dez. 2011.

MANDARINO, J. M. G. **Características bioquímicas e nutricionais do óleo e do farelo de girassol**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, Documentos-52, 1992. 25p.

MARQUES, D. C. **Criação de bovinos**. 7; ed. Belo Horizonte: CVP – Consultoria Veterinária e Publicações, 2003. 586 p.

MARINOV, U.; LOVELL, J. E. Cytology of the bovine uterine epithelium during the estrous cycle. **American Journal of Veterinary Research**, v. 29, p. 13–30, 1968.

MATHERSON, B. et al. Effects serum lipids of monounsaturated oil and margarine in the diet of an Antarctic expedition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 63, p. 933-941, 1996.

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

MATTOS, R. et al. Polynsaturated fatty acids and bovine interferon-tau modify phorbol ester-induced secretion of prostaglandin F2 alpha and expression of prostaglandin endoperoxide synthase-2 and phospholipase-A2 in bovine endometrial cells. **Bioogy of Reproduction**, v. 69, p. 780-787, 2003.

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

MATTOS, R. et al. The effects of feeding fish oil on uterine secretion of PGF2α, milk composition, and metabolic status os periparturient Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 921-932, 2004.

MCNAMARA, S. et al. Effect of offering rumen-protected fat supplements on fertility and performance in spring-calving Holstein-Friesian cows. **Animal Reproduction Science**, v. 79, p. 45-56, 2003.

MEDEIROS, S.R. **Ácido linoléico conjugado**: teores nos alimentos e seu uso no aumento da produção de leite com maior teor de proteína e perfil de ácidos graxos modificado. Piracicaba: Escola Superior Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2002. 98p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de São Paulo, 2002.

MIR, P. S. et al. Dietary manipulation to increase conjugated linoleic acids and other desirable fatty acids in beef: a review. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 83, n. 4, p. 673-685, 2003.

MODESTO, E. C. et al. Efeitos nutricionais e metabólicos de dietas ricas em ácidos graxos poliinsaturados para ruminantes e os benefícios para o homem. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Umuarama, v. 5, n. 1, p. 119-134, 2002.

MONTEIRO, A. L. G.; MORAES, A.; CORRÊA, E. A. S. et al. **Forragicultura no Paraná**. Londrina: Comissão Paranaense de Avaliação de Forrageiras, 1996.

MURATE, E. H.; PRUDENCIO-FERREIRA, S. H. Propriedades Funcionais de Concentrado Protéico Extrusado de Sementes de Girassol. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba- PR, v. 42, n. 2, 9p., fev. 1999.

NARUMIYA, S.; FITZGERALD, G. A. Prontaglandins and their precursors genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. **Journal of Clinical Investigation**, v. 108, n. 1, p. 25-30, 2001.

NARUMIYA, S.; SUGIMOTO, Y.; USHIKUBI, F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 4, p. 1193-1226, 1999.

NRC. National Research Council. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7th ed. National academy of Sciences, Washington, DC, 2001.

NRC. National Research Council. **Nutrients requirements of sheep**. Washington: National Academies Press, 2007. 362p.

O'CALLAGHAN, D.; YAAKUB, H.; HYTTEL, P. et al. Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition hormone concentration in ewes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 118, p. 303-313, 2000.

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

OLIVEIRA, M. L. **Efeito do ambiente periovulatório na expressão gênica do endométrio durante a primeira semana do ciclo estral em bovinos: biossíntese e sinalização de eicosanoides**. 2013. 133f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

PARENT, J.; VILLENEUVE, C.; FORTIER, M. A. Evaluation of the contribution of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 to the production of PGE2 and PGF2 alpha in epithelial cells from bovine endometrium. **Reproduction**, v. 126, n. 4, p. 539-547, 2003.

PEREIRA, R. M. **Efeito de células em co-cultura e alterações induzidas na cascata metabólica do ácido araquidónico sobre o desenvolvimento in vitro de embriões bovinos.** 2001. 279f. Tese (Doutorado) - Estação Zootécnica Nacional, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real-Portugal, 2001.

PERES, M. S. et al. Efeito da Semente de Girassol na Taxa de Concepção de Vacas Nelore no Período Pós-Parto. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 22., 2008; Guarujá. Resumos… **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 36, supl. 2, p. 639, 2008.

PEREZ, E. E.; CARELLI, A. A.; CRAPISTE, H. G. Chemical characterization of Oil and meals from wild sunflower (*Helianthus petiolaris Nutt)*. **Journal American Oil Chemists. Society**, v. 81, n. 3, p. 245-249, 2004.

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

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

PETIT, H. V.; CAVALIERI, F. B.; SANTOS, G. T. D. et al. Quality of embryos produced from dairy cows fed whole flaxseed. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 1786-1790, 2008.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. 2002-2007, 2001.

PIPER, P. J.; VANE, J. R.; WYLLIE, J. H. Inactivation of prostaglandins by the lungs. **Nature**, v. 225, p. 600-604, 1970.

PURSLEY, J. R.; MEE, M. O.; WILTBANK, M. C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2α and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, p. 915-923, 1995.

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

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

ROCHE, J. F.; PRENDERVILLE, D. J.; DAVIS, W. D. Calving rate following fixed-time insemination after a 12-day progesterone treatment in dayre cows, beef cows and heifers. **Veterinary Record**, v. 101, p .417-418, 1977.

RUIJTER, J. M. et al. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysisof quantitative PCR data. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 6, 2009.

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

SÁ FILHO, O. G. et al. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for Bos indicus cattle. I. Strategies and factors affecting fertility. **Theriogenology**, v. 72, p. 210–218, 2009.

SANGSRITAVONG, S. et al. Metabolic clearance rate of progesterone and estradiol-17 • is decreased by fat. **Journal of Animal Science**, v. 80, supl. 1, p. 142, 2002.

SANTOS, J. E. P. et al. Effect of timing of first clinical mastitis occutence on lactational and reproductive performance of holstein dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 80, p. 31-45, 2004.

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

SARTORI, R. Fertilização e morte embrionária em bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, supl., p. 35-50, 2004.

SARTORI, R. et al. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 2803-2812, 2002.

SARTORI, R. et al. Improvement in recovery of embryos/ova using a shallow uterine horn flushing technique in superovulated Holstein heifers. **Theriogenology**, v. 60, p. 1319-1330, 2003.

SCENNA, F.N. et al. Detrimental effects of prostaglandin F2α on preimplantation bovine embryos. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 73, p. 215-26, 2004.

SCHINGOETHE, D. J.; CASPER, D. P. Total lactational response to added fat durumg early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 2617-2622, 1991.

SCHINGOETHE, D. J. et al. Lactational Responses of Dairy Cows Fed Unsaturated Fat from Extruded Soybeans or Sunflower Seeds. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 1244-1249, 1996.

SCHNEIDER, P. et al. Feeding calcium salts of fatty acids to lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 71, p. 2143-2150, 1988.

SCOTT, T. A. et al. Effects of rumen-inert fat on lactation, reproduction, and health of hight producing Holstein herds. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 2435-2451, 1995.

SCOT CONSULTORIA. **Bebedouro**, SP. Disponível em: <http://www.scotconsultoria.com.br/noticias/artigos/?ref=smnb>. Acesso em: 23 nov. 2012.

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

SKLAN, D.; MOALLEM, U.; FOLMAN, Y. Effect of feeding calcium soaps of fatty acids on production and reproductive responses in high producing lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 510-517, 1991.

SKLAN, D. et al. Effect of dietary calcium soaps om milk yield, body weight, reproductive hormones, and fertility in first parity and older cows. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 1652-1660, 1994.

SMITH, W. L.; DEWITT, D. L.; GARAVITO, R. M. Cyclooxygenases:structural, cellular, and molecular biology. **Annual Review of Biochemistry**, v. 69, n. 1, p. 145-182, 2000.

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

SON, J.; GRANT, R. J.; LARSON, L. L. et al. Effects of tallow and escape protein on lactational and reproductive performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 822-830, 1996.

SREENAN, J. M.; MULVEHILL, P. The application of lonf and short-term progestagen treatments for oestrus cycle controlin heifers. **Journal of Reproduction and fertility**, v. 45, p. 867-869, 1975.

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

STAPLES, C. R.; THATCHER, W. W. Effects of fatty acids on reproduction of dairy cows. In: **Garnsworthy PC, wiseman J(eds), Recent Advances In Animal Nutrition.** Nottingham University Press, Nottingham, UK, p. 229-256, 2005.

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

STINSON, A. W.; WEBER, A. F.; JEMJANIS, R. The bovine endometrium – an Electron Microscopic Study. **American Journal of Veterinary Research**, v. 23 p. 1164–1182, 1962.

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

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

THATCHER, W. W.; BINELLI, M.; BURKE, J. Antiluteolytic signals between the conceptus and endometrium. **Theriogenology**, v. 47, p. 131-140, 1997.

THATCHER, W. W. et al. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. **Theriogenology**, v. 56, p. 1435-1440, 2001.

THOMAS, M. G.; WILLIAMS, G. L. Metabolic hormone secretion and FSH-induced superovulatory responses oh beef heifers fed dietary fat supplements containing predominantly saturated or polyunsaturated fatty acids. **Theriogenology**, v. 45, p. 451-458, 1995.

ULBRICH, S. E. et al. Quantitative characterization of prostaglandins in the uterus of early pregnant cattle. **Reproduction**, v. 138, n. 2, p. 371-382, 2009.

VAN SOEST, P. J. Development of a comprehensive system of feed analysis and its application to forages. **Journal of Animal Science**, v. 26, p. 119-128, 1967.

VASCONCELOS, J. L. M.; PURSLEY, J. R.; WILTBANK, M. C. Effects of synchromate B combined with Ngr. On follicular dynamics and time of ovulation. **Journal of Dairy Science**, v. 77, supl. 1, p. 174, 1994.

VASCONCELOS, J.L.M. et al. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rates. **Theriogenology**, v. 56, p. 307 - 314, 2001.

WAHAB, M. et al. Endometrial histomorphometry of trimegestone-based sequential hormone replacement therapy: a weighted comparison with the endometrium of the natural cycle. **Human Reproduction**, v. 14, p. 2609–2618, 1999.

WALLACE, F. A.; MILES, E. A.; CALDER, P. C. Comparison of the effects of linseed oil and different doses of fi sh oil on mononuclear cell function in healthy human subjects. **British Journal of Nutrition**, v. 89, n. 5, p. 679-89, 2003.

WANG, C. K. et al. Quantitative analysis of changes in endometrial gland morphology during the bovine oestrous cycle and their association with progesterone levels. **Reproduction**, v. 134, p. 365–371, 2007.

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

WILKINS, J. F.; HOFFMAN, W. D.; LARSSON, S. K.; HAMILTON, B. A.; HENNESSY, D. W.; HILLARD, M. A. Protected lipid/protein supplement

improves synchony of oestrus and conception rate in beef cows. In: INTERNATIONAL CONGRESS IN ANIMAL REPRODUCTION, 13.,1996. Sydney, Australia, **Anais…** p.19-29, 1996.

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

WILLIAMS, G. L.; STANKO R. L. Dietary fats as reproductive nutraceuticals in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 1-12. 1999.

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