

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

**VIABILIDADE PÓS CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES DE NOVILHAS
NELORE SUPLEMENTADAS COM GORDURA PROTEGIDA RUMINAL**

MONIQUE MENDES GUARDIEIRO

Botucatu-SP
Março, 2009

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

**VIABILIDADE PÓS CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES DE NOVILHAS
NELORE SUPLEMENTADAS COM GORDURA PROTEGIDA RUMINAL**

MONIQUE MENDES GUARDIEIRO

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

Orientador: Dr. Roberto Sartori Filho

Botucatu-SP
Março, 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Guardieiro, Monique Mendes.

Viabilidade pós criopreservação de embriões de novilhas Nelore
suplementadas com gordura protegida ruminal / Monique Mendes Guardieiro.
– Botucatu : [s.n.], 2009

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2009.

Orientador: Roberto Sartori Filho

Assunto CAPES: 50504002

1. Bovino (Nelore) - Reprodução 2. Criopreservação 3. Embrião

CDD 636.208924

Palavras-chave: Ácidos graxos; Bovino; Criotolerância; Embrião; Superovu-
lação

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

**VIABILIDADE PÓS CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES DE NOVILHAS
NELORE SUPLEMENTADAS COM GORDURA PROTEGIDA RUMINAL**

MONIQUE MENDES GUARDIEIRO

Aprovada por:

ROBERTO SARTORI FILHO, Ph.D

Orientador

Departamento de Zootecnia

Universidade de São Paulo / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

JOSÉ LUIZ MORAES VASCONCELOS, DOUTOR

Examinador interno

Departamento de Produção Animal

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Unesp - Botucatu

GUILHERME DE PAULA NOGUEIRA, DOUTOR

Examinador externo

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal – Unesp - Araçatuba

Data da defesa: 20 de março de 2009

Botucatu-SP
Março, 2009

Dedico este trabalho:

Ao meu tio, Gabriel de Godoy, que infelizmente
não está entre nós, mas sei que estaria feliz por esta conquista.

E aos meus pais,

Leida Márcia Mendes Guardieiro e Marlus Guardieiro,
que não mediram esforços, acreditando em meu potencial.

AGRADECIMENTOS

Ao curso de Pós-graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu – SP, ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária (RARV) e especialmente à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF pela oportunidade de aprimoramento técnico-científico e acadêmico.

Aos pesquisadores da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, pela disposição a ensinar e pelas contribuições intelectuais: Dr. Maurício Machaim Franco, Dra. Margot Alves Nunes Dode, Dr. Rodolfo Rumpf, Dr. Alexandre Floriani Ramos, Dr. Eduardo de Oliveira Melo e ao médico veterinário, Ivo Pivato pelo exemplo profissional.

Aos meus amigos da equipe de trabalho da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, cuja ajuda no projeto de pesquisa foi imprescindível para sua realização: Michele Ricieri Bastos, Grazieli Marinheiro Machado, Emivaldo Siqueira, Heitor Castro Alves Teixeira, Thiago Diesel, Ligiane Leme, José Carvalho, Nádia Simarro, Lígia Lima, Marcos Rollemberg Mollo e Leonardo Mello. Aos amigos que também torceram para o sucesso do experimento: Ester Caixeta, Allice Rodrigues, Valquíria Michalczechen, Marcelo Tigre Moura, Jefferson Badaraco, Andrei Fidelis, Ana Cláudia Valeriano, Regivaldo Sousa, Mirian Souza, Juliana Cassiano, Patrícia Massuda, Suziane Silva, Breno Moscheta e Christina Ramires. A vocês, meu muito obrigada!

A todos os funcionários da fazenda Sucupira, por atenderem meus pedidos e ajudarem no manejo dos animais e na organização dos materiais de laboratório, em especial: Japão, Weber, Chicão, Zidane, Adolfo, Zezão, Arlindo, Tinho, Normandes, Urias, Milton, D. Zefa, Expedito, Pelezinho, D. Lia e Nita.

Aos estagiários que acompanharam o desenvolvimento do experimento e contribuíram para sua realização: Bruno (Uniplac, Brasília-DF), Vagner (Uniube, Uberaba-MG), Gustavo (Faculdade Jaguariúna), Amanda (Unesp, Botucatu-SP), Cristina (Unesp, Botucatu-SP), Letícia (UFF, Rio de Janeiro-RJ), Markis Suel (MS), Carlos Thiago (UFG, Goiânia-GO) e Pedro Ivo (UnB, Brasília-DF).

Ao médico veterinário Luiz Henrique Carrijo da Integral Nutrição Animal, pela disposição em nos ajudar na elaboração dos suplementos fornecidos no experimento e pelo apoio à pesquisa.

Ao professor Gerson Barreto Mourão pela disposição e colaboração nas análises estatísticas.

Ao Dr. Roberto Sartori Filho, pela oportunidade concedida para orientação durante o mestrado e pela confiança em meu trabalho. Hoje entendo o significado da palavra orientação: participação, compreensão, confiança e companheirismo. Obrigada por permitir meu crescimento profissional.

Aos funcionários da seção de Pós-Graduação e do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ-UNESP-Botucatu-SP: José Roberto Lalla Junior, Maria Aparecida Dias, Edilson, Cristina Paganini, que gentilmente atenderam nossas solicitações. À bibliotecária Meire pela simpatia e auxílio na correção das citações e referências bibliográficas.

Aos amigos de Botucatu-SP: Hení Falcão, Maria Clara Mattos, Jeanne Siqueira, Rogério Fonseca, Fernanda Saules, Ana Carolina Oliveira, Dani Monteschiesi, Cláudia Monteiro, Anthony Castilho, Diego Marcondes, Mariana Fernandes, Mateus Sudano, Vicente Turino, Rosiara Maziero, Ian Martin, Wangles, Thiago Matos, Rodolfo Cardoso e Catarina Lopes.

Aos meus pais, Leida Márcia Mendes Guardieiro e Marlus Guardieiro, à minha irmã Natália Mendes Guardieiro e aos familiares, por compreenderem minha ausência e sempre apoiarem minhas decisões profissionais. Amo vocês!!!

Ao Heitor Castro Alves Teixeira por ser meu porto-seguro e me proporcionar alegria. Você e sua família (Glória, Flávio, Ludmila, Flavinho, Luciana, José Bonifácio, Socorro, Luiz, Thiago, Luize, Lorena, Pedrinho, Nazaré e Anália) amenizaram a dor da saudade por estar fora de casa. Obrigada pelo carinho, vocês estão guardados em meu coração!!!

Ao professor Ricardo Chebel e à Tatiana Araújo bem como às empresas Pfizer, Arm & Harmer e Integral Nutrição Animal que auxiliaram na execução do projeto através da doação de produtos e incentivaram a pesquisa científica.

Aos professores doutores componentes da banca examinadora pela disponibilidade e colaboração em minha dissertação.

À Fapesp pela bolsa de estudo oferecida.

A todos agradeço pelo apoio à pesquisa!

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	Porcentagem dos principais ácidos graxos encontrados na gordura protegida, Megalac-E.....	45
TABELA 2.	Porcentagem relativa aos ingredientes utilizados na composição dos suplementos experimentais com gordura protegida ruminal (G) e controle (C).....	46
TABELA 3.	Níveis de garantia dos suplementos com gordura protegida ruminal (G) e controle (C) previamente e posteriormente à adição de milho moído.....	47
TABELA 4.	Ingestão diária estimada de nutrientes dos concentrados com gordura protegida ruminal (G) e controle (C) por animal previamente e posteriormente à adição de milho moído.....	48
TABELA 5.	Descrição dos kits utilizados e coeficientes de variação (CV) intra-ensaio, valores extremos das curvas padrão e sensibilidade do ensaio, obtidos nas dosagens hormonais realizadas.....	58
TABELA 6.	Consumos desejados e observados médios, nutrientes digestíveis totais (NDT) e proteína bruta (PB) dos concentrados experimentais (G e C), previamente e posteriormente à adição de milho moído.....	60
TABELA 7.	Resultados (média dos quadrados mínimos $\pm$ EP) da população folicular, corpos lúteos e embriões colhidos em novilhas suplementadas com gordura protegida (G) ou sem a adição de gordura protegida (C).....	64
TABELA 8.	Estágio de desenvolvimento embrionário e diâmetro (média dos quadrados mínimos $\pm$ EP) dos embriões viáveis produzidos por animais que receberam suplemento com gordura protegida (G) ou controle (C) 48 e 72 h após o início do cultivo <i>in vitro</i>	66
TABELA 9.	Estágio de desenvolvimento embrionário e diâmetro (média dos quadrados mínimos $\pm$ EP) dos embriões viáveis após a descongelação ou desvitrificação avaliados 48 e 72 h após o início do cultivo <i>in vitro</i>	68

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	Esquema do delineamento experimental, mostrando o período de fornecimento das dietas experimentais (G = Gordura protegida ruminal e C = Controle), os protocolos hormonais para sincronização da ovulação e superestimulação, bem como as avaliações ultra-sonográficas. BE = Benzoato de estradiol (2 mg; Estrogen [®]); FSH (total de 70 mg; Folltropin [®]); GnRH = Lecirelina (50 µg; Gestran Plus [®]); PGF = Prostaglandina F2 α (25 mg; Lutalyse [®]); P4 = dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR [®]); US = avaliação ultra-sonográfica; M = manhã; T = tarde; ↑ = inserção; ↓ = retirada.....	50
FIGURA 2.	Peso corporal (média $\pm$ EP) dos animais que receberam suplementos com gordura protegida ruminal (G, n = 20) ou controle (C, n = 20), na primeira repetição. Não houve diferença (P > 0,10) no peso corporal médio entre os grupos experimentais.....	61
FIGURA 3.	Peso corporal (média $\pm$ EP) dos animais que receberam suplementos com gordura protegida ruminal (G, n = 20) ou controle (C, n = 20), na segunda repetição. Não houve diferença (P > 0,10) no peso corporal médio entre os grupos experimentais.....	61
FIGURA 4.	Escore de condição corporal (ECC; escala de 1 a 5; média $\pm$ EP) de animais que receberam suplementos com gordura protegida ruminal (G, n = 20) ou controle (C, n = 20), na primeira repetição. Não houve diferença (P > 0,10) no ECC médio entre os grupos experimentais.....	62
FIGURA 5.	Escore de condição corporal (ECC; escala de 1 a 5; média $\pm$ EP) de animais que receberam suplementos com gordura protegida ruminal (G, n = 20) ou controle (C, n = 20), na segunda repetição. Não houve diferença (P > 0,10) no ECC médio entre os grupos experimentais.....	62

- FIGURA 6 Taxa de eclosão (média dos quadrados mínimos $\pm$ EP) dos embriões após a descongelação ou desvitrificação avaliada 48 e 72 h após o início do cultivo *in vitro*, comparando embriões produzidos por animais que receberam suplemento com gordura protegida (G) ou controle (C). A taxa de eclosão foi maior para os embriões provenientes do grupo C em relação à dos embriões produzidos pelo grupo G (^{a,b}Grupos diferem entre si dentro de cada momento de avaliação; $P < 0,05$)..... 65
- FIGURA 7. Taxa de eclosão (média dos quadrados mínimos $\pm$ EP) dos embriões submetidos à vitrificação/desvitrificação ou congelação/descongelação avaliada 48 e 72 h após o início do cultivo *in vitro*. A taxa de eclosão foi similar para os embriões vitrificados e congelados, independentemente do momento da avaliação do cultivo *in vitro* ($P > 0,10$)..... 67

LISTA DE ABREVIACÕES

AGC = ácido graxo conjugado
AGP = ácido graxo poliinsaturado
BE = benzoato de estradiol
BSA = *Bovine Serum Albumin*
C = controle
CC = embriões congelados provenientes de novilhas do grupo C
CCO = complexo cúmulus ovócito
CG = células da granulosa
CL = corpo lúteo
CV = coeficiente de variação
CV= embriões vitrificados provenientes de novilhas do grupo C
DHA = ácido graxo docosahexaenóico
DMSO = dimetilsulfóxido
DPBS = *Dulbecco phosphate buffered saline*
ECC = escore de condição corporal
EG = etilenoglicol
EP = erro padrão
EPA = ácido eicosapentaenóico
FIV = fecundação *in vitro*
FSH = hormônio folículo estimulante
g = giros
G = gordura protegida ruminal
GH = hormônio do crescimento
GnRH = hormônio liberador de gonadotrofinas
GC = embriões congelados provenientes de novilhas do grupo G
GV = embriões vitrificados provenientes de novilhas do grupo G
h = hora
ha = hectare
HM = solução de manutenção
IA = inseminação artificial
IATF = inseminação artificial em tempo fixo
IGF = fator de crescimento semelhante à insulina

i.m. = intramuscular
LH = hormônio luteinizante
min = minuto
mL = mililitros
mm = milímetros
n-3 = ômega 3
n-6 = ômega 6
NDT = nutrientes digestíveis totais
NNP = nitrogênio não protéico
OPS = *open pulled straw*
OPU = *ovum pick up*
P4 = dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR);
PB = proteína bruta
PGF2 α = prostaglandina F2 α
PGFM = metabólito da PGF2 α
PGHS = prostaglandina endoperóxido sintetase
PIV = produção *in vitro* de embriões
PM = peso molecular
PPAR = gene ativador de receptores de peroxissomo
PVP = polivinilpirrolidona
SD = solução de desvitrificação
s = segundo
SFB = soro fetal bovino
SM = solução de sucrose
SOF = meio de fluido de oviduto sintético
SOV = superovulação
SV = solução de vitrificação
TALP = meio de *calcium-free Tyrode's albumin lactate pyruvate*
TE = transferência de embriões
UI = unidades internacionais
US = avaliação ultra-sonográfica
vs = versus
 μ L = microlitros
 μ m = micrômetro

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUÇÃO.....	3
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Produção <i>in vivo</i> de embriões bovinos.....	4
2.2 Criopreservação de embriões bovinos.....	6
2.2.1 Congelação lenta.....	10
2.2.2 Vitrificação.....	10
2.2.3 Vitrificação <i>versus</i> congelação lenta de embriões.....	13
2.3 Ácidos graxos.....	16
2.4 Gordura protegida ruminal.....	17
2.5 Efeito dos ácidos graxos.....	18
2.5.1 Puberdade, estação de monta e pré-parto.....	18
2.5.2 Prenhez.....	19
2.5.3 Concentração sanguínea de hormônios e outras substâncias.....	22
2.5.4 Folículos ovarianos.....	28
2.5.5 Ovócitos.....	29
2.5.6 Resposta superovulatória e qualidade embrionária.....	31
2.5.7 Criopreservação de embriões.....	37
3. OBJETIVO.....	41
4. HIPÓTESES.....	42
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
5.1 Local.....	43
5.2 Animais.....	43
5.3 Dietas experimentais.....	44
5.4 Manejo dos pastos.....	49
5.5 Avaliações de escore de condição corporal e pesagem.....	49
5.6 Superovulação.....	49
5.7 Colheita embrionária.....	50
5.8 Avaliações ultra-sonográficas relacionadas à SOV.....	51
5.9 Técnicas de criopreservação.....	52
5.9.1 Congelação.....	52
5.9.2 Vitrificação.....	53

5.10 Produção <i>in vitro</i> de embriões.....	54
5.11 Cultivo <i>in vitro</i> dos embriões.....	55
5.12 Colheita e análise do sangue.....	57
5.13 Análise estatística.....	58
6. RESULTADOS.....	59
6.1 Consumo das dietas.....	59
6.2 Peso e escore de condição corporal.....	60
6.3 Resposta superovulatória e produção embrionária.....	63
6.4 Desenvolvimento <i>in vitro</i> dos embriões após desvitrificação ou descongelamento.....	64
6.5 Concentrações circulantes de IGF-I e insulina.....	68
7. DISCUSSÃO.....	69
7.1 Consumo dos suplementos experimentais.....	69
7.2 Resposta superovulatória, produção e desenvolvimento <i>in vitro</i> de embriões.....	69
7.3 Técnica de criopreservação.....	78
7.4 Concentrações circulantes de IGF-I e insulina.....	81
8. CONCLUSÕES.....	84
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	85
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
11. TRABALHO CIENTÍFICO.....	101
Anexo.....	118

GUARDIEIRO, M.M. **Viabilidade pós criopreservação de embriões de novilhas Nelore suplementadas com gordura protegida ruminal**. Botucatu, 2009. 100p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a resposta superovulatória, a produção embrionária e a resistência à criopreservação através de congelação ou vitrificação de embriões de novilhas Nelore suplementadas com gordura protegida ruminal (Megalac-E[®]). Foram utilizadas 40 novilhas da raça Nelore mantidas a pasto, divididas em dois grupos experimentais de acordo com o tipo de suplementação fornecido (G = concentrado com gordura protegida ruminal e C = suplementação controle, sem adição de gordura). Os suplementos foram formulados para serem isoenergéticos e isoprotéicos. O delineamento foi do tipo cross-over com 67 (primeira repetição) e 70 d (segunda repetição) de duração. Após 50 d de suplementação dietética, foi realizada a sincronização da emergência da onda para iniciar o protocolo de superovulação. Os embriões colhidos foram congelados ou vitrificados e avaliação de desenvolvimento embrionário *in vitro* foi realizada posteriormente. Não houve diferença ($P > 0,10$) entre os Grupos G e C em relação à resposta superestimulatória, ao número total de estruturas, embriões congeláveis, degenerados e ovócitos não fecundados colhidos. Apesar do grupo C ter mostrado maior resposta superovulatória que o G ($15,7 \pm 1,2$ vs $18,0 \pm 1,3$ CL; $P = 0,06$), os embriões do Grupo C apresentaram maior taxa de eclosão, independentemente do método de criopreservação, às 48 h ($33,1 \pm 4,0\%$; $n = 148$ vs $17,3 \pm 3,3\%$; $n = 137$; $P = 0,009$) e às 72 h ($44,3 \pm 4,2\%$; $n = 148$ vs $30,9 \pm 4,0\%$; $n = 137$; $P = 0,04$) de cultivo do que os do grupo G. Além disso, os embriões vitrificados e congelados apresentaram taxas similares de eclosão ($P > 0,10$). Nas condições do presente estudo, o suplemento composto com gordura protegida não afetou a resposta superestimulatória e a produção de embriões, e os embriões do Grupo Controle foram mais tolerantes à criopreservação.

Palavras-chave: Bovino, ácidos graxos, superovulação, embrião, criotolerância.

GUARDIEIRO, M.M. **Post cryopreservation viability of embryos from Nellore heifers supplemented with rumen-protected fat.** Botucatu, 2009. 100p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The aim of the current study was to evaluate the superovulatory response and embryo production, as well as embryo resistance to cryopreservation through freezing or vitrification of embryos from Nellore heifers supplemented with rumen-protected fat, Megalac-E[®]. Forty heifers kept in pasture were randomly divided into two experimental groups according to supplement source (G = supplement with rumen-protected fat and C = Control, without fat supplementation). The supplements were formulated to be isocaloric and isoproteic. Each female underwent both treatments in a cross-over design with approximately 67 d (first replicate) and 70 d (second replicate). After 50 d of feeding, the emergence of the wave was synchronized with the aid of hormones to initiate the superovulation protocol. The embryos recovered were frozen or vitrified and subsequently *in vitro* embryo development evaluation was accomplished. There was no difference between G and C groups ($P > 0.10$) regarding superstimulatory response, number of total embryos/ova, viable embryos, degenerate embryos, or unfertilized oocytes recovered. However, group C had a greater superovulatory response than G (15.7 ± 1.2 vs 18.0 ± 1.3 CL; $P = 0.06$). Group C embryos presented greater hatching rate, independently of the cryopreservation method, at 48 h ($33.1 \pm 4.0\%$; $n = 148$ vs $17.3 \pm 3.3\%$; $n = 137$; $P = 0.009$) and at 72 h ($44.3 \pm 4.2\%$; $n = 148$ vs $30.9 \pm 4.0\%$; $n = 137$; $P = 0.04$) of *in vitro* culture. Moreover, vitrified and frozen embryos had similar hatching rate ($P > 0.10$). Under the conditions of the present study, supplementation with protected fat did not affect superstimulatory response, quantity or quality of embryos. However embryos from the Control group were more tolerant to cryopreservation.

Keywords: Bovine, fatty acids, superovulation, embryo, cryotolerance.

1. INTRODUÇÃO

A pecuária brasileira possui uma demanda crescente de animais de elevado mérito genético, o que tem impulsionado o uso de técnicas avançadas de biotecnologia, notadamente aquelas associadas à reprodução animal, tais como a superovulação (SOV) e transferência de embriões (TE). Atualmente, o Brasil é um dos países que mais geram produtos utilizando esta biotecnologia, porém com resultados muito variáveis e aquém do ideal.

A nutrição está entre os fatores que mais afetam o desempenho reprodutivo de fêmeas bovinas. Por isso, animais de elevado mérito genético que são utilizados como doadoras de embriões devem estar sob um manejo nutricional adequado.

A suplementação de gordura é uma prática comum para aumentar a densidade energética da dieta. Além de fornecer calorias, a gordura possui efeito direto na reprodução através do tipo de ácido graxo presente (FUNSTON, 2004; RAES et al., 2004).

A suplementação de energia é bastante utilizada em gado de leite, principalmente pelo seu papel no aumento da densidade energética da dieta. Porém, devido às diferenças na ingestão de matéria seca e no nível de produção de leite, os resultados das pesquisas com gado de leite não são necessariamente aplicáveis aos animais para produção de carne (ARM & HAMMER, s. d.; FUNSTON, 2004; RAES et al., 2004).

Os componentes das membranas celulares como os ácidos graxos poliinsaturados podem ser manipulados através da nutrição das doadoras de embriões (SEIDEL, 2006). Neste sentido, a inclusão de gordura protegida na dieta pode ser uma possibilidade para melhorar a tolerância a baixas temperaturas de embriões produzidos *in vivo*. Além disso, devem-se procurar alternativas para incrementar os resultados dos processos de criopreservação de embriões de fêmeas zebuínas com conseqüente incremento de opções para disseminação do material genético de doadoras de embriões de interesse comercial.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção *in vivo* de embriões bovinos

Dados mundiais demonstram que cerca de 800.000 embriões bovinos são produzidos por ano, sendo que o Brasil representa do total da produção mundial, 17,6% e 48,5% de embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*, respectivamente (dados de 2005, MAPLETOFT, 2006; VIANA & CAMARGO, 2007). O uso de biotecnologias como a TE tem sido disseminado no Brasil, especialmente na raça Nelore, cujos exemplares excedem 90 milhões, devido à resistência ao estresse calórico e a parasitas (MONTEIRO et al., 2009). Deste modo, a técnica de múltiplas ovulações e a transferência de embriões são ferramentas utilizadas com o intuito de melhorar e multiplicar a genética de fêmeas *Bos indicus* (BARROS & NOGUEIRA, 2001; BARUSELLI et al., 2001).

As raças zebuínas são consideradas mais sensíveis aos tratamentos com gonadotrofinas, inclusive por possuírem maior número de folículos recrutados do que fêmeas *Bos taurus taurus* (BARUSELLI et al., 2001). Através da adequação de protocolos superestimulatórios, como o controle da emergência da onda folicular, indução da ovulação e doses de FSH adequadas para os zebuínos, facilitou-se o manejo destes animais e aumentou a eficiência dos programas de transferência de embriões (BARUSELLI et al., 2001; BÓ et al., 2008).

A produção *in vivo* de embriões através da SOV é uma biotécnica reprodutiva comumente denominada TE e consiste na estimulação hormonal dos ovários (superovulação ou indução de ovulações múltiplas) de uma fêmea, doadora, para induzir o desenvolvimento e a maturação de vários folículos simultaneamente (SARTORI et al., 2009). Após detecção de estro ou indução de ovulação através da aplicação exógena de hormônio, a vaca ou novilha recebe monta natural ou inseminação artificial (IA) e, seis a oito dias após, os embriões são colhidos através de lavagem uterina e imediatamente criopreservados ou transferidos para receptoras (SARTORI et al., 2009). Portanto, o objetivo dos protocolos de superestimulação é obter o número máximo de embriões transferíveis com alta probabilidade de produzirem prenhez (MAPLETOFT, 2006).

O aumento do número de bezerros obtidos de doadoras com alto valor genético proporcionado pelo uso desta técnica permite a disseminação mundial de genética (BARUSELLI et al., 2001), podendo obter rápida expansão de determinados genes. Na pesquisa científica, esta técnica também possui sua aplicação, sendo usada para responder questões de fisiologia básica e para melhorar os protocolos de TE (MAPLETOFT, 2006).

Na SOV, se busca a estimulação e a ovulação de um maior número possível de folículos de uma mesma onda de crescimento folicular, através da aplicação de hormônios (MAPLETOFT, 2006). O número de ovulações e a eficiência da colheita de embriões são dependentes da quantidade de FSH utilizada. Com a elevação das doses deste hormônio, a ovulação também aumenta até que o platô seja alcançado. Entretanto, o uso de altas doses de FSH deprime as taxas de colheita, através da inibição do pico de LH (hormônio luteinizante) e ovulação (SCHERZER et al., 2008). A dose de FSH exógeno utilizado varia conforme o produto (laboratório), a categoria, o estado fisiológico, o escore de condição corporal (ECC), a raça e a individualidade da doadora, sendo que para as raças zebuínas se utiliza uma dose menor (aproximadamente 50% a menos) do que para as taurinas e as novilhas necessitam de doses menores do que as vacas (BARUSELLI et al., 2006; SARTORI et al., 2009).

A variação no número de folículos ovulados está associada ao número de folículos com diâmetro > 2 mm no início da superestimulação ovariana, predizendo a resposta superestimulatória. Animais que possuem baixa resposta em determinada colheita embrionária continuam apresentando-a nos próximos tratamentos hormonais (MAPLETOFT, 2006; SCHERZER et al., 2008). Em geral, a taxa de colheita, ou seja, o número de embriões colhidos em relação ao número de corpos lúteos (CLs) é de 60 a 70% (SARTORI et al., 2009), mas depende do procedimento de colheita, do meio utilizado e da habilidade do técnico.

Os resultados de SOV ainda variam muito entre as doadoras, o que está relacionado ao hormônio utilizado, à sua dose e pureza, à raça, à nutrição e, notoriamente, à variação individual dos animais (SCHERZER et al., 2008; SARTORI et al., 2009). Cerca de 25% das fêmeas escolhidas como doadoras não produzem nenhum embrião transferível em resposta à SOV, 25%

respondem muito bem (≥ 10 embriões viáveis) e as demais, 50% respondem de maneira intermediária. Uma boa parcela do grupo de doadoras que não respondem, pode produzir embriões se adequando os protocolos conforme a individualidade da cada doadora (SARTORI et al., 2009).

Os fatores de variabilidade de resposta à SOV mais importantes são ligados ao animal e ambiente, principalmente, ao estado nutricional, histórico reprodutivo, idade, época do ano, raça e estado ovariano no momento do tratamento hormonal (MAPLETOFT, 2006). Repostas superovulatórias inconsistentes têm sido associadas à assincronia entre a maturação folicular e ovocitária, ocasionando falhas na fecundação. Adicionalmente, o perfil esteirodogênico nos folículos durante o período pré-ovulatório resulta em ovulações prematuras durante o tratamento com FSH; podendo originar CLs prematuros que secretam baixos níveis de progesterona no momento do estro, inibindo o pico de LH e as ovulações (BARROS & NOGUEIRA, 2001). Entretanto isto pode ser evitado através do uso de dispositivos de progesterona no protocolo superovulatório. Além disso, há indícios de comprometimento do transporte espermático e captura dos ovócitos pelas fímbrias da tuba uterina ao se utilizar protocolos hormonais.

Apesar dos avanços no conhecimento da fisiologia reprodutiva e na purificação dos hormônios utilizados atualmente na SOV, em termos gerais, os resultados de produção embrionária não diferem muito daqueles obtidos 20 anos atrás (HASLER, 2006). Esta realidade é o reflexo de baixos resultados obtidos com embriões criopreservados, diminuindo a chance de disseminar o material genético de animais de alto valor. Neste sentido há necessidade da otimização de técnicas de criopreservação que venham atender a demanda da produção de embriões *in vivo*.

2.2 Criopreservação de embriões bovinos

Da totalidade dos embriões obtidos pela transferência convencional no Brasil (81.114 embriões), 12% são criopreservados pelo método de congelamento lento (dados de 2006, VIANA & CAMARGO, 2007). Entretanto, dados de embriões vitrificados são escassos, pelo fato do baixo número de embriões

vitrificados transferidos a campo e por não se relatar a transferência destes embriões, pelos técnicos.

O cenário mundial apresenta predomínio de transferências realizadas a fresco, sendo porcentagens maiores que 80% para embriões produzidos *in vivo* e acima de 95% para embriões oriundos da produção *in vitro*. Tal fato se deve principalmente aos resultados insatisfatórios obtidos de embriões zebuínos congelados convencionalmente, diferindo de embriões taurinos (VIANA & CAMARGO, 2007).

Embriões de Nelore apresentam alterações significativas durante o processo de criopreservação. Visintin et al. (2002) relataram a presença de sinais de degeneração e morte de células embrionárias em embriões vitrificados ou congelados, ao serem comparados com embriões frescos. Além disso, durante a rápida congelação e vitrificação, os embriões provenientes de vacas holandesas exibiram melhores características morfológicas do que embriões de Nelore (VISINTIN et al., 2002). Estes resultados concordam com Zanenga (1993) que mostrou comportamento homogêneo durante o processo de congelação para embriões *Bos taurus*. Por outro lado, embriões *Bos indicus* variaram sua qualidade após descongelação, resultando em menores taxas de prenhez. Apesar disso, Lopatarova et al. (2002) comentam que a criopreservação de embriões tem sido um método utilizado na transferência comercial, principalmente pelo fato das taxas de sobrevivência serem próximas às dos embriões frescos. Há, inclusive, relatos de taxas de prenhez de 40 a 55% para embriões transferidos pós-vitrificação (LAZAR et al., 2000; MASSIP, 2001), entretanto estes trabalhos utilizaram um número baixo de animais.

A criopreservação simplifica o transporte e comercialização de material genético; reduz os custos com o processo de aquisição de animais, diminui os riscos de doenças; evita a perda de animais durante o transporte (GUIGNOT et al., 2006); alivia o problema da disponibilização de receptoras, através da criopreservação dos embriões colhidos excedentes ao número de receptoras e facilita a formação de bancos de germoplasma para preservar determinadas espécies ou raças (SILVA & METELO, 2005).

O método de criopreservação de embriões de mamíferos foi desenvolvido durante a década de 70 para camundongos e bovinos. Desde então, testes são realizados para criopreservar embriões de diversas espécies

e raças, bem como de diferentes estágios de desenvolvimento e para aqueles considerados mais sensíveis como os produzidos *in vitro*, clonados ou biopsiados (MASSIP, 2001).

As baixas temperaturas utilizadas na preservação de embriões têm a finalidade de manter o metabolismo celular em estado de quiescência, conseqüentemente, a atividade enzimática intracelular envolvida no metabolismo e respiração celular é estagnada, permitindo a conservação de células e tecidos por tempo indeterminado (GREEN, 2007).

O princípio fundamental da criopreservação se baseia na necessidade de remoção máxima de água das células antes da congelação, evitando a formação de grandes cristais de gelo que resultam em diversos danos intracelulares. O crioprotetor permeável (baixo peso molecular) promove esta desidratação das células embrionárias através da diminuição do ponto de solidificação e a formação de gelo extracelular se inicia entre -5°C e -15°C, porém as células continuam descongeladas e super resfriadas. O gelo extracelular formado provoca aumento da concentração de solutos fora do embrião. Deste modo, as células se desidratam até que as concentrações totais de solutos dentro e fora estejam em equilíbrio, o qual é atingido quando o embrião retorna ao seu volume anterior em meio isotônico (PALASZ & MAPLETOFT, 1996; GREEN, 2007).

Os crioprotetores permitem que o ponto de congelação do meio seja abaixado do ponto de congelação da água. Deste modo, em temperaturas menores que -20°C, as soluções podem sofrer um super-resfriamento, sem a formação de gelo, impedindo a desidratação celular adequada. Com isso, grandes cristais de gelo podem se formar intra e extracelularmente. Neste sentido, a indução de cristalização ("seeding") é necessária e realizada entre -5°C e -7°C para evitar a formação de gelo pré-congelação (PALASZ & MAPLETOFT, 1996; GREEN, 2007).

Os agentes crioprotetores podem ser classificados em: de baixo peso molecular (PM) e permeáveis; de baixo PM e não permeáveis e de alto PM e não permeáveis. Os permeáveis de baixo PM são solutos orgânicos capazes de atravessar a membrana plasmática, conferindo proteção das organelas, durante o resfriamento e descongelação (BEGIN et al., 2003). Além disso, por substituírem osmoticamente a água intracelular nas células embrionárias, antes

da congelação, reduzem as alterações de volume e formação de cristais de gelo intracelulares. Esta habilidade de atingir o meio intracelular está ligada ao baixo PM do crioprotetor. Os mais comumente utilizados são metanol (PM: 32,0), etilenoglicol (EG, PM: 62,1), 1,2 propanadiol (PM: 76,1), dimetilsulfóxido (DMSO, PM: 78,1), 2,3 butanadiol (PM: 90,1), glicerol (PM: 92,1) e outros alcoóis (PALASZ & MAPLETOFT, 1996).

Os crioprotetores extracelulares, sejam os de baixo (galactose, PM: 180,2; glicose, PM: 181,1; sucrose, PM: 342,3; trealose, PM: 378,3 e outros açúcares) ou de alto PM (> 50000 dáltons, como polivinilpirrolidona, PVP; álcool polivinil, dentre outros polímeros) são macromoléculas e açúcares não permeáveis cujas funções são reduzir a formação de gelo, facilitar a desidratação das células antes da congelação, proteger a integridade da membrana celular e auxiliar na reidratação celular (PALASZ & MAPLETOFT, 1996; MASSIP, 2001).

A concentração e a composição do crioprotetor, e o procedimento de descongelação são fatores que influenciam na sobrevivência dos embriões (SILVA & METELO, 2005). Além disso, a eficiência da proteção celular pode ser aumentada, durante a congelação/vitrificação, através da combinação de crioprotetores de baixo PM permeáveis e não permeáveis, pelo fato deste último reduzir a concentração dos crioprotetores intracelulares, diminuindo a toxicidade celular (PALASZ & MAPLETOFT, 1996; MASSIP, 2001). Entretanto, os crioprotetores podem levar a toxidade química e osmótica das células, provocando alterações em macromoléculas. Os embriões, quando em contato com EG, sofrem rápida contração e expansão, como resultado das mudanças na osmolaridade do meio com crioprotetor. Este choque osmótico é responsável por parte das lesões embrionárias (SILVA & METELO, 2005). Alterações ultra-estruturais também são relatadas em embriões criopreservados, tais como defeitos nas microvilosidades da membrana plasmática, edema de mitocôndria, acúmulo de debris celulares e redução nas junções de contato entre as células do trofoblasto (FAIR et al., 2001).

2.2.1 Congelação lenta

A congelação lenta consiste em um processo físico em que as células embrionárias são desidratadas progressivamente através da ação de soluções crioprotetoras, provocando decréscimo no ponto de congelação da célula, limitando assim a formação de cristais de gelo intracelular (MASSIP, 2001). As taxas de prenhez com embriões produzidos *in vivo* congelados podem alcançar 60 a 70% (SOMMERFELD & NIEMANN, 1999).

Primeiramente, a técnica foi desenvolvida para embriões de camundongos por Wittingham, em 1971. Posteriormente, em 1973, foi aplicada a embriões bovinos produzidos *in vivo* (revisado por MASSIP, 2001), sendo que, atualmente, a maioria dos embriões de mamíferos é criopreservada por este método. São utilizados crioprotetores de permeabilidade lenta e em baixas concentrações, induzindo a cristalização, controlando a taxa de resfriamento lenta (0,2°C a 2,0°C/min) até -30°C a -70°C e imergindo em nitrogênio líquido (-196°C). A descongelação é de forma controlada (250°C/min) também (MASSIP, 2001).

Esta técnica expõe os embriões a várias fases de congelação, sofrendo interferência de fatores físicos, químicos e biológicos. Tais efeitos podem resultar em lesões na zona pelúcida, membranas celulares, citoesqueleto e distúrbios metabólicos, ocasionando perda do controle celular e eventualmente apoptose ou necrose. Estas alterações estão ligadas à formação de cristais intracelulares que ocorrem sob condições específicas de congelação e descongelação (FAIR et al., 2001).

2.2.2 Vitrificação

A vitrificação, por longo tempo, tem sido uma alternativa aos métodos convencionais de criopreservação, cujo primeiro uso para embriões de mamíferos foi em 1985, feito por Rall e Fahy e posteriormente, 1986 e 1989 por Massip e colaboradores. Este procedimento envolve o uso de crioprotetores mais concentrados com a finalidade de aumentar a viscosidade dos meios intra e extracelulares e uma taxa de resfriamento de 20000 a 25000°C/min ou mais. Desta forma, permite a passagem do conteúdo embrionário do estado líquido

ao estado vítreo (gel amorfo) sem a formação de cristais de gelo intra e extracelularmente (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW et al., 1995; DOBRINSKY, 2002; LOPATAROVA et al., 2002; SILVA & METELO, 2005).

Devido às altas concentrações dos crioprotetores utilizadas nesta técnica, pode-se observar efeito de toxicidade ao embrião. Entretanto, tal fato pode ser minimizado pela exposição rápida aos crioprotetores e às altas taxas de resfriamento, proporcionando passagem direta pela zona perigosa de resfriamento entre +15°C e -5°C (VAJTA et al., 1998; VISINTIN et al., 2002).

As soluções de diluição comumente utilizadas na vitrificação possuem alta osmolaridade para prevenir a rápida reidratação que leva ao edema e lesões celulares, devido ao influxo de água ser mais rápido do que o efluxo do crioprotetor (VAJTA et al., 1998). A reidratação e a perda do crioprotetor ocorrem simultaneamente enquanto os embriões são expostos a soluções com concentrações decrescentes até que as condições isosmóticas sejam restabelecidas (EL-GAYAR et al., 2008). Deste modo, na vitrificação, os efeitos osmóticos e tóxicos ao aquecimento dos embriões criopreservados são minimizados pela imersão da palheta contendo o embrião na solução de desvitrificação (LOPATAROVA et al., 2002).

Existem diversas técnicas de vitrificação, tais como: grades de microscopia eletrônica, capilares de vidro, palhetas abertas (*open pulled straw*, OPS), “cryoloops” (alça de “nylon” com fina camada de solução de vitrificação), superfície sólida (vitrificação dos ovócitos/embriões em contato direto com uma superfície sólida resfriada a -150°C a -180°C) e “cryotop” (vitrificação realizada na superfície de uma haste de plástico). Estas metodologias são usadas para reduzir o volume da solução de vitrificação onde os ovócitos ou embriões ficam contidos (BEGIN et al., 2003).

A vitrificação em OPS foi originalmente desenvolvida por Vajta et al. (1997) para embriões bovinos e é amplamente utilizada. Baseia-se na redução do diâmetro e da espessura da parede para aproximadamente a metade do tamanho original das palhetas de 0,25 mL. Desta forma há o aumento da relação área de superfície e volume, obtendo-se pequena quantidade de meio envolvendo o embrião (cerca de 1 a 2 µL), e uma aceleração na taxa de resfriamento para mais de 10 vezes (acima de 20000°C/min), comparada à da palheta regular (2500°C/min), quando se faz a imersão das palhetas em

nitrogênio líquido, e menores danos tóxicos e osmóticos são observados (VAJTA et al., 1998; DOBRINSKY, 2002).

Através do uso da OPS, há o risco de contaminação do embrião pelo contato direto com o nitrogênio líquido. Entretanto, isto pode ser eliminado pela filtragem do nitrogênio em filtros com poros de 0,2 µm de tamanho; realização da vitrificação em vapor de nitrogênio concentrado (-170°C); fechamento das extremidades da palheta, ou mesmo, a lavagem repetitiva dos embriões desvitrificados em meio de cultivo reduzindo a chance de contaminação (KONG et al., 2000; LOPATAROVA et al., 2002).

A vitrificação é empregada principalmente para embriões produzidos *in vitro*, pois estes são mais sensíveis a diminuição de temperaturas do que os produzidos *in vivo* (SOMMERFELD & NIEMANN, 1999). Apesar de pouco difundida a campo, alguns estudos demonstraram que esta técnica de criopreservação pode ser utilizada com sucesso para embriões bovinos sem redução significativa nas taxas de prenhez (DOBRINSKY, 2002).

Dattena et al. (2000) compararam a sobrevivência pós-transferência de embriões derivados de ovelhas superovuladas e de blastocistos produzidos *in vitro* vitrificados com glicerol e EG, em palhetas de 0,25 mL e embriões frescos. Não encontraram diferenças nas taxas de prenhez entre os embriões vitrificados e frescos. Da mesma forma, Ptak et al. (1999) não observaram diferença na taxa de prenhez quando compararam embriões de ovelhas produzidos *in vitro* frescos ou vitrificados, apesar da menor taxa de nascimento encontrada para embriões vitrificados.

Por outro lado, a vitrificação em OPS resultou em diminuição da taxa de prenhez para embriões ovinos vitrificados quando comparados com embriões não criopreservados transferidos, sendo tal efeito mais pronunciado em embriões produzidos *in vitro* (5%, 2/40 vs 54,3%, 19/35) do que nos desenvolvidos *in vivo* (50%, 5/10 vs 90%, 9/10; PAPADOPOULOS et al., 2002).

Os resultados inferiores encontrados para embriões vitrificados podem ser explicados pelos seguintes achados: riscos de toxicidade atribuída a altas concentrações dos crioprotetores utilizados (SOMMERFELD & NIEMANN, 1999); maiores alterações na ultra-estrutura pós desvitrificação, com sinais de danos osmóticos nas células embrionárias (DARVELID et al., 1994); redução drástica do número de células da massa interna celular, sem alterar as células

do trofotoderma em relação àsquelas dos embriões frescos, sendo que os embriões vitrificados que levam a gestação a termo são aqueles que contêm quantidade suficiente de células na massa interna celular (GÓMEZ et al., 2009); rompimento da zona pelúcida que é um fenômeno comum quando os embriões são rapidamente resfriados ou descongelados nas palhetas. Entretanto, Vajta et al. (1998) afirmam que com a vitrificação em OPS este tipo de defeito é raro de ocorrer, apesar do aumento nas taxas de resfriamento e desvitrificação.

A otimização de técnicas de transferência direta de embriões bovinos vitrificados para receptoras é de fundamental importância por trazer uma maior praticidade, simplicidade e disseminar seu uso a campo e comercialmente, uma vez que reduz o tempo requerido para manipulação de embriões para transferência, elimina a necessidade de equipamento e treinamento técnico.

Taxas de prenhez de embriões vitrificados transferidos diretamente são próximas ao método de remoção do crioprotetor previamente à transferência dos embriões em bovinos e ovelhas, respectivamente (LEWIS et al., 1999; GREEN et al., 2008a). Guignot et al. (2006) utilizando o método de transferência direta para embriões caprinos vitrificados em glicerol e EG observaram a mesma proporção de receptoras prenhes/transferidas em relação aos embriões submetidos à diluição antes da transferência, além disso, a taxa de nascimento foi maior para o grupo de embriões transferidos diretamente.

2.2.3 Vitrificação versus congelação lenta de embriões

Ao se comparar as duas técnicas de criopreservação, a vitrificação é considerada um procedimento simples, apesar de necessitar de um treinamento técnico mais aperfeiçoado. Além disso, menor tempo é requerido para equilíbrio das soluções de vitrificação e o embrião, perfazendo todo o procedimento menos de 25 min, sem necessitar de equipamento (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW et al., 1995; LOPATAROVA et al., 2002). Por outro lado, a congelação clássica possui duração de aproximadamente 60 a 90 min e requer equipamento específico (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW et al., 1995; LOPATAROVA et al., 2002). A utilização de pequenos volumes da

solução de vitrificação juntamente com a imersão direta da palheta no nitrogênio líquido proporciona um resfriamento extremamente mais rápido em relação à congelação, conseqüentemente espera-se a redução de fraturas celulares (BEGIN et al., 2003).

Devido à diversidade de técnicas utilizadas para vitrificação e conseqüentemente a dificuldade na padronização destas, os resultados encontrados quando se compara à técnica de congelação convencional tornam-se difíceis de serem aplicados. Neste sentido, há relatos variáveis de taxa de prenhez e desenvolvimento embrionário *in vitro* para estas técnicas de criopreservação, além de encontrar escassa literatura comparando tais técnicas em embriões produzidos *in vivo*.

No estudo de Lopatarova et al. (2002) foi demonstrada a mesma taxa de eclosão, avaliada pelo cultivo *in vitro* por 72 h, para embriões bovinos produzidos *in vivo* vitrificados em OPS ou congelados convencionalmente, independente do grau de qualidade. Entretanto, embriões expandidos apresentaram resultados melhores na vitrificação.

Como Lopatarova et al. (2002) testaram o desenvolvimento de embriões provenientes de vacas superovuladas pós vitrificação em OPS e congelação, somente em condições *in vitro*; em 2006, Lopatarova e colaboradores avaliaram a taxa de sobrevivência destes embriões em receptoras. Entretanto, um baixo número de receptoras por grupo foi utilizado. As taxas de prenhez para embriões vitrificados ou congelados de diferentes estágios (mórula, blastocisto inicial e blastocisto expandido) bem como os de grau 1 e 2 vitrificados não diferiram.

Da mesma forma, Guignot et al. (2006) compararam a taxa de sobrevivência de embriões provenientes de cabras superovuladas, os quais foram submetidos à vitrificação em glicerol e EG ou à congelação lenta. Estes autores não observaram diferença entre as técnicas de criopreservação após a transferência para receptoras: 69% (18/26) vs 48% (14/29) para proporção de receptoras prenhes/transferidas e na taxa de nascimento, 45% vs 35% para embriões congelados e vitrificados, respectivamente.

A viabilidade de embriões ovinos produzidos *in vivo* criopreservados pelo método de vitrificação em OPS ou congelação tradicional, comparando dois métodos (direto e indireto) de transferência dos embriões pós-

aquecimento foi avaliada (GREEN et al., 2008a). A taxa de prenhez em receptoras inovuladas com embriões a fresco foi de 50%, sendo similar às taxas encontradas para embriões congelados (38,6%) e vitrificados (55,8%). No entanto, embriões vitrificados e inovulados pela técnica direta (57,1%) resultaram em maior taxa de gestação que os embriões congelados (34,8%, $P = 0,07$; GREEN et al., 2008a).

Os embriões produzidos em cabras foram vitrificados em OPS e avaliados antes da transferência e não apresentaram defeito morfológico, enquanto que, os embriões congelados convencionalmente não alcançaram a completa re-expansão. As taxas de prenhez aos 40 dias e sobrevivência embrionária foram diferentes para embriões congelados (58%, 7/12 e 42%, 10/24), respectivamente e para embriões vitrificados (100%, 14/14 e 64%, 18/28; EL-GAYAR & HOLTZ, 2001).

Dinnyés et al. (1996) avaliando a criotolerância de embriões bovinos produzidos *in vitro* relataram que a taxa de sobrevivência em 24 h de cultivo foi superada por blastocistos expandidos vitrificados (92%) em relação aos congelados (65%), apesar de que a taxa total de sobrevivência dos embriões criopreservados foi significativamente menor do que os embriões controle. Após 72 h de cultivo *in vitro*, a taxa de sobrevivência do grupo vitrificado foi numericamente maior, entretanto não houve diferença estatística quando comparado ao grupo congelado. Houve similaridade também para a taxa de eclosão dos grupos criopreservados. Estes autores observaram que a adesão dos embriões eclodidos dos grupos vitrificado e controle ao tapete celular foi menor que a adesão do grupo de embriões congelados, entretanto a proliferação da massa celular interna para os embriões presos à camada celular do meio de cultivo pode ser relacionada com sobrevivência embrionária.

Por outro lado, embriões de ovelhas desenvolvidos *in vitro* foram vitrificados (propilenoglicol e glicerol) ou congelados (glicerol e sucrose) e posteriormente o desenvolvimento *in vitro* foi avaliado. Mórulas e blastocistos congelados (31% e 67%) mostraram maiores taxas de desenvolvimento do que os vitrificados (12% e 19%; De PAZ et al., 1994).

Silva & Metelo (2005) relacionaram alterações físicas na zona pelúcida com a viabilidade de embriões bovinos produzidos *in vitro* submetidos à congelação lenta ou à vitrificação (utilizando EG, ficol e sucrose). Maior

viabilidade foi obtida para embriões provenientes do grupo de embriões frescos, seguida dos congelados e por último, dos embriões vitrificados. O número total de poros observados na zona pelúcida foi maior para embriões controle do que os do grupo dos congelados e vitrificados, apesar de que, os poros dos embriões vitrificados foram de tamanho menor. Isto foi associado com o comprometimento da viabilidade embrionária causado pela falha da barreira em proteger o embrião contra patógenos e pela menor interação entre células epiteliais maternas e embrionárias.

2.3 Ácidos graxos

Os ácidos graxos poliinsaturados (AGP) possuem mais de uma ligação dupla na molécula e são classificados em três grupos com base na estrutura química: ômega-3 (n-3), ômega-6 (n-6) e ômega-9, sendo que a primeira ponte dupla está localizada nos carbonos 3, 6 e 9, respectivamente. Os animais não sintetizam n-3 e n-6, por não terem as enzimas dessaturases apropriadas para inserir as duplas ligações na posição correta (STAPLES et al., 1998; WATHES et al., 2007).

As principais famílias de ácidos graxos que afetam a fertilidade são n-3 e n-6. O ácido linoléico dietético, abundante nos óleos vegetais, é um dos representantes da família n-6 (WATHES et al., 2007), o qual é convertido em ácido aracdônico, precursor das prostaglandinas dienóicas, como a $\text{PGF2}\alpha$. As mesmas enzimas, alongase e dessaturase, que atuam na conversão do ácido linoléico em aracdônico, também convertem o principal ácido graxo n-3, o ácido linolênico a ácido eicosapentaenóico (EPA), precursor das prostaglandinas trienóicas, como $\text{PGF3}\alpha$. Há uma competição entre precursores n-3 e n-6 para dessaturação e alongação e pelo sítio da enzima prostaglandina endoperóxido sintetase (PGHS), assim o aumento de ácidos graxos n-3, na dieta diminuirá a produção de prostaglandina dienóica (PETIT et al., 2002; WATHES et al., 2007). Por outro lado a produção de $\text{PGF2}\alpha$ pode ser aumentada ao se produzir mais ácido aracdônico (STAPLES et al., 1998).

O ácido linoléico também inibe a síntese de $\text{PGF2}\alpha$ por um mecanismo de competição com ácido aracdônico em se ligar à enzima PGHS, a qual é requerida para a conversão de ácido aracdônico à $\text{PGF2}\alpha$. Além disso, o ácido

linoléico pode ser convertido em EPA quando há excesso de ácido linoléico, provocando redução na síntese de prostaglandinas das séries 1 e 2 (STAPLES et al., 1998; THATCHER & JENKINS, 2002; RAES et al., 2004; WATHES et al., 2007). A este efeito negativo do ácido linoléico na síntese de $\text{PGF2}\alpha$, associam-se também reduções nas concentrações de estradiol intrafolicular e plasmática, refletindo nas concentrações de prostaglandinas (RAES et al., 2004).

2.4 Gordura protegida ruminal

O fluxo de ácidos graxos é menor do que a ingestão, devido à porcentagem de hidrogenação ruminal, ou seja, saturação dos ácidos graxos insaturados da dieta, que representa cerca de 80% para o ácido linoléico e 92% para o linolênico (DOREAU & CHILLIARD, 1997; RAES et al., 2004). Através deste processo, os microrganismos incorporam os ácidos graxos em sua composição lipídica (STAPLES et al., 1998).

Numerosas tentativas foram feitas para limitar os efeitos da hidrogenação de lipídios no rúmen e seus distúrbios na digestão dos carboidratos, através de diferentes técnicas de proteção da gordura, tais como, métodos de proteção natural (óleo de sementes); tratamentos químicos por formaldeído e sais de cálcio (saponificação) para encapsulação da gordura e tratamento físico através do aumento do ponto de fusão ou diminuição da granulometria da gordura. Uma dessas técnicas, elaborada em 1984, foi a associação de cálcio e ácidos graxos, comumente chamada de sais, como exemplo, o Megalac[®] (DOREAU & CHILLIARD, 1997).

Este produto é uma gordura granular composta de sais de cálcio de óleo de palma ou de soja e contém ácidos graxos saturados, tais como ácidos graxos palmítico (óleo de palma), esteárico e poliinsaturados de cadeia longa, como o linoléico e linolênico (ARM & HAMMER, s. d.; FUNSTON, 2004). Esta gordura protegida é obtida a partir de ácidos graxos de cadeia longa que ficam livres no processo de cisão dos triglicérides de óleos vegetais. Estes ácidos graxos reagem com sais de cálcio, formando um sal, popularmente conhecido como sabão de cálcio (ARM & HAMMER, s. d.). Este tipo de gordura, por ser um produto altamente estável em água e alta temperatura, somente é digerido

no animal, em meio ácido. No rúmen, o meio é ligeiramente ácido (pH = 6,2), o que faz com que ele permaneça inalterado. Ao chegar ao abomaso, cujo meio é extremamente ácido (pH = 2 e 3), ocorre o desdobramento do Megalac[®] com a liberação dos ácidos graxos e íons de cálcio para o intestino, que serão absorvidos e levados pela corrente sanguínea (ARM & HAMMER, s. d.).

A suplementação da dieta com gorduras protegidas ajuda a repor os ácidos graxos essenciais (linoléico e linolênico) perdidos, importantes no desempenho reprodutivo por terem diversas ações tais como: são precursores das prostaglandinas (ARM & HAMMER, s. d.; PETIT et al., 2002) e agem no corpo lúteo, ovócitos e embriões e na secreção de LH e de hormônios esteróides (STAPLES et al., 1998; MATTOS et al., 2004; WATHES et al., 2007).

2.5 Efeito dos Ácidos Graxos

2.5.1 Puberdade, estação de monta e pré-parto

Em alguns estudos relatados por Raes et al. (2004) foi observado um maior número de novilhas entrando em puberdade no começo da estação de monta, quando receberam dietas isoenergéticas e ricas em ácidos graxos. Talvez pelo fato dos ácidos graxos circulantes no sangue estimularem os neurônios que sensibilizam aqueles produtores de GnRH (SENGER, 1999). Bagley (1993) mencionou também que novilhas alimentadas com baixa energia na dieta tiveram maior idade à puberdade e menores níveis de progesterona do que aquelas que receberam dieta com alta quantidade de energia. Block et al. (2003) alimentaram bezerras holandesas de 3 a 5 meses de idade com ração suplementada com sais de cálcio de gordura de palma ou ácido linoléico conjugado e o tipo de gordura não teve efeito na idade à puberdade. Há poucos estudos com suplementação com ácidos graxos para novilhas, pois em geral, as novilhas dos experimentos estão num plano nutricional adequado e desenvolvem ótimo peso. Apesar disso, geralmente possuem uma boa reposta à suplementação.

Em relação à suplementação de ácidos graxos em dietas isoenergéticas, antes da estação de monta foi observado o aumento do número de vacas

ciclando no começo deste período (RAES et al., 2004). A gordura fornecida na dieta de vacas prenhes também influenciou na composição de ácidos graxos do líquido amniótico e na membrana lipídica do intestino do feto, em ratos (CLANDININ et al., 1991). Dietas lipídicas fornecidas no pré-parto melhoraram a sobrevivência de bezerros no parto. Isto ocorre devido ao aumento na atividade do tecido adiposo marrom que é essencial à regulação da temperatura dos recém-nascidos (LAMMOGLIA et al., 1999).

2.5.2 Prenhez

Vários estudos relatados por Thatcher & Jenkins (2002) mostraram que vacas lactantes suplementadas com Megalac® em dietas isoenergéticas obtiveram maiores taxas de concepção do que aquelas que não foram suplementadas. Da mesma forma, Ferguson et al. (1990), Sklan et al. (1991), Scott et al. (1995) e Garcia-Bojalil et al. (1998) relataram que vacas de leite suplementadas com Megalac® (8% de ácido linoléico) na lactação apresentaram melhorias na concepção. Outros pesquisadores (RAES et al., 2004) trabalhando com suplementação de gordura para vacas no pós-parto observaram menor tempo para reinício da ciclicidade e melhores taxas de concepção.

Petit et al. (2002) estudaram os efeitos dos tipos de gorduras ricas em ácidos graxos n-3 (Megalac®; linhaça tratada com formaldeído; uma mistura de óleo de peixe e linhaça tratada com formaldeído e um grupo alimentado com concentrado sem gordura, mas receberam 500 g por dia de óleo de linhaça infundida no duodeno) na secreção de prostaglandina em vacas lactantes. Observaram que o aumento da proporção de ácidos n-3 em relação aos n-6 diminuiu a síntese de PGF2 α . Os efeitos positivos das gorduras na função reprodutiva ocorrem devido ao aumento no balanço energético, aumento nas concentrações de colesterol e progesterona plasmáticos, mudanças na dinâmica folicular e alterações na secreção de prostaglandina. Neste experimento, as vacas tiveram ingestão de matéria seca, produção de leite e peso corporal similares, sugerindo que o balanço energético não foi o responsável pelos efeitos. A concentração do metabólito da PGF2 α , PGFM, quando se aplicou ocitocina, foi menor para vacas submetidas às dietas com

ácido linolênico, o que pode ter contribuído para maiores taxas de gestação, através da redução da luteólise e aumento do diâmetro do corpo lúteo de vacas que receberam quantidade moderadas de ácidos graxos n-3.

As taxas de concepção 24 dias pós-IA foram maiores para vacas de leite suplementadas com ácido linolênico do que linoléico, mostrando uma alta taxa de sobrevivência embrionária inicial e menor perda de prenhez para vacas alimentadas com linhaça (AMBROSE et al., 2006).

Lopes et al. (2007) em um experimento realizado no Brasil, avaliaram os efeitos da adição de gordura protegida ruminal, Megalac-E[®] (sal de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa, com 40% de ácido linoléico) à suplementação mineral protéica na resposta reprodutiva de primíparas Nelores a pasto por 31 dias, após a Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF). Para isto, distribuíram os animais em dois grupos: um recebendo suplementação mineral protéica e Megalac-E[®] (n = 200) e um grupo controle recebendo suplementação mineral protéica sem Megalac-E[®] (n = 211), porém as dietas não foram isoenergéticas. As vacas foram submetidas ao protocolo de IATF e os bezerros foram removidos por 48 h e retornaram após IATF. O índice de concepção das primíparas suplementadas com Megalac-E[®] foi superior (56,5%) ao grupo não suplementado (45,6%). Os autores acreditam que este resultado foi devido ao papel do ácido linoléico em suprimir a síntese de PGF2 α no útero e conseqüentemente prevenir a morte embrionária. Durante o experimento, os bezerros tiveram acesso ao cocho com a suplementação mineral protéica, e foi observado aumento numérico no ganho de peso dos bezerros das primíparas suplementadas com Megalac-E[®] (27,4 Kg contra 16,9 Kg dos bezerros que não tiveram acesso à suplementação com Megalac-E[®]). Estes dados sugerem que há necessidade de experimento para se avaliar o efeito da suplementação com Megalac-E[®] na produção de leite em vacas de corte e no ganho de peso dos bezerros.

Posteriormente, foi realizado outro experimento para avaliar o efeito de duas dietas isoenergéticas contendo dois tipos de gorduras protegidas (Megalac-E[®], predominância de ácido graxo linoléico ou Megalac[®], ácido graxo saturado) na taxa de prenhez em vacas Nelores (n = 583), as quais receberam tais dietas do dia da IA até o diagnóstico de gestação (28 dias pós IA). Para os animais alimentados com Megalac-E[®] observou-se maior aumento na taxa de

prenhez (48,2%, 81/168) do que os suplementados com Megalac (33,9%, 58/177; $P < 0,05$) e mineral protéico (26,4%, 63/238; $P < 0,01$); tal resultado pode ser explicado pela diferença no perfil de ácidos graxos entre os tratamentos (LOPES et al., 2008).

Dieta com semente de girassol foi fornecida a vacas Nelores pós-parto ($n = 133$) do momento da IA até 22 dias após o protocolo e observou-se aumento de 20,4% na taxa de concepção e redução na mortalidade embrionária para vacas que receberam esta dieta. Provavelmente, a semente de girassol por ser rica em ácido linoléico, limitou a síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (PERES et al., 2008).

Adicionando Megalac-E® à suplementação mineral protéica de receptoras mestiças ($n = 288$) do início do protocolo de sincronização até o 52º dia após a transferência de embriões, houve acréscimo na taxa de concepção de 12% (48,7% vs 36,7%) em relação ao grupo controle ($n = 207$; RODRIGUES JUNIOR, 2008).

O incremento encontrado nas taxas de concepção e prenhez pode estar ligado a alterações causadas pelos AGP que influenciam a dinâmica ovariana, bem como a viabilidade ovocitária, proporcionada pela ovulação de um folículo maior ou mesmo à atenuação da secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$, durante o período de reconhecimento materno-fetal ou envolvimento direto dos ácidos graxos em mecanismos embriotróficos (AMBROSE et al., 2006).

Staples et al. (1998) apresentaram alguns efeitos negativos da alimentação com gordura inerte na atividade ovariana, como maior incidência de vacas no anestro, cisto e a não manifestação de estro. Entretanto, estes achados foram relatados em um número pequeno de trabalhos e podem estar associados à alta produção de leite.

Por outro lado, a infusão de ácido graxo linoléico em novilhas pós-parto não influenciou retorno à ciclicidade, taxa de prenhez ou intervalo de partos, apesar de resultar em concentrações de ácido linoléico mais altas e em aumento da capacidade de produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (FILLEEY et al., 1999). Spicer et al. (1993) também observaram que dietas controle ou com gordura não afetaram o intervalo de ovulações ou estros, no pós-parto. A taxa de prenhez aos 28 ou 45 dias pós IA não diferiu para vacas de leite que receberam dietas

ricas em ácidos graxos n-9 *cis* (18:1c, oléico), n-9 trans (18:1t), n-6 (18:2, linoléico, Megalac-R) ou n-3 (18:3, linolênico; BILBY et al., 2006a).

A maioria dos estudos apresentados por Staples et al. (1998) relata efeito positivo da suplementação de gordura nas taxas de concepção e prenhez. Entretanto, a suplementação com sementes de linhaça (rica em ácido graxo linolênico), girassol (composta de ácido graxo linoléico) ou controle por 25 dias antes do início do programa de sincronização até 50 dias após não influenciou na taxa de prenhez. Talvez, pelo não processamento das sementes oleaginosas, ocasionando absorção insuficiente de ácidos graxos para provocar efeito na reprodução (COLAZO et al., 2004).

A grande variedade de resultados na taxa de concepção encontrada na suplementação de AGP pode ser explicada por falha de delineamento experimental, principalmente no que diz respeito ao número insuficiente de animais utilizados (WATHES et al., 2007).

2.5.3 Concentração sanguínea de hormônios e outras substâncias

Em revisão realizada por Raes et al. (2004) foi documentado o efeito dos suplementos lipídicos nas concentrações dos hormônios metabólicos. Alguns autores observaram que o consumo de óleos poliinsaturados de plantas aumenta as concentrações de insulina, GH, glicose, ácidos graxos não esterificados e IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina), em vacas e novilhas de corte e leite. Entretanto, há autores que não encontraram diferenças nas concentrações destes hormônios em vacas e novilhas suplementadas com lipídios.

Thomas et al. (1997) avaliaram a influência de dietas isoenergéticas com composições diferentes de ácidos graxos na concentração de insulina e GH, em vacas de corte. A dieta suplementada com AGP provocou aumento nas concentrações de insulina entre a segunda e sétima semanas de suplementação, em relação à dieta controle. Já as outras dietas, suplementadas com ácidos graxos saturados e altamente poliinsaturados aumentaram as concentrações de insulina somente depois da sexta ou sétima semana de alimentação. Todas as dietas lipídicas elevaram a concentração de GH, colesterol e IGF-1 intrafolicular nos folículos grandes. Os autores

concluíram que o consumo de AGP estimula o crescimento folicular, devido ao aumento nas concentrações de substâncias envolvidas na foliculogênese.

Childs et al. (2008a) em um estudo comparando diferentes níveis de AGP linolênico em dietas isoprotéicas e isoenergéticas fornecidas por 14 dias antes da sincronização do ciclo estral, em novilhas de corte, constataram aumento nas concentrações plasmáticas de IGF-1. Para todas as dietas, independente do nível de ácido linolênico, houve aumento da concentração do EPA e diminuição do linoléico no endométrio e no fluido folicular, mostrando que existe uma correlação forte e positiva entre as concentrações plasmática, folicular e endometrial de AGP.

Valores de IGF-1 foram maiores para vacas alimentadas com dieta composta de ácido graxo linoléico, em comparação às concentrações de dietas controle e rica em linolênico. Porém, as concentrações de insulina não foram afetadas pela dieta (ROBINSON et al., 2002).

Em outros trabalhos, entretanto, as concentrações de IGF-1 e GH não apresentaram diferenças para os grupos de vacas que foram submetidos à *ovum pick up* (OPU; aspiração folicular guiada por ultra-som) e receberam dietas ricas em ácidos graxos n-9 cis (18:1c, oléico), n-9 trans (18:1t), n-6 (18:2, linoléico, Megalac-R) ou n-3 (18:3, linolênico; BILBY et al., 2006a). Em estudo recente, Childs et al. (2008b) compararam dietas com ácido saturado ou AGP n-3, isoenergéticas e isoprotéicas, fornecidas por 50 dias antes do protocolo de superestimulação para novilhas de corte e não observaram diferenças nas concentrações de insulina e IGF-1 para ambos tratamentos. Da mesma forma, Thangavelu et al. (2007) não encontraram diferença nas concentrações de insulina, em vacas que receberam dieta rica em ácido linoléico, linolênico ou saturado. Ponter et al. (2006a) também não observaram efeito nas concentrações de insulina e IGF-1 para novilhas de leite suplementadas a base de soja (rica em ácido linoléico) ou linhaça (rica em ácido linolênico). E, em outro trabalho, a concentração de IGF-1 foi similar para vacas alimentadas com dietas controle ou com gordura (SPICER et al., 1993). Dieta lipídica rica em AGP dada a ovelhas anteriormente à concepção (4 semanas) também não interferiu nas concentrações plasmáticas de insulina e IGF-1 (GREEN et al., 2008b). Da mesma forma, vacas que receberam dieta rica em gordura 14 dias antes da OPU não apresentaram diferenças nas

concentrações de GH, insulina, IGF-1 e leptina (FOULADI-NASHTA et al., 2007).

A concentração de PGFM produzida em resposta à aplicação de ocitocina no dia 15 do ciclo estral foi maior para novilhas de corte que receberam dieta com AGP n-6 comparada a de animais alimentados com dieta de AGP n-3 (CHILDS et al., 2008c). Para animais submetidos à dieta com ácido linolênico também foi observado este aumento em relação àqueles suplementados com dieta sem gordura protegida (CHILDS et al., 2008a).

Além da suplementação lipídica com ácido linoléico afetar as concentrações de PGFM no plasma, Scholljegerdes et al. (2007) observaram que os AGP alteram a composição de ácidos graxos no hipotálamo, tecido uterino e oviduto, sendo que este último demonstrou ser o mais sensível à dieta com ácido linoléico, podendo ter potencial para influenciar na fertilidade.

A suplementação lipídica pode aumentar as concentrações plasmáticas de esteróides em bovinos, através da ação direta dos AGP no aumento da pulsatilidade de LH, no tamanho do folículo pré-ovulatório, no metabolismo hepático, nas concentrações plasmáticas de colesterol e IGF-1, no conteúdo lipídico das células luteais e na modulação da síntese de prostaglandina (HIGHTSHOE et al., 1991; RYAN et al., 1992; HAWKINS et al., 1995; THOMAS et al., 1997; STAPLES et al., 1998; PETIT et al., 2002; ROBINSON et al., 2002; RAES et al., 2004; CHILDS et al., 2008a.)

Suplementação de gordura provoca aumento de colesterol e da lipoproteína que o carrega. Isso se deve, provavelmente, à necessidade de se aumentar a absorção de ácidos graxos e conseqüente transporte destes. Além disso, alguns artigos sugerem que a concentração adicional de colesterol provocada pela alimentação com gordura pode aumentar a síntese de progesterona pelas células foliculares e luteais (STAPLES et al., 1998). Entretanto, alguns trabalhos não mostraram aumento da concentração sérica do colesterol coincidindo com maiores concentrações de progesterona (STAPLES et al., 1998).

Como o colesterol é um precursor para síntese de progesterona, o aumento nas concentrações circulantes deste lipídio (RYAN et al., 1992; HAWKINS et al., 1995; THOMAS et al., 1997; ROBINSON et al., 2002) pode levar a um incremento na síntese de progesterona (RYAN et al., 1992; SPICER

et al., 1993; RAES et al., 2004; PETIT & TWAGIRAMUNGU, 2006; ADAMIAK et al., 2006; FOULADI-NASHTA et al., 2007), o que está associado a melhores taxas de concepção, em ruminantes.

A suplementação com AGP n-3 ou n-6 aumentou a concentração de colesterol (CHILDS et al., 2008ac), porém o diâmetro do CL e as concentrações plasmáticas dos esteróides, em novilhas de corte suplementadas foram similares (CHILDS et al., 2008c). Por outro lado, Ambrose et al. (2006) não encontraram diferença no tamanho do CL e nas concentrações de colesterol e progesterona para grupos de animais que receberam dietas enriquecidas com ácido linoléico ou linolênico, apesar de que o folículo ovulatório foi maior para vacas submetidas à dieta com ácido linolênico.

Novilhas de corte submetidas a dietas isoenergéticas e isoprotéicas ricas em lipídios (óleo de soja) não tiveram as concentrações de estradiol afetadas no fluido folicular em relação ao grupo que foi alimentado com dieta sem a adição de gordura, porém apresentaram maiores concentrações de progesterona e aumento da capacidade da granulosa em produzir progesterona (RYAN et al., 1992).

Os suplementos lipídicos enriquecidos com ácidos graxos n-9 cis (18:1c, oléico), n-9 trans (18:1t), n-6 (18:2, linoléico, Megalac-R) ou n-3 (18:3, linolênico) não interferiram nas concentrações circulantes de progesterona no começo da sincronização ou durante as sessões de OPU, apesar das dietas tratamentos terem afetado os volumes dos CLs (BILBY et al., 2006a).

A secreção de LH e desenvolvimento folicular são regulados pelo estado energético do animal. A energia fornecida pelos ácidos graxos aumenta a secreção de LH e de glicose e esta pode contribuir na liberação de LH. Ambos estimulam o crescimento do folículo pré-ovulatório e aumentam o tamanho deste, resultando na formação de um CL maior com capacidade esteroidogênica maior e, conseqüentemente produção de progesterona mais alta e melhores taxas de concepção (RAES et al., 2004).

Hightshoe et al. (1991) encontraram maiores concentrações de colesterol e LH em vacas alimentadas com dietas suplementadas com gordura. Estes autores acreditam que os lipídios provocam diminuição de estradiol e

conseqüente diminuição no *feedback* negativo à adenohipófise e aumento da secreção de gonadotrofinas, como o LH.

Vacas alimentadas com dietas ricas em linoléico ou linolênico possuíam maior folículo pré-ovulatório e subsequente maior CL, entretanto a concentração de progesterona foi similar e não houve alteração na qualidade ovocitária e embrionária (BILBY et al., 2006a). No entanto, um tamanho aumentado do CL em fêmeas alimentadas com AGP não parece ser somente devido à ovulação de um folículo de maior tamanho. Pode estar associado a um efeito direto luteotrófico. Na avaliação de microscopia eletrônica, revelou-se maior conteúdo lipídico nas células luteais de novilhas alimentadas com sais de cálcio de óleo de palma (HAWKINS et al., 1995). Além disso, pela redução na síntese de prostaglandina no endométrio através da suplementação de AGP n-3 há manutenção do CL e das concentrações de progesterona (WATHES et al., 2007; LEROY et al., 2008) ou mesmo através da produção de PGE, um agente luteotrófico (WATHES et al., 2007).

O tamanho do CL foi menor para vacas alimentadas com ácido linoléico comparado àquelas dos grupos suplementados com linolênico ou com óleo de palma, o que pode explicar a menor taxa de prenhez para o grupo com menor CL (PETIT & TWAGIRAMUNGU, 2006).

Ao contrário dos resultados normalmente observados, a concentração de progesterona plasmática, no início da fase luteal, foi significativamente menor para vacas de leite que receberam dietas ricas em ácidos graxos n-3 ou n-6 do que o controle (ROBINSON et al., 2002). Ovelhas alimentadas com dieta lipídica rica em AGP tiveram menores concentrações plasmáticas de progesterona e não apresentaram diferença significativa no número de CL em relação aos animais que receberam dieta sem suplementação lipídica (GREEN et al., 2008b).

O aumento da progesterona plasmática em vacas alimentadas com dietas suplementadas com gordura pode ser devido ao incremento na síntese ou redução na taxa de metabolismo deste esteróide, no fígado (STAPLES et al., 1998).

Para testar o mecanismo pelo qual a inclusão de gordura na dieta aumenta a concentração de progesterona circulante, Hawkins et al. (1995) forneceram sais de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa, iniciando 100 dias

antes do parto. A concentração de progesterona foi maior para novilhas de corte mantidas nesta dieta, porém as concentrações luteais de progesterona foram similares entre os grupos, indicando que não houve diferença na taxa de secreção de progesterona. Por outro lado, o tempo requerido para desaparecimento da metade da progesterona, após a ovariectomia diferiu, sugerindo que houve redução no *clearance* hepático, sendo o fator principal que contribuiu para aumentar as concentrações de progesterona, em vacas alimentadas com dieta rica em lipídios. Entretanto, não foi realizado um estudo de maneira precisa para calcular o volume de sangue disponível ao fígado nestas condições.

Piccinato et al. (2009) observaram *in vitro* que ácidos graxos com cadeias de carbono de diferentes comprimentos diminuíram o metabolismo de esteróides. Entretanto, não houve repetição deste resultado *in vivo*, através da infusão de óleo de linhaça no abomaso, concordando com os resultados de Sartori et al. (2004) que também não comprovaram o efeito dos ácidos graxos na diminuição do metabolismo dos hormônios esteróides.

Recentes observações mostram que a insulina plasmática reduz a atividade das enzimas hepáticas envolvidas no metabolismo de esteróides (LEMLEY et al., 2008), e pelo fato da dieta com gordura aumentar as concentrações de insulina plasmática (THOMAS & WILLIAMS, 1996), pode ser uma explicação para o conseqüente aumento nas concentrações plasmáticas de progesterona (LEMLEY et al., 2008). Além disso, os AGPs podem agir competindo com os substratos de ligação a enzimas hepáticas, inibindo desta forma a atividade de catabolismo dos esteróides, no fígado (YAO et al., 2006).

O ácido aracdônico pode promover aumento da expressão da proteína STAR, que está envolvida na esteroidogênese, ou mesmo AGP podem regular a esteroidogênese da adrenal e ativar os receptores nucleares PPARs (gene ativador de receptores de peroxissomo), fator de transcrição que também está envolvido na síntese de esteróides nas gônadas (ROBINSON et al., 2002; WATHES et al., 2007).

2.5.4 Folículos ovarianos

A suplementação dietética com AGP influencia a foliculogênese, promovendo o aumento no número de folículos e no tamanho do folículo dominante ou pré-ovulatório (WATHES et al., 2007).

Trabalhos de diversos grupos de pesquisa relataram a influencia positiva de dietas com AGP no número de folículos pequenos (3 a 5 mm; BILBY et al., 2006b; PONTER et al., 2006b); médios (6 a 9 mm; HIGHTSHOE et al., 1991; LUCY et al., 1991; WEHRMAN et al., 1991; RYAN et al., 1992; THOMAS & WILLIAMS, 1996; THOMAS et al., 1997; ROBINSON et al., 2002; BADER et al., 2005); e grandes (> 10 mm; HIGHTSHOE et al., 1991; STAPLES et al., 1998). O aumento no número de folículos ocorreu paralelamente ao aumento nas concentrações de insulina, GH e IGF-1 no fluido folicular (RYAN et al., 1992; THOMAS & WILLIAMS, 1996; BADER et al., 2005), os quais agem na foliculogênese. Estas diferenças no número de folículos foram observadas após 3 a 4 semanas de suplementação, sendo a máxima diferença após 6 e 7 semanas. Gorduras de origem animal (predominantemente ácidos graxos saturados) também aumentam as concentrações de GH, em novilhas de corte, e elevam as concentrações plasmáticas de insulina e o número de folículos de tamanho médio mais lentamente do que fêmeas alimentadas com óleo de plantas. Já o tamanho do folículo dominante à aspiração, o número de corpos lúteos e as concentrações de progesterona não tiveram diferença entre tratamentos (THOMAS & WILLIAMS, 1996).

O diâmetro do primeiro folículo dominante foi maior para vacas que receberam dieta rica em ácido graxo linoléico, sendo que as vacas suplementadas com linolênico possuíram diâmetro intermediário, em relação ao controle (ROBINSON et al., 2002). Vacas que receberam infusão de gordura, no abomaso também apresentaram maior tamanho do folículo dominante, além deste ter tido crescimento mais acelerado (STAPLES et al., 1998). Da mesma forma, Staples et al. (2000) mostraram maior tamanho do folículo dominante para vacas de leite suplementadas com ácidos graxos poliinsaturados, em comparação às que receberam ácido oléico na dieta. O folículo pré-ovulatório foi maior para o grupo de animais que receberam ácidos graxos poliinsaturados (n-3 e n-6) na dieta do que o grupo controle (BILBY et

al., 2006a). O fornecimento de linhaça (ácido linolênico) também aumentou o tamanho do folículo ovulatório em relação aos animais suplementados com girassol (ácido linoléico; ROBINSON et al., 2002). Além disso, a concentração sanguínea pré-ovulatória de estradiol foi maior para as vacas que receberam dietas ricas em ácidos graxos n-3 do que aquelas alimentadas com dieta controle. Valores intermediários para vacas sob dieta rica em n-6, o que pode estar associada às concentrações de IGF-1 (ROBINSON et al., 2002) e às maiores concentrações de colesterol no fluido folicular e plasma (LEROY et al., 2008).

Por outro lado, Ambrose et al. (2006) e Petit & Twagiramungu (2006) não observaram diferença na quantidade de folículos pequenos, médios e grandes; e no tamanho do folículo dominante em vacas de leite suplementadas com dieta rica em ácido linoléico, linolênico ou saturado. Da mesma forma, em vacas de leite alimentadas com sais de cálcio de ácidos graxos linoléico e trans apresentaram diâmetros similares do folículo pré-ovulatório e luteal, em comparação aos animais que receberam óleo de palma (CERRI et al., 2004). Não houve efeito da dieta com AGP n-3 ou n-6 no diâmetro e taxa de crescimento do folículo pré-ovulatório e no volume do CL mensurado no Dia 7 pós-estro, em novilhas de corte (CHILDS et al., 2008c); concordando com Ambrose et al. (2006) que também não observaram efeito da dieta lipídica na taxa de crescimento do folículo dominante não ovulatório, no tamanho do CL e na concentração plasmática de progesterona.

2.5.5 Ovócitos

A distribuição de lipídios nos ovócitos se comporta da seguinte forma: aproximadamente 50% de triglicerídios, 29% de fosfolipídios, 20% de colesterol e 10% de ácidos graxos livres. Os ácidos graxos mais abundantes em ovócitos de ruminantes são os ácidos palmítico (C16:0), oléico (C18:1), esteárico (C18:0), e linoléico (C18:2; McEVOY et al., 2000; KIM et al., 2001). Dos componentes dos fosfolipídios, os ácidos graxos saturados estão em maior quantidade do que os AGPs. Destes, a maioria é da série 6, representada principalmente pelo linoléico e aracdônico (McEVOY et al., 2000; LEROY et al.,

2008). Porém, pouco se tem investigado sobre o efeito dos ácidos graxos dietéticos na qualidade dos ovócitos.

A qualidade de ovócitos e embriões está relacionada à composição de ácidos graxos, principalmente a composição da fração fosfolipídica da membrana plasmática, pelo papel importante no desenvolvimento durante e após a fecundação (McEVOY et al., 2000; FOULADI-NASHTA et al., 2007; LEROY et al., 2008).

Os ácidos graxos são usados como energia durante o processo de maturação (SORBERA et al., 2001) e competência ovocitária (KIM et al., 2001) e no período de desenvolvimento embrionário até implantação (WATHES et al., 2007), quando há intensa elongação e dessaturação dos ácidos graxos (YAO et al., 1980). Na maturação nuclear e citoplasmática do ovócito, AGPs são requeridos para estrutura, função e metabolismo celular (WATHES et al., 2007). Kim et al. (2001) encontraram menores quantidades de ácido linoléico e aracdônico em ovócitos maturados *in vitro* do que nos imaturos, provavelmente devido à utilização deste AGP para processo de desenvolvimento ovocitário, já que este ácido graxo não é sintetizado nas células animais. Além disso, sabe-se que o ácido linolênico (WATHES et al., 2007) e linoléico (HOMA & BROWN, 1992) agem no crescimento e diferenciação ovocitária, e na prevenção da quebra da vesícula germinativa e progressão da metáfase II. Por este motivo, ácido graxo 18:2 (linoléico) está em menor concentração em folículos maiores, mostrando que pode influenciar na maturação nuclear, ao contrário dos achados de Bilby et al. (2006a).

Adamiak et al. (2006) estudaram a interação da suplementação de ácido graxo (0% vs 6% ácido graxo de sais de cálcio de óleo palmítico) no desenvolvimento de ovócitos pós-fecundação, colhidos de novilhas cruzadas com baixo e moderado ECC. Compararam também a composição de ácidos graxos plasmático, nas células da granulosa (CG) e no complexo cúmulus-ovócito (CCO) e relacionaram com o potencial de desenvolvimento dos ovócitos. Foi relatado que, altas concentrações de ácidos graxos na dieta reduziram o número de blastocistos em novilhas com escore de ECC baixo, mas não no moderado. As alterações induzidas pela dieta no conteúdo de ácidos graxos no plasma e nas CG foram menos aparentes do que nos CCOs. Foi observado também, que há uma captação seletiva de ácidos graxos

saturados pelos folículos. Assim, a concentração de ácidos graxos saturados dentro dos CCOs foi elevada, e aumentos posteriores nos teores de ácidos graxos podem ter comprometido o desenvolvimento pós-fecundação, provavelmente por comprometer a fluidez da membrana plasmática. Houve uma redução significativa no conteúdo de AGP n-6 (ácido linoléico e aracdônico) dentro das CCOs de novilhas com ECC moderado comparadas às de ECC baixo, justificando a menor taxa de clivagem de ovócitos para novilhas com moderada condição. Estes ácidos graxos são precursores para síntese de prostanóides e influenciam na ciclooxigenase-2, enzima que é expressa nas células do cúmulus e juntamente com a síntese de prostanóides, é requerida para expansão do cúmulus e maturação ovocitária.

Novilhas que receberam gordura protegida aumentaram a quantidade de ácidos graxos total nos ovócitos aspirados, porém isso não houve interferência na qualidade dos embriões (ADAMIAK et al., 2004). Bilby et al. (2006a) avaliaram o efeito de suplementos lipídicos enriquecidos com ácidos graxos n-9 cis (18:1c, oléico), n-9 trans (18:1t), n-6 (18:2, linoléico, Megalac-R) ou n-3 (18:3, linolênico) na qualidade ovocitária e desenvolvimento folicular, entre 5 semanas antes do parto e 15 semanas após parição. Não observaram diferenças no número de folículos aspirados e grau de ovócitos, apesar do número de ovócitos ter se apresentado maior para as vacas alimentadas com ácido graxo oléico. Se neste experimento houvesse um grupo de animais alimentados sem a suplementação lipídica de ácidos graxos talvez tivessem encontrado diferença na qualidade ovocitária. Apesar disso, Zeron et al. (2002) relataram maiores números de ovócitos e melhor qualidade ovocitária em ovelhas suplementadas com sais de cálcio de óleo de peixe por 13 semanas em relação ao grupo controle.

2.5.6 Resposta superovulatória e qualidade embrionária

Os embriões de bovinos e suínos possuem maiores quantidades de gotas de lipídios, ao contrário de humanos e roedores. Essas gotas de gordura fornecem energia durante a fecundação e desenvolvimento embrionário inicial. Além disso, causam influência na sensibilidade à criopreservação de embriões, por mudanças na membrana lipídica (KIKUCHI et al., 2002).

Kane et al. (1979) mostraram que os ácidos graxos de cadeia longa suportam o crescimento de um zigoto ao estágio de mórula em cultivo *in vitro* por fornecer energia para o crescimento, bem como por modificar a composição da membrana plasmática. Sendo que, a deficiência de ácidos graxos n-6 em embriões está associada ao retardo no crescimento embrionário (KUBOW & KOSKI, 1995).

Embriões acima de quatro células possuem concentrações maiores de ácidos graxos insaturados, como ácidos linoléico e oléico, em relação aos saturados, pois os AGPs são componentes da membrana lipídica e aumentam rapidamente com a divisão celular embrionária. Adicionalmente, embriões de qualidade excelente e de desenvolvimento avançado também possuem maiores concentrações de ácido graxo linoléico e menores de ácidos graxos saturados (HAGGARTY et al., 2006). Deste modo, a suplementação lipídica para vacas de corte durante o período pós-parto pode influenciar o número e qualidade de embriões (RYAN et al., 1992; THOMAS & WILLIAMS, 1996).

Outra função atribuída à utilização dos ácidos graxos é a geração de água para o fluido da blastocela pela oxidação mitocondrial. A compactação entre os blastômeros que precede a blastulação depende da composição de lipídios da membrana plasmática do embrião, que pode ser comprometida em condições que alteram o conteúdo lipídico artificialmente (McEVOY et al., 2000). Neste sentido, ovócitos bovinos sob ação de agente bloqueador da oxidação de ácidos graxos têm capacidade reduzida de formar blastocistos (WATHES et al., 2007).

A composição de ácidos graxos de embriões bovinos de D7 a D14 pós IA foi relatada por Menezo et al. (1982), os quais observaram que a quantidade de ácidos graxos de embriões D7 a D10 se mantém estável. O ácido aracdônico, precursor da síntese de prostaglandina foi detectado no dia 14, provavelmente pela demanda no desenvolvimento embrionário. Nesse momento há alongação e dessaturação de ácidos graxos, afetando também as propriedades da membrana plasmática. Blastocistos colhidos 16 e 19 dias pós inseminação sintetizam prostaglandinas *in vitro* através do ácido aracdônico, podendo ter ação no aumento da permeabilidade vascular do endométrio antes da implantação e contribuir para o crescimento e desenvolvimento embrionário, durante o período de gestação inicial (LEWIS et al., 1982).

A inclusão de AGP na suplementação dietética tem efeito positivo no desenvolvimento embrionário (THANGAVELU et al., 2007). Além disso, pode reduzir a síntese ovariana e endometrial de $\text{PGF}_{2\alpha}$, auxiliar o embrião a produzir interferon tau, bem como alterar o ambiente da tuba uterina e do útero, contribuindo para o desenvolvimento embrionário, redução na morte embrionária e conseqüente estabelecimento da prenhez (MATTOS et al., 2004). De fato, a mortalidade embrionária foi menor para o grupo de vacas que recebeu ácido linolênico, quando comparado às vacas suplementadas com linoléico ou óleo de palma, o que está relacionado à concentração de progesterona. Entretanto as taxas de concepção e nascimento foram similares para todos os tratamentos (PETIT & TWAGIRAMUNGU, 2006).

Há escassa literatura relatando o efeito da suplementação de ácidos graxos na produção e desenvolvimento embrionário de bovinos. Não se sabe se os ácidos graxos são mais importantes para o embrião em si ou para sua implantação (PETIT et al., 2008). Além disso, não há consenso dos efeitos favoráveis ou não nestes parâmetros, ao se fornecer AGP.

Fouladi-Nashta et al. (2007) realizaram um experimento com vacas de alta produção leiteira para determinar o efeito de dietas compostas de ácidos graxos nos ovócitos, durante curto período de alimentação. Observaram que vacas alimentadas com dieta rica em gordura (800 g de Megalac/dia, predominantemente ácido graxo palmítico) no pós-parto apresentaram ovócitos com maiores taxas de clivagem (blastocistos/clivagem) e desenvolvimento (blastocistos/FIV, fecundação *in vitro*). Maiores porcentagens de embriões e de blastocistos com maior quantidade de blastômeros e células do trofotoderma foram encontradas para animais suplementados com 800 g de Megalac/dia (dieta com alta quantidade de gordura) em relação àqueles que receberam dieta com baixa quantidade de gordura. Isso pode ser explicado pela menor concentração plasmática de ácidos graxos não esterificados, pelo efeito positivo dos ácidos graxos na competência dos ovócitos e nas membranas celulares ou citoplasma, resultando em benefícios para qualidade e desenvolvimento embrionário.

Vacas de leite alimentadas com sais de cálcio de ácidos graxos linoléico e trans apresentaram maiores porcentagens de embriões de alta qualidade (73,5% vs 51,5%, $P = 0,06$); de espermatozóides acessórios presos à zona

pelúcida/estrutura recuperada (34,3 vs 21,5, $P < 0,001$) e taxa de fecundação (87,2% vs 73,3%, $P = 0,11$) em relação aos animais que receberam óleo de palma. Entretanto, não houve diferença no número de estruturas (45 vs 41) e taxa de recuperação (embriões/número de CL; 51,9% vs 54,9%; CERRI et al., 2004).

Em um estudo (THANGAVELU et al., 2007), vacas holandesas lactantes com 86 dias pós-parto, foram submetidas à dieta com gordura saturada (principalmente ácidos graxos palmítico e esteárico), linhaça (rica em ácido linolênico) ou semente de girassol (rica em ácido linoléico). Não foi encontrado efeito das dietas no número de folículos, CL, total de estruturas colhidas, embriões transferidos e taxa de fecundação. Por outro lado, a concentração de progesterona antes do início do protocolo de superestimulação e o número de blastômeros foram maiores para embriões produzidos em vacas alimentadas com ácidos graxos insaturados em relação ao grupo que recebeu gordura saturada, mostrando o efeito da dieta acelerando o desenvolvimento embrionário. Entretanto, neste experimento não foi incluída a dieta sem suplementação de ácidos graxos insaturados.

Kojima et al. (1997) avaliaram o efeito de dietas com ácidos graxos insaturados, linoléico; uma mistura de γ -linolênico (metabólito do ácido linoléico), linoléico e oléico; ou linolênico, no desenvolvimento de embriões de fêmeas suínas, suplementadas por 70 dias. O número de CLs e embriões, bem como os embriões de melhor qualidade colhidos de animais que receberam a mistura de ácidos graxos foram maiores do que para os outros grupos, apesar de que não houve diferença no diâmetro de blastocistos expandidos. Entretanto, por se tratar de dietas com quantidade de proteínas, lipídios, vitaminas e aminoácidos diferentes entre si, pode ser que outros componentes produziram este efeito benéfico.

Em estudo recente, Childs et al. (2008b) compararam dietas com ácido graxo saturado ou com AGP n-3, isoenergéticas e isoprotéicas, fornecidas por 50 dias antes do protocolo de superestimulação para novilhas de corte. Avaliaram o efeito da suplementação na produção e qualidade embrionária, baseando-se para isto, na morfologia e expressão gênica dos mesmos. Não houve efeito da suplementação de AGP n-3 no número de ovulações, no número total de ovócitos não fecundados e embriões colhidos, bem como no

número de embriões graus 1 e 2. Por outro lado, o número de embriões degenerados foi reduzido para as novilhas que receberam dieta de AGP n-3. Isto pode ter ocorrido, devido a um incremento na qualidade ovocitária e no transporte espermático, a alterações no ambiente do oviduto pela ativação de prostaglandinas da série 3, menos potentes para luteólise ou mesmo na expressão gênica uterina e sobrevivência embrionária.

Bader et al. (2005) não observaram aumento na qualidade e quantidade de embriões colhidos de vacas de corte superovuladas no período pós-parto e submetidas à suplementação lipídica por 40 dias antes do parto. Talvez a falha em não encontrar diferenças nestes resultados através da dieta lipídica, foi devido ao não uso de métodos, como mensurações diretas do perfil de ácidos graxos dos embriões ou avaliar a subsequente fertilidade de embriões criopreservados. Novilhas holandesas receberam concentrados formulados com linhaça (ácido linolênico) ou soja (rico em linoléico) antes da OPU. Nesse estudo também não foi encontrada diferença entre os grupos experimentais para o número e a qualidade ovocitária, ovócitos inseminados e clivados, bem como para o número e a qualidade embrionária, sugerindo que o tipo de ácido graxo (linoléico ou linolênico) não altera número e qualidade dos ovócitos e embriões produzidos pela OPU (PONTER et al., 2006a).

Avaliando o efeito do tipo de ácido graxo em doadoras e receptoras, Petit et al. (2008) forneceram como suplemento de gordura, linhaça (rica em ácido graxo linolênico) ou sais de cálcio de ácido graxo palmítico (Megalac), em dietas isoenergéticas e isoprotéicas. As doadoras tiveram o início do protocolo de superovulação, após 80 dias de alimentação. Já, as receptoras foram submetidas a esta dieta 8 semanas antes da sincronização do estro até 50 dias de gestação, de forma que as novilhas foram inovuladas com embriões congelados provenientes dos dois grupos de doadoras. Não houve diferença entre os tratamentos para número total de estruturas colhidas, entretanto, o grupo suplementado com Megalac apresentou maior taxa de fecundação e número de embriões viáveis, e menor porcentagem de embriões degenerados em relação ao grupo que foi suplementado com óleo de linhaça. A inibição do desenvolvimento embrionário neste último grupo pode estar relacionada com o número de pontes duplas do ácido graxo, como consta na dieta com óleo de linhaça e a uma maior maturação do ovócito provocada por este AGP. Além

disso, deve-se à menor digestibilidade do óleo de linhaça, contribuindo para diminuição do número de embriões graus 1 e 2. A taxa de prenhez para as receptoras foi similar para os grupos suplementados com gordura linhaça (rico ácido graxo linolênico) ou sais de cálcio de ácido graxo palmítico (Megalac). Esses resultados levam a sugerir que outros fatores além da PGF2 α , estão envolvidos após a transferência de embriões, pois o ácido linolênico não foi capaz de modificar o ambiente uterino das receptoras. Deste modo, a dieta de ácidos graxos não afetou a integridade embrionária pós-descongelamento, o que pode estar ligado a uma similar concentração de gordura nos embriões produzidos dos dois grupos (PETIT et al., 2008). Entretanto, neste experimento não foi incluída a dieta sem suplementação de ácidos graxos insaturados.

Novilhas de corte submetidas a dietas isoenergéticas e isoprotéicas ricas em lipídios de óleo de soja ou dieta sem a adição de gordura não mostraram diferenças quanto ao número de estruturas, embriões transferíveis, ovócitos não fecundados, embriões degenerados colhidos, bem como no número de embriões congeláveis (RYAN et al., 1992). Da mesma forma, diferentes suplementos lipídicos enriquecidos com ácidos graxos n-9 cis (18:1c, oléico), n-9 trans (18:1t), n-6 (18:2, linoléico, Megalac-R) ou n-3 (18:3, linolênico) não afetaram a taxa de clivagem, o estágio de desenvolvimento, a proporção de ovócitos que se tornaram blastocistos, nem o número de blastômeros em mórulas e blastocistos (BILBY et al, 2006a). Pereira et al. (2001) também não encontraram efeito na maturação ovocitária e no subsequente desenvolvimento embrionário quando incrementaram ácido aracdônico no meio de cultivo *in vitro*.

A suplementação lipídica com AGP n-6 por 4 semanas, próximo à concepção não afetou o tamanho dos conceptos colhidos de ovelhas, entretanto tais animais apresentaram no dia 13 pós-cópula, maior número de conceptos machos do que fêmeas, apesar da produção de interferon τ não diferir (GREEN et al., 2008b), de acordo com Bilby et al. (2006b). Uma das explicações do efeito da dieta no desvio do sexo é a ação direta dos AGPs no folículo, os quais poderiam causar efeitos na maturação folicular levando os ovócitos a serem maturados tardiamente e por alguma razão, ainda desconhecida, seriam fecundados por espermatozóides Y. Outra possibilidade levantada por Green et al. (2008b) para explicar o desvio do sexo provocado

pelos AGPs é que os ovócitos que possuem altas concentrações de ácido linoléico podem ter preferência ao recrutamento de espermatozóides Y, através de moléculas sinalizadoras derivadas de AGP. Por outro lado, Ambrose et al. (2006) não observaram diferença na proporção entre sexos de bezerros nascidos de vacas de leite alimentadas com dietas contendo ácido linoléico ou linolênico. Na suplementação de ácido linoléico ao meio de cultivo de zigotos não houve diferença na proporção de sexos para os embriões produzidos *in vitro* (PEREIRA et al., 2008).

Além dos AGPs serem importantes como um tipo de energia e por comporem as membranas celulares, podem agir diretamente na regulação de genes envolvidos na síntese de prostaglandina e na sobrevivência embrionária. Coyne et al. (2008) suplementaram por 45 dias novilhas de corte com dieta rica em ácidos graxos n-3, as quais apresentaram maior expressão gênica, em tecidos endometriais para o gene prostaglandina E sintase, o qual possui associação com o desenvolvimento embrionário; e PPAR α e δ , genes envolvidos na inibição da produção de PGF2 α , em relação ao grupo de animais que recebeu dieta com ácido palmítico.

Apesar dos genes PPAR- α e δ serem ativados por ácidos graxos de cadeia longa, a diferença encontrada nas concentrações circulantes de AGP de novilhas suplementadas com ácido graxo saturado ou n-3 não interferiu na expressão de genes relacionados ao desenvolvimento embrionário (CHILDS et al., 2008b).

2.5.7 Criopreservação de embriões

Os lipídios possuem papel importante no estoque de energia, na estrutura celular; na modificação de propriedades físicas e na função metabólica das membranas biológicas, incluindo fluidez e proliferação celular, sendo que o número e posição da dupla ligação dos ácidos graxos influenciam nestas propriedades. Os fosfolipídios e colesterol são importantes componentes para formação das membranas biológicas, as quais são requeridas durante a divisão celular após a fecundação. Por sua vez, os triglicerídios representam uma reserva compacta de estoque de energia (McEVOY et al., 2000; KIKUCHI et al., 2002).

O perfil de ácidos graxos e a razão saturado/insaturado influenciam nas propriedades físicas da membrana plasmática, afetando a resistência e a criopreservação dos embriões (CLANDININ et al., 1991; ZERON et al., 2002), sendo que estas propriedades são alteradas por fatores externos, tais como temperatura e dieta (ZERON et al., 1999). Assim, os lipídios da membrana celular podem ser manipulados através da nutrição e meio de cultivo.

Na criopreservação, ocorrem mudanças na fluidez da membrana, a qual se torna mais rígida. Isto ocorre em um período denominado fase de transição, na qual ocorrem as crioinjúrias. Os danos desta fase podem ser eliminados durante o resfriamento, através de altas taxas de resfriamento ou utilizando-se estratégias para que a fase de transição ocorra em temperaturas menores (SEIDEL, 2006).

A membrana citoplasmática é o principal sítio de crioinjúria e a composição de ácidos graxos da membrana influencia nesta fase de transição. Neste sentido, mudanças no perfil de ácidos graxos ou alterações moleculares de lipídios afetam a fluidez da membrana plasmática e conseqüente resistência a criopreservação, podendo contribuir para aumentar a fluidez da membrana plasmática e obter sucesso no processo de criopreservação (McEVOY et al., 2000). Miller Junior et al. (2005) observaram que um grau mínimo de fluidez da membrana é requerido para inserção de crioprotetores dentro da membrana plasmática do espermatozóide, o que pode facilitar a desidratação. Deste modo, justifica-se a dificuldade para congelação de espermatozóides de suínos, os quais possuem baixos níveis de ácido graxo DHA em sua membrana.

Havia menor conteúdo de ácido aracdônico e ácidos graxos insaturados em ovócitos imaturos congelados e descongelados. Estas menores concentrações estão associadas a defeitos oxidativos da membrana lipídica do ovócito, durante o processo de criopreservação. Neste sentido, o estoque do precursor do ácido aracdônico, o linoléico, é importante, pois menores serão os riscos de lesões de membrana por radicais livres. Ovócitos descongelados também apresentaram perdas no conteúdo fosfolipídico em relação a ovócitos frescos. Além disso, podem apresentar maior proporção colesterol:fosfolipídios, levando a diminuição da fluidez da membrana e redução de tolerância a baixas temperaturas (KIM et al., 2001). Entretanto, Hochi et al. (1999) afirmam que

alta quantidade de ácido graxo linoléico pode possuir efeito negativo na criopreservação de embriões bovinos, por propiciar maior geração de radicais livres.

Pereira et al. (2007) adicionaram ao meio de cultivo de embriões ácido graxo linoléico conjugado trans-10 cis-12 (AGC) e obtiveram redução do acúmulo de lipídio no embrião com conseqüente melhora na taxa de sobrevivência durante a criopreservação. O efeito do AGC pode ser explicado pelo aumento da fluidez da membrana plasmática (nível de insaturação) devido à incorporação do ácido graxo linoléico conjugado na membrana embrionária durante o cultivo. Além disso, o ácido linoléico induz modificações no perfil de ácidos graxos da membrana, seja no conteúdo de triglicérides, ou diretamente nos níveis de ácidos graxos saturados ou insaturados, o que contribui para o aumento da resistência embrionária à criopreservação. Hochi et al. (1999) também perceberam aumento na taxa de sobrevivência de mórulas pós-descongelamento que foram cultivadas em meio adicionado de ácido linoléico.

Trabalhando com embriões biopsiados e não biopsiados, cultivados com AGC, Pereira et al. (2008) observaram que os embriões cultivados neste meio possuíam maior viabilidade do que embriões controle e que apresentaram menor número de gotas de lipídio no citoplasma, aumentando a resistência dos embriões à micromanipulação e criopreservação.

A suplementação com AGP interfere na fluidez da membrana plasmática, por provocar menor temperatura da fase de transição de lipídios. Isto foi observado em uma maior integridade da membrana plasmática de ovócitos pós-descongelamento oriundos de ovinos suplementados com ácidos graxos de cadeia longa *by pass* (ZERON et al., 2002). Resultados similares foram obtidos para ovócitos de bovinos que durante o inverno, apresentaram maior quantidade de fosfolipídios na membrana plasmática e conseqüentemente maior habilidade de desenvolverem a estágio de blastocisto do que no verão (ZERON et al., 2001). Da mesma forma, Kojima et al. (1996) relataram um maior número de embriões suínos com núcleos viáveis pós-descongelamento para o grupo suplementado com ácido linoléico, sugerindo-se uma influência dos AGP na composição lipídica, na membrana citoplasmática.

Tominaga et al. (2000) com o intuito de determinar o efeito da adição de ácido linoléico ao meio de cultivo antes da congelamento, avaliaram a

sobrevivência de embriões bovinos de 16 células produzidos *in vitro*. Como resultado, houve maior taxa de desenvolvimento a estágio de blastocisto para embriões de 16 células descongelados e que foram cultivados em meio suplementado com ácido linoléico, do que aqueles cultivados sem este ácido graxo. Este efeito benéfico do ácido linoléico no desenvolvimento embrionário pós-descongelação pode ser resultado do aumento do conteúdo de AGP na membrana plasmática antes da descongelação, aumentando desta forma a fluidez desta e conseqüentemente a habilidade de congelação de embriões.

3. OBJETIVO

Em função dos efeitos observados com a suplementação com ácidos graxos poliinsaturados na literatura, o objetivo deste experimento foi avaliar as respostas superestimulatória e superovulatória, a quantidade e qualidade embrionária, as concentrações plasmáticas dos hormônios IGF-I e insulina, bem como a resistência à criopreservação através de congelação ou vitrificação de embriões produzidos *in vivo* de novilhas zebuínas suplementadas com gordura protegida ruminal, Megalac-E® (CHURCH e DWIGHT COMPANY).

4. HIPÓTESES

Fêmeas bovinas suplementadas com gordura protegida apresentam resposta superovulatória e produção embrionária similares às aquelas suplementadas com uma dieta isoenergética, porém sem adição de gordura.

Embriões provenientes de novilhas suplementadas com gordura protegida são mais resistentes ao processo de criopreservação do que aqueles colhidos de novilhas suplementadas com uma dieta isoenergética, porém sem adição de gordura.

A técnica de vitrificação para de criopreservação de embriões apresenta vantagens em relação à técnica de congelamento convencional por ser mais rápida, simples e por preservar melhor a integridade embrionária.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Local

O experimento foi realizado na Estação Experimental da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, localizada em Brasília-DF (15°52' a 15°56'S e 48°00' a 48°02' W), com altitudes que variam de 1050 a 1250 m (WALTER & SAMPAIO, 1998), entre os meses de fevereiro e julho de 2008.

5.2 Animais

Quarenta novilhas da raça Nelore não lactantes com idade entre 24 e 36 meses foram utilizadas em um experimento tipo “cross-over” com duas repetições e intervalo de aproximadamente 60 dias entre a colheita de embrião da primeira réplica e o início do protocolo de superovulação da segunda réplica.

Todos os animais foram submetidos a avaliações ultra-sonográficas ovarianas semanais desde o início do experimento para acompanhamento da ciclicidade (presença de CL em pelo menos uma de duas avaliações consecutivas). Estas avaliações ultra-sonográficas foram realizadas por um único operador, utilizando um aparelho de ultra-som em tempo real (Aloka SSD-500 V; Aloka Co., Tóquio, Japão) com transdutor linear trans-retal de 7,5 MHz. Na primeira repetição havia oito e sete animais em anestro para os grupos que receberam gordura protegida ruminal e controle, respectivamente. Para segunda repetição, sete e oito novilhas estavam anovulatórias para tais grupos experimentais. Com o propósito de induzir ciclicidade nessas novilhas consideradas pré-púberes, utilizou-se, sem sucesso, um dispositivo intravaginal de liberação de progesterona (1,9 g de progesterona natural, CIDR[®], Pfizer, Hamilton, Nova Zelândia) em todos os animais por 7 dias, associado a aplicações i.m. de 25 mg de PGF2 α (Dinoprost Trometamina, Lutalyse[®], Pfizer, Paulínia, Brasil) no momento de inserção e retirada do dispositivo. Este tratamento ocorreu entre a segunda e terceira semana de cada repetição experimental. Mesmo as novilhas cíclicas receberam o dispositivo por uma questão de homogeneidade de tratamento.

O presente experimento esteve de acordo com as regras do Comitê de Ética na Experimentação com Animais da Universidade Estadual Paulista e foi aprovado com o número de protocolo 19/2007 - CEEA.

5.3 Dietas experimentais

As novilhas foram divididas, aleatoriamente em dois grupos experimentais: C = Controle e G = Suplementação com gordura protegida ruminal, no concentrado. Ao início do fornecimento das dietas experimentais, os animais dos grupos C e G apresentavam peso de $356,1 \pm 7,8$ Kg e $361,7 \pm 7,4$ Kg e ECC médios (escala de 1 a 5; HOUGHTON et al., 1990) de $2,86 \pm 0,03$ e $2,96 \pm 0,05$, respectivamente.

O suplemento G foi formulado para fornecer 100 g de Megalac-E® (Arm & Hammer, Rio de Janeiro, Brasil)/animal/dia, gordura “by pass” derivada de óleo de soja que possui predominância de ácido linoléico em sua composição (Tabela 1). Nos primeiros 46 dias de dieta experimental, os animais receberam 800 g de concentrado/novilha/dia para o grupo C e 500 g concentrado/novilha/dia para o G.

Após este período, devido a problemas de consumo total diário dos suplementos, adicionou-se 100 g de milho moído por cabeça/dia em cada um dos tratamentos, com o propósito de elevar a palatabilidade, resultando em um fornecimento diário de 900 g de concentrado/novilha/dia para o grupo C e 600 g concentrado/novilha/dia para o G até o final do experimento.

TABELA 1. Porcentagem dos principais ácidos graxos encontrados na gordura protegida, Megalac-E®.

Nome ácido graxo	Símbolo	%
Láurico	C12:0	0,89
Palmítico	C16:0	13,85
Esteárico	C18:0	4,01
Elaidico	C18:1 n9t	3,18
Oléico	C18:1 n9c	17,92
Linoléico	C18:2 n6c	49,09
Arquídico	C20:0	0,84
Cis-11-Eicosenóico	C20:1	0,6
Linolênico	C18:3 n3	4,39
Heneicoisanóico	C21:0	1,8
Behênico	C22:0	0,68

Nota: Dados fornecidos pelo fabricante do Megalac-E (Arm & Hammer, Rio de Janeiro, Brasil).

Os ingredientes e os níveis de garantia utilizados para cada suplemento experimental se encontram nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

TABELA 2. Porcentagem relativa aos ingredientes utilizados na composição dos suplementos experimentais com gordura protegida ruminal (G) e controle (C).

Componentes	% suplemento com gordura protegida ruminal	% suplemento Controle
Fosfato bicálcico	12,5	7,8
Carbonato de cálcio	-	2,5
Sulfato de cálcio	1,0	0,6
Flor de enxofre	0,8	0,5
Iodato de cálcio	0,006	0,004
Óxido de magnésio	0,8	0,5
Sulfato de zinco	0,2	0,1
Sulfato ferroso	0,08	0,05
Sulfato de manganês	0,1	0,06
Sulfato de cobre	0,1	0,09
Selenito de sódio	0,002	0,001
Sulfato de cobalto	0,01	0,008
Sal comum	17,0	10,6
Uramido 40	13,0	10,0
Farelo de soja tostada	15,0	-
Agalmatolito	4,0	5,1
Milho	15,3	62
Vitamina A-1000000/g	0,003	0,002
Vitamina E-500/g	0,01	0,008
Vitamina D3-500000/g	0,004	0,003
Megalac -E	20,0	-
TOTAL	100	100

TABELA 3. Níveis de garantia dos suplementos com gordura protegida ruminal (G) e controle (C) previamente e posteriormente à adição de milho moído.

Níveis de garantia/Kg	Antes da adição de milho		Após a adição de milho	
	Suplemento com gordura protegida (G)	Suplemento Controle (C)	Suplemento com gordura protegida (G)	Suplemento Controle (C)
Cálcio (%)	4,6	2,9	3,9	2,6
Cobalto (mg/kg)	24	15	20	13,3
Potássio (%)	-	-	-	-
Cobre (mg/Kg)	337,5	210,9	281,3	187,5
Enxofre (%)	1	0,63	0,8	0,6
Ferro (mg/Kg)	225,1	140,7	187,6	125,1
Flúor (máx.) (mg/kg)	225	140,6	187,5	125
Fósforo (%)	2,4	1,5	2,0	1,4
Iodo (mg/Kg)	35,9	22,4	29,9	20,0
Magnésio (%)	0,5	0,3	0,4	0,3
Manganês (mg/Kg)	300	187,5	250	166,7
Selênio (mg/Kg)	7,2	4,5	6,0	4,0
Sódio (%)	6,7	4,2	5,6	3,7
Zinco (mg/Kg)	472,5	295,3	393,8	262,5
Cromo (mg/Kg)	-	-	-	-
PB (%)	28,2	18,1	25,0	17,1
Vitamina A (UI/Kg)	30000	18750	25000,00	16666,7
Vitamina E (UI/Kg)	60	37,5	50	33,3
NDT (%)	83,5	52,6	84,1	56,4
NNPEPM (%)	19,5	12,2	16,3	10,8
Vitamina D3 (UI/Kg)	20000	12500	16666,7	11111,1

Os suplementos se tornaram isoenergéticos e isoprotéicos pela manipulação do consumo, baseando no consumo estimado previamente à adição de milho. A ingestão diária estimada para as dietas experimentais por animal está apresentada na Tabela 4.

TABELA 4. Ingestão diária estimada de nutrientes dos concentrados com gordura protegida ruminal (G) e controle (C) por animal previamente e posteriormente à adição de milho moído.

	Suplemento G		Suplemento C	
	Previamente à adição de milho moído	Posteriormente à adição de milho moído	Previamente à adição de milho moído	Posteriormente à adição de milho moído
Cálcio (mg)	23,2	23,2	23,4	23,4
Cobalto (mg)	120,0	120,0	120,0	120,0
Potássio (g)	-	-	-	-
Cobre (mg)	1687,5	1687,5	1687,5	1687,5
Enxofre (g)	5,0	5,0	5,0	5,0
Ferro (mg)	1125,6	1125,6	1125,6	1125,6
Flúor (máx.) (mg)	1125,0	1125,0	1125,0	1125,0
Fósforo (g)	12	12,1	11,9	12,1
Iodo (mg)	179,6	179,6	179,6	179,6
Magnésio (g)	2,5	2,5	2,6	2,6
Manganês (mg)	1500,0	1500,0	1500,0	1500,0
Selênio (mg)	36,0	36,0	36,0	36,0
Sódio (g)	33,7	33,7	33,7	33,7
Zinco (mg)	2362,5	2362,5	2362,5	2362,5
Cromo (mg)	-	-	-	-
PB (g)	140,9	149,9	144,9	153,9
Vitamina A (mg)	150000,0	150000,0	150000,0	150000,0
Vitamina E (mg)	300,0	300,0	300,0	300,0
NDT (g)	417,4	504,4	420,8	507,8
NNPEPM (g)	97,5	97,5	97,5	97,5
Vitamina D3 (mg)	100000,0	100000,0	100000,0	100000,0

Os animais também foram mantidos em sistema de pastejo com *Brachiaria decumbens*, com água à vontade.

As duas dietas experimentais foram formuladas para atender os requerimentos de manutenção para novilhas em crescimento e foram fornecidas uma vez ao dia, durante 67 (primeira repetição) ou 70 (segunda repetição) dias até as colheitas de embriões.

O consumo dos suplementos foi estimado pela pesagem diária da sobra do cocho, antes do fornecimento da próxima alimentação.

5.4 Manejo dos pastos

Os animais foram manejados em sistema de rodízio em seis piquetes de 5 ha, e para eliminar o efeito de piquete, a rotação dos animais nos piquetes foi realizada baseando-se no período de crescimento da forrageira (28 dias). A taxa de lotação (unidade animal/ha) para ambos os grupos experimentais, C e G, foi de 3,2 UA/ha.

5.5 Avaliações de escore de condição corporal e pesagem

Durante o experimento foram realizadas avaliações semanais de ECC e mensais do peso corporal dos animais para monitoramento do efeito das dietas no estado físico das fêmeas.

5.6 Superovulação

Após 50 dias de fornecimento dos respectivos suplementos, todas as novilhas receberam protocolo para sincronização da emergência da onda folicular, aplicando-se 2 mg i.m. de benzoato de estradiol (BE, Estrogin[®], Biofarma Química e Farmacêutica, Jaboticabal, Brasil), juntamente com a inserção de um CIDR[®] no D0 do protocolo (Figura 1). No D4,5 foram iniciadas as oito aplicações i.m. de FSH, em doses de 14; 14; 10,5; 10,5; 7; 7; 3,5 e 3,5 mg a cada 12 h, totalizando 70 mg de NIH-FSH-P1 de FSH suíno (Folltropin[®]-V, Bioniche Animal Health Canadá Inc, Belleville, Canadá). No momento da quinta e sexta aplicações de FSH, foram realizadas aplicações i.m. de 25 mg de PGF2 α . Simultaneamente à sétima aplicação de FSH, foi retirado o implante intravaginal de progesterona. Doze h após a última aplicação de FSH, ovulação foi induzida com 0,05 mg de GnRH (Acetato de Gonadorelina; Gestran Plus[®]; ARSA S. R. L., Buenos Aires, Argentina) e as IAs foram feitas 12 e 24 h após a aplicação de GnRH (D9). Para todas as IAs utilizou-se sêmen congelado de um mesmo touro da raça Nelore e mesma partida, testado e aprovado previamente em testes pós-descongelamento, inclusive em protocolo de fecundação *in vitro*. Sete dias após a primeira IA, os embriões foram colhidos.

Após a colheita dos embriões, cada novilha recebeu duas injeções i.m. de 25 mg de PGF2 α , sendo a primeira no dia da colheita e a segunda, 1 a 7 dias após. Uma nova SOV foi realizada, 60 dias depois e os tratamentos foram invertidos (“cross-over”), ou seja, os animais do grupo G passaram para o grupo C e vice-versa (Figura 1).

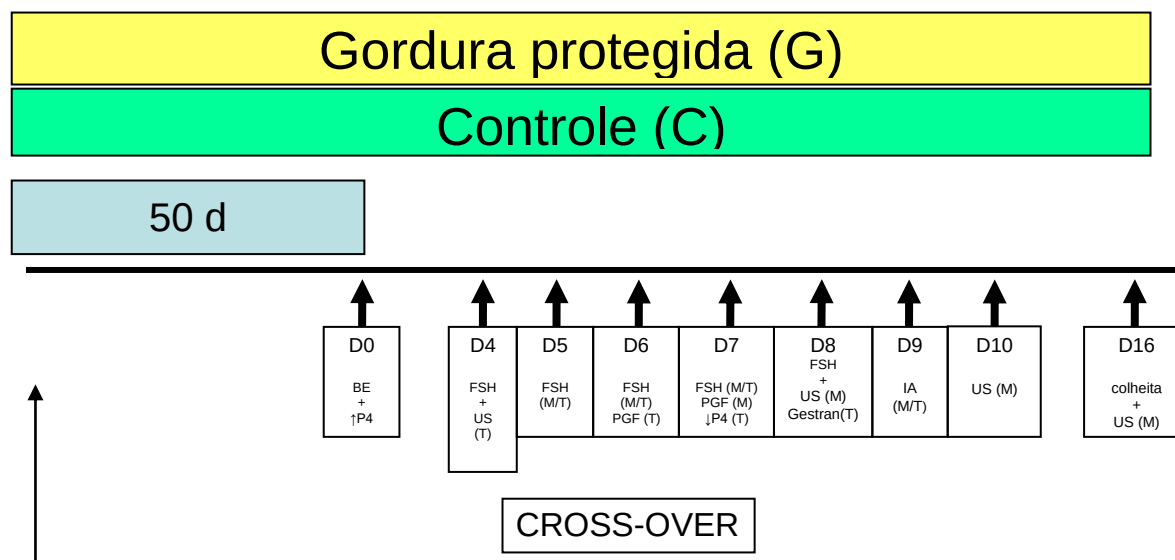


FIGURA 1. Esquema do delineamento experimental, mostrando o período de fornecimento das dietas experimentais (G = Gordura protegida ruminal e C = Controle), os protocolos hormonais para sincronização da ovulação e superestimulação, bem como as avaliações ultra-sonográficas. BE = Benzoato de estradiol (2 mg; Estrogin[®]); FSH (total de 70 mg; Folltropin[®]); GnRH = Lecirelina (50 μ g; Gestran Plus[®]); PGF = Prostaglandina F2 α (25 mg; Lutalyse[®]); P4 = dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR[®]); US = avaliação ultra-sonográfica; M = manhã; T = tarde; ↑ = inserção; ↓ = retirada.

5.7 Colheita embrionária

Para a realização das colheitas de embriões, as novilhas foram contidas em tronco individual e foi feita a anestesia peridural com cerca de 3 mL de lidocaína a 2% (cloridrato de lidocaína; Anestésico L[®]; Pearson Saúde Animal, Eurofarma, São Paulo, Brasil). A técnica de colheita utilizada foi a de lavagem uterina não cirúrgica, com 1 L de *Dulbecco phosphate buffered saline* (DPBS) por

animal. Para tal procedimento, o balão do catéter de Foley foi posicionado no corpo uterino justaposto ao óstio cranial da cérvix (CASTRO NETO et al., 2005). Após a lavagem uterina, o útero foi preenchido com DPBS e o catéter mantido no local com sua abertura lacrada por uma presilha de filtro de colheita. Em seguida, as novilhas foram soltas e retornaram ao tronco 30 a 40 min depois, para a colheita do DPBS que estava no útero e a realização de um segundo lavado com um volume adicional de 500 mL de DPBS. O fluido recuperado do útero foi colhido em filtro de 75 µm com devida identificação para cada animal e transportado para o laboratório, onde os embriões foram capturados e avaliados em um estereomicroscópio (Zeiss – Stemi SV6, Holanda). Os embriões foram então, classificados segundo o grau de desenvolvimento e qualidade, de acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE), descritas no Manual de transferência e micromanipulação de embriões nas espécies bovina e eqüina, Embrapa (2008) e por Ahmad et al. (1995); e mantidos em meio de manutenção (TQC Holding Plus[®], Bioniche, Pullman, WA) sobre uma placa aquecedora a 30°C até o processo de criopreservação. Os estágios dos embriões colhidos de cada grupo experimental foram referenciados da seguinte forma: o número 4 representou os embriões em estágio de mórula; 5, blastocisto inicial; 6, blastocisto e 7, blastocisto expandido, similar ao utilizado por Souza et al. (2007).

5.8 Avaliações ultra-sonográficas relacionadas à SOV

Exames ultra-sonográficos ovarianos foram realizados no ato da primeira e última aplicação de FSH para avaliar a população folicular e a resposta superestimulatória ao final do tratamento com FSH (Figura 1). Obteve-se, deste modo, um número indicativo da quantidade de folículos que cresceram em resposta ao tratamento superestimulatório com FSH. No dia da primeira aplicação de FSH a avaliação folicular considerou todos os folículos pequenos (2 a 4 mm de diâmetro). Entretanto, nos exames realizados no dia da última aplicação de FSH para avaliar número de folículos superestimulados foram considerados apenas os folículos com diâmetro ≥ 6 mm.

A resposta superovulatória também foi avaliada pela ultra-sonografia 2 e 7 dias após a indução de ovulação. No segundo dia pós indução da ovulação (D10), foi realizada a contagem do número de folículos não ovulados com diâmetro ≥ 6 mm e 7 dias após a aplicação de GnRH, a avaliação do número de CL (Figura 1). Para o cálculo do número estimado de CL, foi realizada a média aritmética entre número de folículos supostamente ovulados e o número de CL, no momento da colheita dos embriões. Quando o número de estruturas colhidas se apresentou maior que o número estimado de CL, foi considerado como o valor aproximado dos CLs o valor correspondente ao das estruturas colhidas.

5.9 Técnicas de criopreservação

Os embriões foram colhidos, classificados quanto ao grau de desenvolvimento e qualidade e, de forma balanceada, foram separados os embriões de grau I e II (SBTE) dos dois grupos experimentais (G e C) para serem vitrificados ou congelados pelo método convencional. Após a divisão dos grupos de embriões a serem criopreservados, estes embriões foram submetidos à passagem por 10 banhos no meio de manutenção-*Holding*, anteriormente à criopreservação.

5.9.1 Congelação

O crioprotetor utilizado para o método de congelação foi o EG 1,5 M (solução de tampão fosfato salino com *Bovine Serum Albumin*, BSA 0,4% com a adição de EG 1,5 Molar; Nutricell, Campinas, Brasil). Pelo qual, os embriões passaram por cinco banhos e em seguida foram envasados em palhetas de 0,25 mL, sendo que permaneceram por um tempo total de 10 min imersos em EG antes de se iniciar a congelação. As palhetas foram previamente identificadas com um número que representava o grupo tratamento, o número de embriões envasados, os estágios de desenvolvimento e grau de qualidade embrionários e a data da congelação. Após o envase dos embriões, as palhetas foram colocadas na máquina de congelação (TK 3000 SE[®]; TK, Uberaba, MG), que já estava estabilizada a -6°C. Antes de iniciar a curva de

congelamento, as palhetas permaneceram por 10 min estabilizando a -6°C , e após 2 min dessa estabilização, foi realizado o *seeding* (indução da cristalização). Completando-se os 10 min de estabilização, iniciou-se a curva padrão de congelamento ($-0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$), atingindo uma temperatura no final da curva de -32°C . Após o término da curva, as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido (N_2L) e armazenadas em botijões com N_2L para posterior descongelamento e avaliação dos embriões em cultivo *in vitro*.

5.9.2 Vitrificação

Os embriões foram vitrificados de acordo com protocolo de Vatja et al. (1998), utilizando-se o EG (puro; J. T. Baker, Edo. de México, México) e o DMSO (Sigma, St. Louis, Estados Unidos) como crioprotetores. Foram preparadas duas soluções de vitrificação: SV1 e SV2. A primeira foi composta de TCM 199 com sais de Hank's (Gibco) suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB), solução denominada de HM (solução de manutenção), adicionada de 10% de DMSO e 10% de EG. A SV2 foi preparada com TCM 199 com sais de Hank's (Gibco) com 0,5 M de sucrose suplementada com 20% de SFB (SM; solução de sucrose), sendo que a esta solução foram acrescentados 20% de DMSO e 20% de EG. As soluções foram distribuídas em uma placa Nunc[®] de quatro poços e foram utilizadas palhetas OPS (Minitub, Hauptstr, Alemanha) que foram previamente identificadas para envase dos embriões.

Todas as soluções foram filtradas ($0,22\ \mu\text{m}$) previamente ao uso e durante todo o procedimento de vitrificação as soluções permaneceram a uma temperatura entre 38 e 39°C . Para isto, a placa aquecedora foi ajustada para 41°C . Os embriões a serem vitrificados foram inicialmente colocados no primeiro e segundo poços da placa de Nunc[®], respectivamente, os quais continham HM, utilizada para a lavagem das estruturas. Em seguida, os embriões foram expostos durante 1 min à SV1, os quais foram retirados desta solução com auxílio de um pipetador automático calibrado para $2\ \mu\text{L}$, transferidos para uma gota de $20\ \mu\text{L}$ de SV2 e imediatamente colocados em uma nova gota de $2\ \mu\text{L}$ de SV2. Com os embriões na gota de $2\ \mu\text{L}$, a ponta da OPS foi encostada neste meio e por capilaridade, os embriões juntamente com

a SV2 entraram na palheta. Uma vez os embriões na OPS, esta foi então mergulhada em N₂L. O tempo decorrido desde o momento em que os embriões foram expostos à SV2 até serem colocados em N₂L não ultrapassou 20 s. As OPS foram armazenadas em botijões com N₂L para posterior desvitrificação e avaliação dos embriões em cultivo *in vitro*.

5.10 Produção *in vitro* de embriões

Embriões produzidos *in vitro* foram utilizados como controle das condições ideais da estufa e dos meios de cultivo *in vitro*, durante a avaliação do desenvolvimento dos embriões desvitrificados e descongelados.

Ovários foram obtidos de vacas em abatedouro localizados a uma distância de 40 Km do laboratório. Posteriormente, foram transportados em solução salina (NaCl 0,9%) a 35°C, suplementada com penicilina G (100 UI/mL) e sulfato de estreptomicina (50 µg/mL). A recuperação dos ovócitos foi realizada em, aproximadamente, 3 h após a colheita dos ovários.

No laboratório, os complexos *cumulus*-ovócitos (CCOs) foram aspirados de folículos de 2 a 8 mm com escalpes 18G ligados ao sistema de vácuo com pressão regulada para obter um fluxo médio de 10 mL/min. O líquido folicular aspirado contendo os CCOs foi depositado em tubo cônico de 15 mL e permaneceu em banho-maria (36°C). Em seguida, o conteúdo do tubo foi transferido para um filtro de 75 µm, onde foi lavado com solução tampão fosfato salina suplementada com penicilina a 100 UI/mL e estreptomicina a 50 µg/mL; e imediatamente, colocado em uma placa de petri 100 X 20 mm para recuperação e seleção dos CCOs, com auxílio de estereomicroscópio (Zeiss – Stemi SV6, Holanda). Somente CCOs que apresentavam citoplasma homogêneo e com pelo menos três camadas de células do *cumulus* foram utilizados. Posteriormente, os CCOs selecionados foram lavados e transferidos, em número de 30 a 35 para cada gota de 200 µL de meio de maturação (TCM 199 com sais de Earl's suplementado com 10% de SFB, Gibco; 24 UI/mL de LH, Sigma; 10 µg de FSH, Sigma; 1 µg/ml de L-glutamina, Sigma; 100 UI/mL de penicilina, Sigma; e 50 µg de estreptomicina, Sigma) coberta com óleo de silicone e incubados por 22 h a 39°C em 5% de CO₂ em ar, em placa de petri 60 x 15 mm.

Após o período de maturação, os ovócitos foram lavados e transferidos para gotas de 200 µL de meio de fecundação (TALP, meio de *calcium-free Tyrode's albumin lactate pyruvate*; PARRISH et al.[1995]; suplementado com nmoL/mL de 2 mM de penicilamina, Sigma; 1 mM de hipotaurina, Sigma; 250 mM de epinefrina, Sigma; 10 µg/mL de heparina, Sigma e amicacina). O dia da fecundação foi considerado o Dia 0 da PIV de embriões bovinos.

O sêmen utilizado foi de um único touro (mesmo touro usado para a produção *in vivo* dos embriões deste estudo) e de mesma partida, testado para FIV e descongelado a 36°C por 30s. Posteriormente, uma alíquota do sêmen foi retirada para avaliação da motilidade e vigor e os espermatozóides foram selecionados em um gradiente descontínuo de *Percoll* (45-90%, Amersham Biosciences AB,Uppsala, Suécia). O gradiente de *Percoll* 45% foi preparado na proporção 1:1(v/v) de *Percoll* 90% e sp-TALP. O sêmen foi depositado em microtubo de 1,5 mL contendo 400 µL de *Percoll* 90% e 400 µL de *Percoll* 45%. Após centrifugação por 5 min a 5.400 x g, o *pellet* foi ressuspendido com meio de lavagem (sp-TALP) e centrifugado novamente. Em seguida, o *pellet* resultante foi ressuspendido em torno de 80 µL de meio de fecundação (TALP suplementado com 2 mM penicilamina, 1 mM hipotaurina, 250 mM de epinefrina e 10 µg/mL de heparina). A concentração espermática foi verificada no hematocítômetro para o cálculo da dose inseminante em gota de 200 µL, sendo que a concentração final foi de 1×10^6 espermatozóides/mL. Os espermatozóides e ovócitos foram co-incubados por 20 h a 39°C com 5% de CO₂ em ar.

5.11 Cultivo *in vitro* dos embriões

Após a co-incubação, os possíveis zigotos produzidos *in vitro* foram transferidos para gotas de meio de fluido de oviduto sintético (SOF) suplementado com aminoácidos essenciais e não essenciais 0,34 mM de tri-citrato de sódio (Sigma), 2,77 mM myo-inositol (Sigma) e 5% de SFB (SOFaaci; HOLM et al., 1999), e cultivados a 39 °C e 5% CO₂ em ar por 7 dias (D7). No D7, os blastocistos de grau I produzidos *in vitro* foram transferidos para placas com gota de co-cultivo com células do *cummulus* com 200 µL de SOF.

A preparação das placas de co-cultivo para a avaliação do desenvolvimento de embriões produzidos *in vitro* (controle) e *in vivo* foi realizada 5 dias antes da descongelação/desvitrificação destes embriões. Para isto, células imaturas do CCOs de cerca de 30 ovócitos foram colocadas em placas com o meio de cultivo SOF e mantidas em estufa a 39°C e 5% de CO₂ em ar para formação do tapete celular no fundo da placa e estabilização do meio.

Cada placa possuía cinco gotas de meio SOF cobertas com óleo de silicone. Sendo que, cada gota foi destinada para determinado tratamento: grupos de embriões provenientes de novilhas que receberam o suplemento G e que foram vitrificados (V) ou congelados(C), (GV e GC) ou provenientes de novilhas que receberam suplemento C e que foram vitrificados ou congelados (CV e CC) e embriões produzidos *in vitro*.

Para a descongelação dos embriões, as palhetas foram retiradas do nitrogênio líquido, mantidas em temperatura ambiente por 5 s e imersas em água aquecida a 30°C por 20 s. Em seguida, os lacradores das palhetas foram retirados e após feito o corte na outra extremidade, com auxílio de uma tesoura, o meio juntamente com os embriões contidos na palheta foi passado para uma gota de 250 µL de meio *Holding*. Para completa reidratação, os embriões foram lavados em mais três banhos neste meio de manutenção. Posteriormente, após a lavagem em meio SOF (três banhos), os embriões foram transferidos para gota de cultivo correspondente ao grupo experimental para avaliação de seu desenvolvimento.

Na desvitrificação, os embriões foram passados por uma seqüência de soluções contendo concentrações decrescentes de sucrose, nas quais permaneceram por 5 min em cada, para remoção dos crioprotetores presentes no embrião. Tal procedimento foi realizado em placa de quatro poços Nunc[®], contendo as soluções de desvitrificação. As palhetas foram aquecidas por 3 s no ar e em seguida a extremidade final da OPS foi colocada diretamente na primeira solução de desvitrificação. Os poços um e dois possuíam cada um, 1000 µL de HM e 0,50 M de sucrose (400 µL de SM; solução de desvitrificação 1, SD1). O poço três foi constituído de 1000 µL de HM e 0,25 M de sucrose (200 µL de SM; solução de desvitrificação 2, SD2) e o poço quatro, HM. Todas

as soluções foram filtradas (0,22 μm) e pré-aquecidas na estufa, previamente ao uso, além disso, mantidas entre 38 e 39°C com o auxílio de uma placa aquecedora, durante todo o processo de desvitrificação.

A criotolerância dos embriões foi avaliada pela taxa de eclosão, baseando-se no desenvolvimento *in vitro* após a desvitrificação/descongelação. A taxa de eclosão foi considerada como a porcentagem dos embriões que estavam em eclosão e eclodiram durante os momentos de avaliações, em relação ao número total de embriões de cada tratamento submetido ao cultivo *in vitro*. O tempo total de cultivo *in vitro* foi de 72 h, sendo que as avaliações do desenvolvimento embrionário foram realizadas às 48 h e 72 h do início do cultivo.

O tamanho de cada embrião, englobando a zona pelúcida, foi mensurado nos momentos das avaliações de desenvolvimento embrionário, através do programa Motic Images Plus 2.0, por meio de uma ocular fotográfica acoplada à lupa Stem Zeiss SV-6. Entretanto, embriões em eclosão e contraídos não foram mensurados, por não apresentarem valores reais dos respectivos tamanhos.

5.12 Colheitas e análise do sangue

As colheitas de sangue foram realizadas com aproximadamente 35 e 24 dias de suplementação para as dosagens de IGF-I e insulina, respectivamente. O sangue foi colhido por punção da veia jugular em tubos Vacutainer® de 9 mL, contendo 100 μL de heparina sódica (Liquemine® 5000UI/mL; Hoffmann-La Roche, Brasília, Suíça) e imediatamente centrifugado a 1529 x g por 15 min para obtenção do plasma. Em seguida, foi armazenado a -20°C para mensurações posteriores das concentrações de insulina e IGF-I.

A dosagem de insulina foi realizada através de radioimunoensaio e a de IGF-I através de ensaio imunorradiométrico. Os kits utilizados para cada ensaio e os respectivos coeficientes de variação (CV) estão descritos na Tabela 5.

TABELA 5. Descrição dos kits utilizados e coeficientes de variação (CV) intra-ensaio, valores extremos das curvas padrão e sensibilidade do ensaio, obtidos nas dosagens hormonais realizadas.

Ensaio	Kit	CV intra-ensaio (%)	Curva padrão	Sensibilidade do ensaio
Insulina	Insulin RIA DSL-1600	8,9	5 a 300 μ UI/mL	1,3 μ UI/mL
IGF-I total	Active [®] IGF-I IRMA sem Extração DSL-2800 [™]	1,9	8 a 1100 ng/mL	2,06 ng/mL

5.13 Análise estatística

As variáveis de contagem como, número de folículos ≥ 3 mm no início do protocolo com FSH; resposta superestimulatória; número de folículos não ovulados; número de CL; número de estruturas totais; número de embriões congeláveis, degenerados e de ovócitos não fecundados foram inseridos em um modelo matemático que inclui os efeitos de período, ciclicidade aninhado ao período e tratamento, além do efeito aleatório de novilha. Para isto, utilizou-se o procedimento GLIMMIX do programa SAS, sob a metodologia dos modelos lineares generalizados considerando para estas variáveis de contagem uma distribuição de Poisson com função de ligação logarítmica, de acordo com Nelder e Wedderburn (1972). Excepcionalmente, para a variável média de estágio de desenvolvimento embrionário, considerou-se uma distribuição normal com função de ligação identidade sob o mesmo procedimento.

Para a média de estágio de desenvolvimento e tamanho embrionário no cultivo *in vitro*, o modelo inclui os efeitos de datas das avaliações, dieta, técnica de criopreservação e a interação dieta*técnica. Neste caso, utilizou-se para estas variáveis de distribuição normal um modelo matemático com procedimento GLIMMIX do programa SAS, sob a metodologia dos modelos lineares generalizados com funções de ligação identidade.

Para a comparação da proporção mórula:blastocisto entre os tratamentos utilizou-se o teste do qui-quadrado, considerando o embrião congelável como unidade experimental.

Para as variáveis de proporção, como taxas de eclosão 48 e 72 h após início do cultivo *in vitro* no modelo matemático foram incluídos os efeitos de data de descongelação ou desvitrificação, dieta, técnica de criopreservação e a interação dieta*técnica, utilizando o procedimento GLIMMIX do programa SAS, considerando uma distribuição binomial com função de ligação logit.

As medidas repetidas de concentrações médias de insulina, IGF-I, peso corporal e ECC foram modeladas com a matriz de correlação auto-regressiva de primeira ordem, utilizando o procedimento MIXED do SAS.

Relata-se ainda que, foram obtidas as correlações (método do Pearson) entre as concentrações de insulina e IGF-I e as variáveis tais como ECC, peso corporal, média de estágio de desenvolvimento no momento da colheita, número de folículos no início do tratamento com FSH, respostas superestimulatória e superovulatória.

Todas as comparações estatísticas foram realizadas sobre as médias ajustadas pelo método dos quadrados mínimos com uma aproximação do teste de qui-quadrado e estão apresentadas na forma de médias e erros-padrão (EP) com as distribuições nas escalas originais, pois estas podem ser facilmente interpretadas.

6. RESULTADOS

6.1 Consumo das dietas

Antes da adição de 100 g de milho por cabeça/dia a ambos os suplementos, observou-se consumo limitado do suplemento G em relação ao seu consumo esperado (Tabela 6). Nesse período, o consumo médio diário nos grupos G e C foi de 75,8% e 96,2% do esperado, respectivamente. Posteriormente à adição do milho moído, obteve-se aproximação do consumo desejado dos suplementos em ambos os grupos, com 95,7% do fornecido no grupo G e 98,0% do fornecido no grupo C (Tabela 6).

TABELA 6. Consumos desejados e observados médios, nutrientes digestíveis totais (NDT) e proteína bruta (PB) dos concentrados experimentais (G e C), previamente e posteriormente à adição de milho moído.

	Concentrado G		Concentrado C	
	Consumo desejado em g/cabeça/d	Consumo observado em g/cabeça/d	Consumo desejado em g/cabeça/d	Consumo observado em g/cabeça/d
Previamete à adição do milho moído	500	379,1	800	769,7
NDT (g)	417,4	316,4	420,8	404,9
PB (g)	140,9	89,2	144,9	139,4
Megalac-E (g)	100	75,8	-	-
Após adição do milho moído	600	574,7	900	882
NDT (g)	504,4	483,1	507,8	497,6
PB (g)	149,9	143,6	153,9	150,8
Megalac-E (g)	100	95,8	-	-

Devido ao menor consumo médio pelos animais do grupo G nos primeiros 46 dias de período experimental, os concentrados diferiram quanto à quantidade ingerida de NDT e PB nesse período (Tabela 6). Além disso, menor quantidade de Megalac-E foi ingerida por animal/d, representando 75,8% da quantidade esperada (Tabela 6).

Após a adição de 100 g de milho/animal/d, ambos os suplementos se tornaram isoenergéticos e isoprotéicos, aproximando-se do consumo desejado (Tabela 6). Da mesma forma, o consumo do Megalac-E alcançou 95,8% do desejado (Tabela 6).

6.2 Peso e escore de condição corporal

Apesar de os animais terem ganhado peso durante o experimento, não houve diferença entre os tratamentos em relação ao peso e ECC médios dos animais durante cada repetição experimental ($P > 0,10$, Figuras 2, 3, 4 e 5). Tal resultado era esperado, já que os animais dos dois grupos experimentais receberam suplementos isoenergéticos e isoprotéicos.

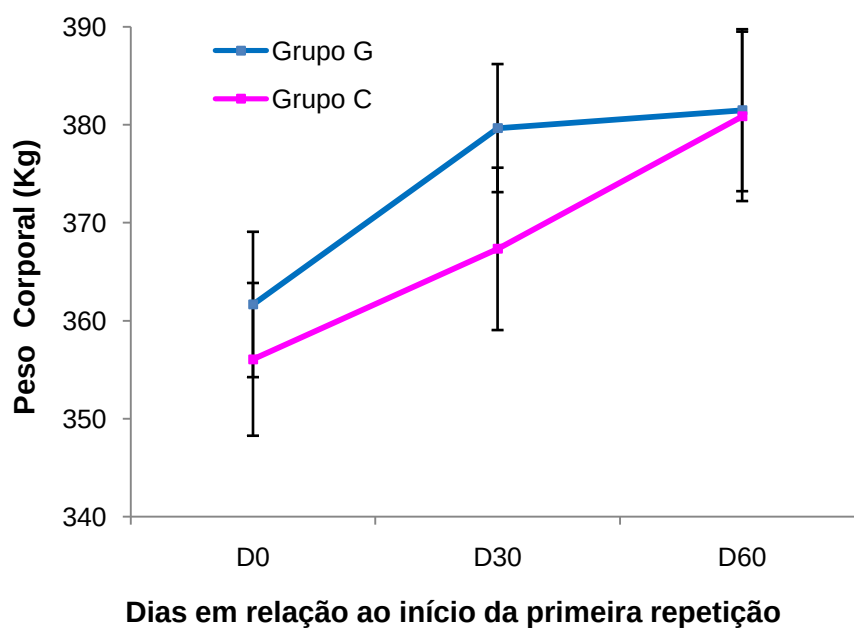


FIGURA 2. Peso corporal (média $\pm$ EP) dos animais que receberam suplementos com gordura protegida ruminal (G, n = 20) ou controle (C, n = 20), na primeira repetição. Não houve diferença ($P > 0,10$) no peso corporal médio entre os grupos experimentais.

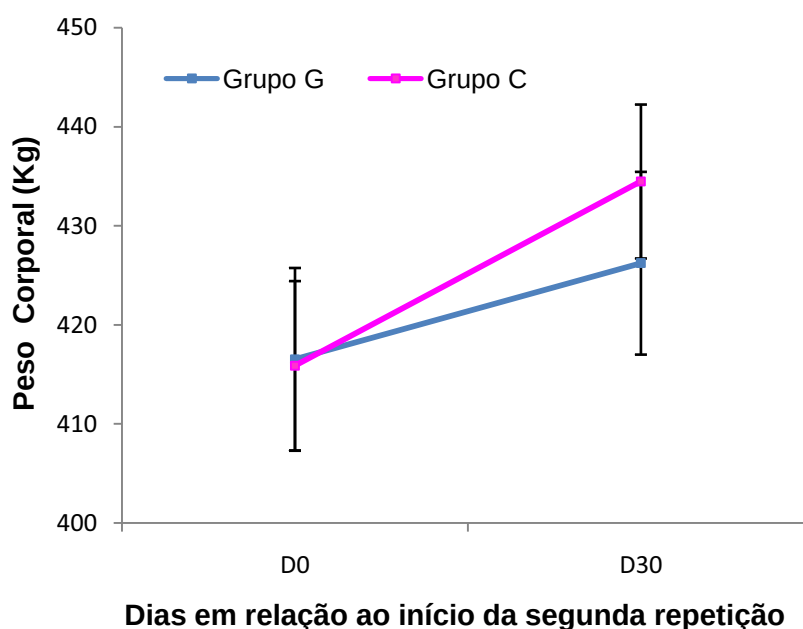


FIGURA 3. Peso corporal (média $\pm$ EP) dos animais que receberam suplementos com gordura protegida ruminal (G, n = 20) ou controle (C, n = 20), na segunda repetição. Não houve diferença ($P > 0,10$) no peso corporal médio entre os grupos experimentais.

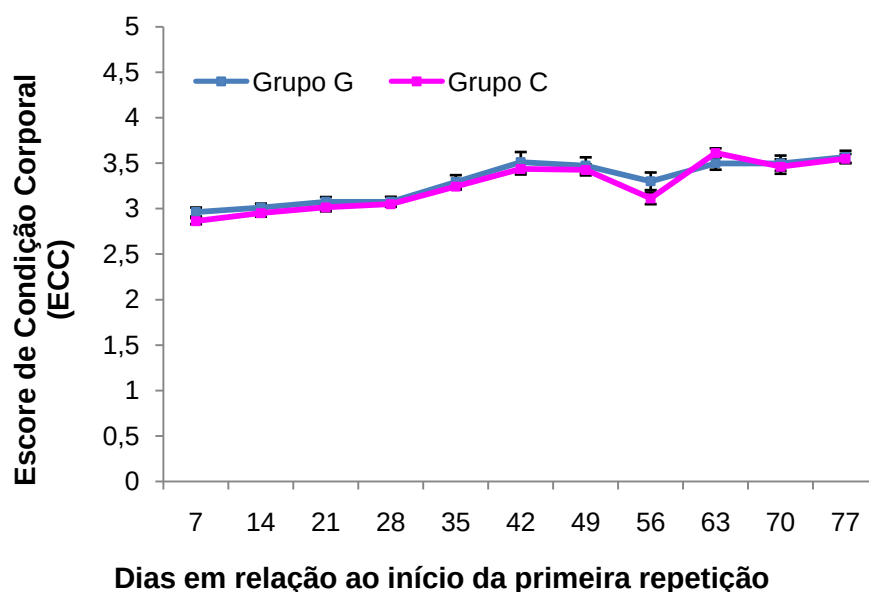


FIGURA 4. Escore de condição corporal (ECC; escala de 1 a 5; média $\pm$ EP) de animais que receberam suplementos com gordura protegida ruminal (G, n = 20) ou controle (C, n = 20), na primeira repetição. Não houve diferença ($P > 0,10$) no ECC médio entre os grupos experimentais.

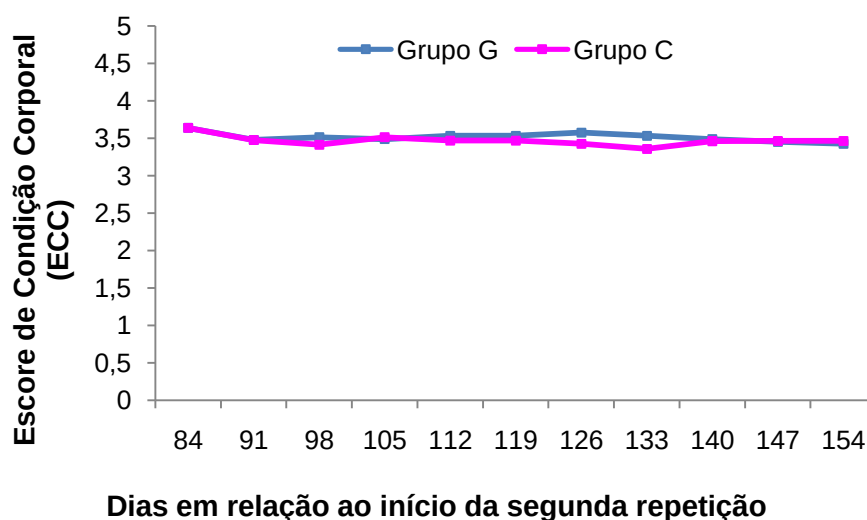


FIGURA 5. Escore de condição corporal (ECC; escala de 1 a 5; média $\pm$ EP) de animais que receberam suplementos com gordura protegida ruminal (G, n = 20) ou controle (C, n = 20), na segunda repetição. Não houve diferença ($P > 0,10$) no ECC médio entre os grupos experimentais.

6.3 Resposta superovulatória e produção embrionária

Não houve diferença entre os grupos experimentais G e C ($P > 0,10$) quanto ao número de folículos ovarianos no momento da primeira aplicação de FSH, à resposta superestimulatória e ao número de folículos não ovulados, conforme apresentado na Tabela 7. Por outro lado, foi observado que as novilhas que não estavam ciclando ao início da primeira repetição, mas não da segunda, apresentaram maior número de folículos ≥ 3 mm no momento da primeira aplicação de FSH do que aquelas que ciclavam ($36,1 \pm 2,5$ vs $29,9 \pm 1,8$; $P = 0,04$). Da mesma forma, neste período as novilhas que não estavam ciclando responderam melhor ao tratamento superestimulatório ($29,3 \pm 2,7$ vs $23,0 \pm 2,0$; $P = 0,06$).

A resposta superestimulatória, ou seja, número de folículos > 6 mm no momento da última aplicação de FSH, também sofreu efeito do período experimental, tendo sido maior na primeira repetição ($25,9 \pm 1,8$ vs $20,1 \pm 1,6$; $P < 0,0001$).

Os animais do grupo C apresentaram maior resposta superovulatória do que aqueles do grupo G (Tabela 7). Além disso, para esta variável, houve efeito do período de realização do experimento ($P = 0,03$) e de ciclicidade ($P = 0,05$). Na primeira repetição o número de ovulações foi maior do que na segunda ($18,2 \pm 1,3$ vs $15,5 \pm 1,2$) e as novilhas que iniciaram o primeiro período em anestro tiveram maior número de CLs do que aquelas que estavam ciclando ($20,7 \pm 2,1$ vs $16,0 \pm 1,4$).

Após a colheita dos embriões, o número total de estruturas, de embriões congeláveis, de embriões degenerados e de ovócitos não fecundados colhidos, foi similar entre os grupos G e C (Tabela 7). No entanto, na primeira repetição, um menor número de embriões congeláveis ($3,1 \pm 0,5$ vs $4,8 \pm 0,6$; $P = 0,05$) e maior número de embriões degenerados ($4,4 \pm 0,7$ vs $2,5 \pm 0,5$; $P = 0,004$) foi obtido em relação ao segundo período experimental.

Apesar da proporção mórula/blastocisto ter sido maior para o grupo G em relação ao C (Tabela 7), quando a análise foi realizada como média do estágio de desenvolvimento por doadora por colheita não houve diferença entre os tratamentos (Tabela 7). No entanto, esta variável teve efeito de período,

apresentando maior valor na primeira repetição experimental do que na segunda ($5,3 \pm 0,1$ vs $5,1 \pm 0,1$; $P = 0,09$).

TABELA 7. Resultados (média dos quadrados mínimos $\pm$ EP) da população folicular, corpos lúteos e embriões colhidos em novilhas suplementadas com gordura protegida (G) ou sem a adição de gordura protegida (C).

	Grupo G (n = 40)	Grupo C (n = 40)	P
Folículos ≥ 3 mm (início FSH); n	$32,4 \pm 1,5$	$32,7 \pm 1,5$	0,85
Folículos ≥ 6 mm (final FSH); n	$22,5 \pm 1,7$	$23,3 \pm 1,7$	0,50
Folículos não ovulados: D10; n	$7,6 \pm 1,2$	$6,6 \pm 1,1$	0,49
Corpos lúteos; n	$15,7 \pm 1,2$	$18,0 \pm 1,3$	0,06
Estruturas totais; n	$9,1 \pm 1,0$	$9,9 \pm 1,0$	0,42
Embriões congeláveis; n	$3,6 \pm 0,5$	$4,2 \pm 0,6$	0,48
Embriões degenerados; n	$3,4 \pm 0,6$	$3,3 \pm 0,6$	0,78
Ovócitos não fecundados; n	$0,6 \pm 0,3$	$1,1 \pm 0,5$	0,31
Proporção mórula/blastocisto	34,6:65,4	22:78	0,01
*Média de estágio de desenvolvimento embrionário/doadora/colheita	$5,1 \pm 0,1$	$5,3 \pm 0,1$	0,31

*Desenvolvimento embrionário: 4 = mórula; 5 = blastocisto inicial; 6 = blastocisto e 7 = blastocisto expandido.

6.4 Desenvolvimento *in vitro* dos embriões após desvitrificação ou descongelação

Resultados satisfatórios nas taxas de eclosão às 48 h ($78,6 \pm 4,8\%$) e às 72 h ($86,6 \pm 4,0\%$) do início de cultivo *in vitro* dos embriões produzidos *in vitro* demonstram que houve condições adequadas de estufa e dos meios de cultivo *in vitro*. Além disso, ao se comparar estas taxas de eclosão com as dos tratamentos G e C agrupados, os embriões produzidos *in vitro* tiveram melhor eclosão ($P < 0,01$) tanto às 48 h ($78,6 \pm 4,8\%$ vs $24,3 \pm 2,7\%$) quanto às 72 h ($86,6 \pm 4,0\%$ vs $37,3 \pm 3,0\%$) de cultivo.

Pelo fato de não haver efeito de interação entre os grupos de embriões C ou G com a técnica de criopreservação às 48 h ($P = 0,83$) e 72 h ($P = 0,65$) de cultivo *in vitro*, estas variáveis foram analisadas separadamente. Deste modo, ao se comparar a viabilidade embrionária dos grupos G e C, os

embriões do grupo C apresentaram maior taxa de eclosão, independentemente do método de criopreservação, às 48 h ($P = 0,009$) e 72 h ($P = 0,04$) de cultivo *in vitro* (Figura 6).

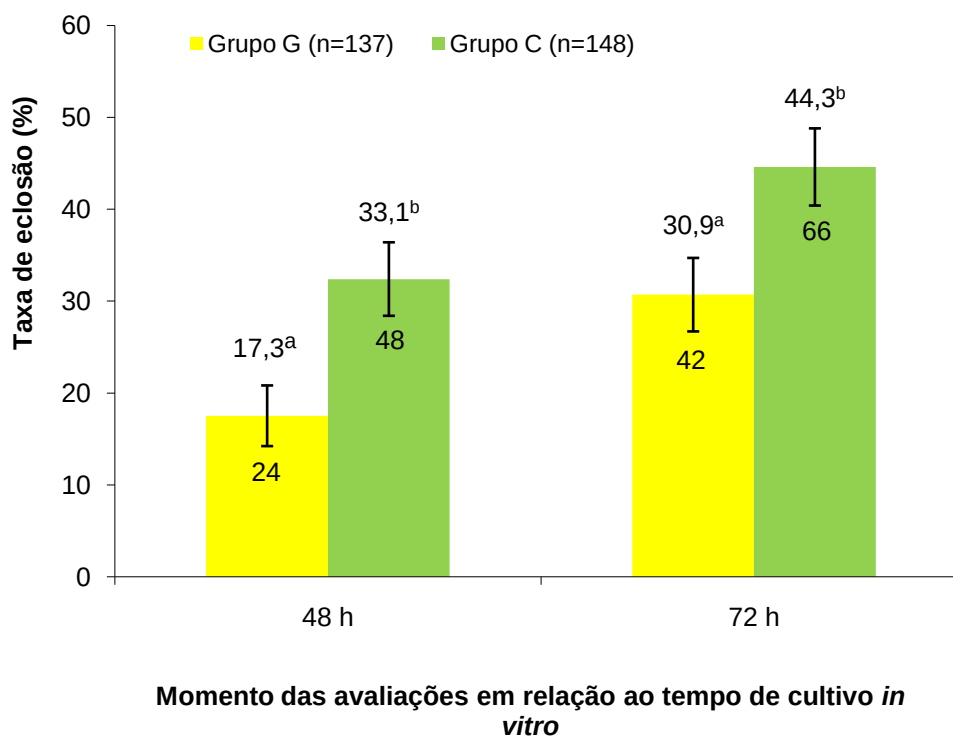


FIGURA 6. Taxa de eclosão (média dos quadrados mínimos $\pm$ EP) dos embriões após a descongelação ou desvitrificação avaliada 48 e 72 h após o início do cultivo *in vitro*, comparando embriões produzidos por animais que receberam suplemento com gordura protegida (G) ou controle (C). A taxa de eclosão foi maior para os embriões provenientes do grupo C em relação à dos embriões produzidos pelo grupo G (^{a,b}Grupos diferem entre si dentro de cada momento de avaliação; $P < 0,05$).

Similarmente, o estágio de desenvolvimento médio dos embriões provenientes do grupo C foi maior em relação ao dos embriões produzidos pelo grupo G, às 48 e 72 h de cultivo *in vitro* (Tabela 8). Entretanto, o diâmetro médio dos embriões do grupo C não diferiu em relação aos do grupo G em nenhum dos dois momentos de avaliação de cultivo (Tabela 8).

TABELA 8. Estágio de desenvolvimento embrionário e diâmetro (média dos quadrados mínimos $\pm$ EP) dos embriões viáveis produzidos por animais que receberam suplemento com gordura protegida (G) ou controle (C) 48 e 72 h após o início do cultivo *in vitro*.

	Grupo G	Grupo C	P
48 h de cultivo <i>in vitro</i> (n)	(n = 56)	(n = 71)	
*Estágio de desenvolvimento embrionário	7,09 $\pm$ 0,11	7,35 $\pm$ 0,12	0,02
Diâmetro embrionário (μ m)	194,5 $\pm$ 11,9	198,7 $\pm$ 12,2	0,73
72 h de cultivo <i>in vitro</i> (n)	(n = 52)	(n = 75)	
*Estágio de desenvolvimento embrionário	7,43 $\pm$ 0,08	7,61 $\pm$ 0,06	0,08
Diâmetro embrionário (μ m)	241,6 $\pm$ 13,4	236,2 $\pm$ 10,7	0,76

*Desenvolvimento embrionário: 4 = mórula; 5 = blastocisto inicial; 6 = blastocisto; 7 = blastocisto expandido e 8 = Blastocisto eclodido.

As taxas de eclosão às 48 e 72 h de cultivo *in vitro*, independentemente do suplemento experimental, foram similares (P = 0,79 e 0,26, respectivamente) para as técnicas de criopreservação de embriões (Figura 7).

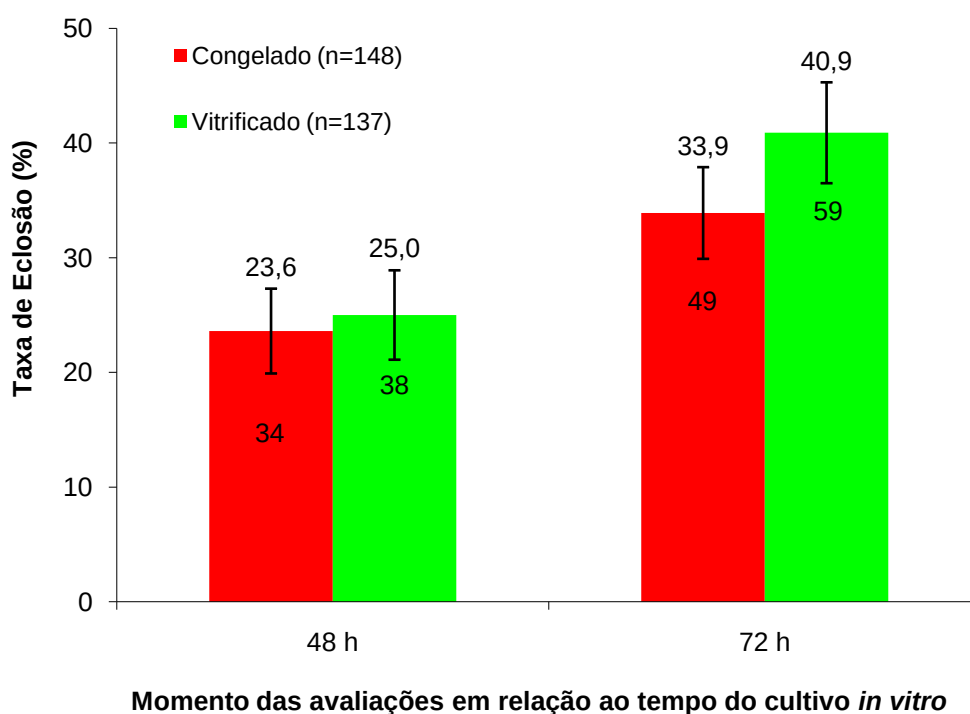


FIGURA 7. Taxa de eclosão (média dos quadrados mínimos $\pm$ EP) dos embriões submetidos à vitrificação/desvitrificação ou congelação/descongelação avaliada 48 e 72 h após o início do cultivo *in vitro*. A taxa de eclosão foi similar para os embriões vitrificados e congelados, independentemente do momento da avaliação do cultivo *in vitro* ($P > 0,10$).

Os tamanhos e estágios de desenvolvimento dos embriões que foram mensurados às 48 e 72 h não apresentaram diferenças quanto a técnica de criopreservação ($P > 0,10$; Tabela 9).

TABELA 9. Estágio de desenvolvimento embrionário e diâmetro (média dos quadrados mínimos $\pm$ EP) dos embriões viáveis após a descongelação ou desvitrificação avaliados 48 e 72 h após o início do cultivo *in vitro*.

	Congelado	Vitrificado	P
48 h de cultivo <i>in vitro</i> (n)	(n = 57)	(n = 70)	
*Estágio de desenvolvimento embrionário	7,20 $\pm$ 0,11	7,24 $\pm$ 0,12	0,71
Diâmetro embrionário (μ m)	191,9 $\pm$ 11,9	201,2 $\pm$ 12,3	0,44
72 h de cultivo <i>in vitro</i> (n)	(n = 61)	(n = 66)	
*Estágio de desenvolvimento embrionário	7,44 $\pm$ 0,07	7,60 $\pm$ 0,07	0,12
Diâmetro embrionário (μ m)	226,7 $\pm$ 11,8	251,0 $\pm$ 12,0	0,15

*Desenvolvimento embrionário: 4 = mórula; 5 = blastocisto inicial; 6 = blastocisto; 7 = blastocisto expandido e 8 = Blastocisto eclodido.

6.5 Concentrações circulantes de IGF-I e insulina

As concentrações plasmáticas médias para IGF-I foram menores para os animais do grupo suplementado com gordura do que para os do grupo controle (374,3 $\pm$ 27,2 vs 483,8 $\pm$ 26,5 ng/mL; $P < 0,0001$), quando os animais estavam com aproximadamente 35 dias do início do experimento. Entretanto, para as concentrações de insulina plasmática aos 24 dias de suplementação dietética não foi encontrada diferença ($P > 0,10$) entre os tratamentos G (4,3 $\pm$ 0,5 μ UI/mL) e C (4,5 $\pm$ 0,5 μ UI/mL).

Na avaliação da correlação entre concentrações plasmáticas de IGF-I ou de insulina com diversas variáveis analisadas, tanto na resposta superovulatória quanto na criotolerância embrionária, não foi possível observar significância para nenhuma destas análises (dados não apresentados).

7. Discussão

7.1 Consumo dos suplementos experimentais

O consumo limitado do suplemento G, provavelmente foi devido a uma menor palatabilidade do produto e pela boa qualidade do pasto, nos primeiros 46 dias de período experimental. Tal fato comprometeu a garantia de ter suplementos isoenergéticos e isoprotéicos entre os grupos, como esperado. Podendo ser uma das explicações do efeito negativo da criotolerância destes embriões do grupo G em relação ao C.

Além disso, a quantidade de Megalac-E ingerida, quando o consumo foi de 379,1 g/cabeça/dia, ao invés de 500,0 g/cabeça/dia (75,8%) foi diminuída passando para 75,8 g/animal/dia, podendo contribuir para menor taxa de eclosão obtida para o grupo G em relação ao C. Estudos avaliando quantidade de Megalac-E bem como tempo de suplementação com gordura protegida devem ser realizados para responder estas questões.

Apesar disso, ECC e peso corporal não difeririam entre os grupos experimentais, conforme é esperado no fornecimento de concentrados isonergéticos e isoprotéicos, concordando com os resultados de Hightshoe et al. (1991), Hawkins et al. (1995), Spicer et al. (1993), Bader et al. (2005), Ambrose et al. (2006), Filley et al. (1999) e Green et al. (2008b) que forneceram suplementos lipídicos.

7.2 Resposta superovulatória, produção e desenvolvimento *in vitro* de embriões

Relativamente, poucos trabalhos avaliaram o efeito dos ácidos graxos na produção e desenvolvimento de embriões produzidos *in vivo* (RYAN et al., 1992; KOJIMA et al., 1997; CERRI et al., 2004; BADER et al., 2005; THANGAVELU et al., 2007; CHILDS et al., 2008b; PETIT et al., 2008). Além disso, não existe um consenso entre os resultados. No presente estudo, se avaliou a influência da gordura protegida, com predominância do ácido linoléico em sua composição, na produção de embriões *in vivo*. Aparentemente, este foi o primeiro estudo com novilhas Nelores superestimuladas, em que o grupo

controle recebeu suplementação próxima à isoenergética e isoprotéica, porém sem adição de nenhum tipo de gordura protegida, ou outro tipo de ácido graxo, ao contrário do que é visto nos artigos encontrados.

O período de suplementação utilizado neste trabalho foi baseado no tempo requerido para que os folículos primários se desenvolvam até o estágio antral (WEBB et al., 2004; BADER et al., 2005) e no tempo de suplementação de, no mínimo, sete semanas para se observar efeito da dieta na qualidade ovocitária/embrionária, sugerido por Thomas & Williams (1996). Além disso, a escolha do tempo de fornecimento dos concentrados no presente estudo baseou-se em outros trabalhos que mostraram a influência de dietas lipídicas na produção embrionária (KOJIMA et al., 1997; CERRI et al., 2004; THANGAVELU et al., 2007; CHILDS et al., 2008b; PETIT et al., 2008).

A similaridade na resposta superestimulatória e na produção de embriões encontrada, no presente estudo, entre os grupos experimentais foi de acordo com a hipótese apresentada. Entretanto, mesmo obtendo-se maiores concentrações circulantes de IGF-I para o grupo C em relação ao G, isto não foi associado ao incremento no número de folículos pequenos no início da aplicação de FSH ou à diferença na produção de embriões para os tratamentos. Isso ocorreu apesar de a insulina e o IGF-I atuarem como potentes estimuladores da proliferação de células da granulosa e da esteroidogênese em bovinos, além de aumentarem a resposta ovariana às gonadotrofinas (WEBB et al., 2004) e número de embriões viáveis produzidos por vacas superovuladas (VELAZQUEZ et al., 2005).

Apesar de as novilhas do grupo C terem consumido maior quantidade de concentrado para se obter suplementos isoenergéticos e isoprotéicos entre os grupos, este fato também não afetou a população folicular na superovulação. Outros estudos demonstraram que a alta ingestão alimentar influenciou positivamente (GUTIERREZ et al., 1997; WEBB et al., 2004) ou negativamente (MOLLO et al., 2007) na população folicular e número de ovulações em fêmeas superovuladas. Por outro lado, BASTOS (2008) não encontrou influência da alta ingestão na resposta superestimulatória em novilhas Nelores, concordando com os resultados do presente estudo. Entretanto, outros estudos mostraram aumento no número de folículos pequenos (3 a 5 mm; BILBY et al., 2006b) ou médios (6 a 9 mm; HIGHTSHOE et al., 1991; LUCY et al., 1991; WEHRMAN et

al., 1991; THOMAS et al., 1997; ROBINSON et al., 2002) ao fornecer dietas lipídicas. Ao contrário dos demais trabalhos, no presente estudo se utilizou um suplemento dietético sem a presença da gordura protegida. Deste modo, comprovou-se que a suplementação lipídica não afetou o número de folículos, nestas condições experimentais.

Corroborando a hipótese inicial, a resposta superestimulatória bem como o número total de estruturas, embriões congeláveis, embriões degenerados e ovócitos não fecundados colhidos não foram diferentes entre os grupos experimentais. Os resultados do presente estudo concordam com os achados de Thangavelu et al. (2007), em que vacas holandesas no pós-parto foram submetidas à dieta com gordura saturada (palmítico e esteárico), linhaça (rica em ácido linolênico) ou semente de girassol (rica em ácido linoléico) e não houve efeito das dietas no número de folículos, total de estruturas colhidas, embriões transferíveis ou taxa de fecundação.

Da mesma forma, estudos recentes (CHILDS et al., 2008b; PETIT et al., 2008) compararam dietas com ácido graxo saturado (controle) ou AGP n-3, isoenergéticas e isoprotéicas, fornecidas a novilhas de corte e vacas holandesas, respectivamente. Nenhum dos trabalhos detectou efeito da suplementação de AGP n-3 no número de ovulações, número total de ovócitos não fecundados e embriões colhidos. No único estudo (RYAN et al., 1992) em que a dieta controle não foi adicionada de gordura, as respostas superestimulatória e superovulatória de novilhas de corte não foram influenciadas pela dieta com óleo de soja (ácido linoléico). Entretanto, ao contrário do resultado do presente estudo em que os animais do grupo C apresentaram maior resposta superovulatória do que do grupo G, Kojima et al. (1997) relataram maior quantidade de CLs para fêmeas suínas suplementadas com uma mistura de ácidos graxos (γ -linoléico, linoléico e oléico), apesar dos ácidos graxos linoléico e linolênico individualmente não terem sido capazes de interferir na resposta superovulatória. Por outro lado, tal resultado para o número de CL do grupo C pode ter sido interferência adicional da primeira repetição experimental e dos animais que não estavam ciclando neste momento.

Adicionalmente, acredita-se que os animais em anestro na primeira repetição poderiam ter tido maior resposta folicular em relação à energia

fornecida pela dieta, independente do tipo do suplemento, e com isso, maior número folículos foram recrutados em relação aos que estavam ciclando. Este resultado, juntamente com a boa qualidade do pasto nos primeiros dias experimentais, pode ter contribuído para melhor resposta superestimulatória e superovulatória das novilhas não cíclicas no primeiro período experimental. Por outro lado, a resposta exagerada ao tratamento superovulatório pode ter comprometido a qualidade dos embriões (SCHERZER et al., 2008), visto no menor número de embriões congeláveis e maior número de embriões degenerados, neste período.

O número de embriões viáveis recuperados no presente estudo se enquadra na média brasileira encontrada para raça Nelore bem como nos trabalhos realizados por nosso laboratório (MOLLO et al., 2007; BASTOS, 2008). Entretanto, os embriões colhidos não foram diferentes entre os grupos experimentais, no que diz respeito à quantidade, qualidade e número de degenerados, concordando com experimentos cujos animais foram alimentados com dietas contendo ácidos graxos linolênico, saturados (THANGAVELU et al., 2007), ácido linoléico (RYAN et al., 1992; BADER et al., 2005; THANGAVELU et al., 2007) ou suplemento ausente de gordura (RYAN et al., 1992).

Resultados contrários ao do presente estudo mostraram efeito da suplementação lipídica na qualidade e quantidade de embriões produzidos *in vivo*. A diminuição de embriões degenerados foi vista ao se suplementar novilhas de corte com dieta contendo ácido linolênico (CHILDS et al., 2008b). Além disso, aumento do número total de embriões (KOJIMA et al., 1997) e de embriões viáveis (KOJIMA et al., 1997; CERRI et al., 2004) foi relatado quando os animais receberam mistura de γ -linoléico, linoléico e oléico (KOJIMA et al., 1997) ou sais de cálcio de ácidos graxos linoléico e *trans* (CERRI et al., 2004). Efeitos negativos da suplementação lipídica foram relatados por Petit et al. (2008) quando adicionaram ácido linolênico à dieta de vacas de leite, observando maior número de embriões degenerados e diminuição dos embriões viáveis.

Ainda não há consenso se os ácidos graxos são mais importantes para o embrião em si ou para sua implantação (PETIT et al., 2008), pois, podem reduzir a síntese ovariana e endometrial de $\text{PGF}_{2\alpha}$, auxiliar o embrião a

produzir interferon τ , bem como alterar o ambiente da tuba uterina e do útero. Esses efeitos contribuem para o desenvolvimento embrionário, redução na morte embrionária e conseqüente estabelecimento da prenhez (BINELLI et al., 2001; MATTOS et al., 2004; CHILDS et al., 2008b). A diminuição na mortalidade embrionária provocada pela alimentação com AGP ocorre pela estimulação da produção de diferentes tipos de prostaglandinas, como das prostaglandinas da série 3, menos potentes para luteólise ou mesmo, redução na sensibilidade do CL à PGF2 α , evitando desta forma, a luteólise (PETIT & TWAGIRAMUNGU, 2006; CHILDS et al., 2008b). Isso sugere que a dieta lipídica provavelmente não possui efeito no desenvolvimento embrionário *per si* (CHILDS et al., 2008b).

Pelos resultados inferiores encontrados para o desenvolvimento *in vitro* de embriões do grupo G após criopreservação em relação aos provenientes de novilhas do grupo C, sugere-se que o efeito positivo do ácido linoléico seja no útero, atrasando a luteólise e permitindo que os embriões consigam fazer o reconhecimento materno-fetal. Deste modo, a expressão gênica uterina e subsequente sobrevivência fetal são necessárias para entender o mecanismo de ação dos AGP.

As taxas de prenhez encontradas em animais suplementados com ácido linoléico após IA e inovulação de embriões reforçam a hipótese da sua atuação no útero, auxiliando em mecanismos anti-luteolíticos. A infusão no abomaso de gordura contendo alta quantidade de ácido linoléico (OLDICK et al., 1997) ou a suplementação com AGP n-6 protegido (CHENG et al., 2001) provocaram menor liberação de PGF2 α em resposta à ocitocina. Lopes et al. (2007) forneceram Megalac-E por 28 dias após IATF e observaram em vacas Nelore taxa de prenhez superiores (56,5%, n = 200) em relação ao grupo não suplementado (45,6%, n = 211; P = 0,015). Posteriormente, este mesmo grupo realizou um experimento com suplementação entre o momento da IA até o diagnóstico de gestação e também obtiveram maior taxa de concepção para vacas que receberam Megalac-E (48,2%, 81/168) em relação às que receberam Megalac (33,9%, 58/177) ou àquelas suplementadas com mineral protéico (26,4%, 63/238; LOPES et al., 2008). Dieta com semente de girassol (rica em linoléico) foi fornecida a vacas Nelore pós-parto (n = 133) do momento

da IA até 22 dias após o protocolo e observou-se aumento de 20,4% na taxa de concepção para vacas que receberam esta dieta (PERES et al., 2008).

Adicionando Megalac-E® à suplementação mineral protéica de receptoras de embrião mestiças (n = 288) do início do protocolo de sincronização até o 52º dia após a inovulação, houve um acréscimo na taxa de concepção de 12% (48,7% vs 36,7%) em relação ao grupo controle (n = 207; RODRIGUES JUNIOR, 2008).

Apesar da proporção mórula:blastocisto ter sido maior para o grupo G em relação ao C, a média do estágio de desenvolvimento por doadora por colheita não se diferenciou entre os tratamentos. Isto sugere que alguns animais do grupo C que tiveram números maiores de embriões em estágios mais avançados possam ter contribuído para esta diferença, sem ser interferência do suplemento fornecido. Por outro lado, no cultivo, observou-se uma predominância de estágios mais avançados para os embriões mensurados às 48 h e maiores taxas de eclosão para embriões provenientes de novilhas suplementadas no grupo C em relação ao G. Tal fato pode estar associado à maior quantidade consumida de concentrado pelo grupo C, o que reflete em concentrações mais elevadas de IGF-I que podem interferir positivamente no desenvolvimento embrionário (BLOCK et al., 2007).

Pelo fato da concentração de insulina não diferir entre os tratamentos, o desenvolvimento embrionário acelerado para o grupo controle pode não ser devido a este hormônio. Entretanto, se houvesse um grupo experimental com animais mantidos somente a pasto, poder-se-ia responder se realmente foi a gordura protegida que provocou este efeito negativo ou se foi o acréscimo do milho que acelerou o desenvolvimento embrionário. Além disso, pelo fato de existir variação na seletividade e consumo individuais entre os animais no pasto, a proporção de ácidos graxos n-3 e n-6 importante nos processos reprodutivos (BADER et al., 2005) pode não ter sido alcançada neste estudo, podendo explicar um desenvolvimento menos acelerado dos embriões do tratamento G. Apesar disso, os ácidos graxos podem ser importantes para que o embrião se desenvolva, o que foi relatado por Cerri et al. (2004) e Thangavelu et al. (2007) através da presença de maior número de blastômeros para embriões oriundos de vacas suplementadas com AGP. No entanto, nestes experimentos, o suplemento controle utilizado possuía a presença de ácido

graxo saturado. Domingues (2008) também mostrou que embriões resultantes de ovócitos colhidos de vacas Nelores alimentadas com canola em grão (rica em AGP) são mais resistentes à vitrificação do que aqueles provenientes de animais que receberam suplemento controle.

Ao se adicionar ácido graxo linoléico ao meio de cultivo de embriões, melhores taxas de sobrevivência após a criopreservação foram obtidas para embriões bovinos. Este efeito do ácido graxo linoléico foi explicado pelo aumento da fluidez da membrana plasmática (nível de insaturação) devido à incorporação do ácido graxo linoléico na membrana embrionária durante o cultivo (HOCHI et al., 1999; TOMINAGA et al., 2000; PEREIRA et al., 2007, 2008). Por outro lado, os resultados do presente estudo comparando a viabilidade embrionária dos grupos G e C após criopreservação, demonstraram que os embriões do grupo G apresentaram menor taxa de eclosão após 48 e 72 h de cultivo *in vitro*. Corroborando estes resultados, Nonogaki et al. (1994) relatam que a exposição de zigotos de camundongos ao ácido linoléico e α -linolênico inibiu o desenvolvimento embrionário *in vitro*. Este fato ocorreu pelo aumento da peroxidação lipídica ou pela estimulação da proteína quinase C, levando a apoptose (YU et al., 2001; EITEL et al., 2003). Os demais trabalhos citam ácido linolênico e saturado como inibidores. Camundongas adultas foram alimentadas por 4 semanas com dieta com baixa quantidade de ácidos graxos n-3 (controle) ou enriquecidas com este ácido graxo (WAKEFIELD et al., 2007). Esse estudo demonstrou que, ovócitos que foram expostos a um ambiente com alto nível AGP n-3 durante a maturação no ovário, tiveram alteração na distribuição de mitocôndrias, nos níveis de cálcio e aumento na produção de espécies reativas de oxigênio. Além disso, os zigotos colhidos de fêmeas alimentadas com n-3 tiveram a aparência morfológica afetada e diminuíram a habilidade de desenvolvimento a blastocisto. Portanto, dieta enriquecida com AGP n-3 pode reduzir o desenvolvimento embrionário devido a defeitos no metabolismo mitocondrial. O fato de a suplementação de ácido linolênico ter reduzido o desenvolvimento embrionário pode estar relacionado à maior maturação do ovócito e também à menor digestibilidade do óleo de linhaça e conseqüente menor consumo de energia, contribuindo para diminuição do número de embriões graus 1 e 2 (PETIT et al., 2008). O desenvolvimento *in vitro* e a taxa de eclosão de blastocistos de camundongos provenientes do

estágio de uma célula foram prejudicados pela adição do ácido palmítico (saturado) em comparação ao ácido oléico (monoinsaturado; QUINN & WHITTINGHAM, 1982). Similarmente, a adição de ácido palmítico ou esteárico durante a maturação ovocitária afetou negativamente a criotolerância dos embriões submetidos à vitrificação (SHEHAB-EL-DEEN et al., 2009). Já outros estudos não encontraram efeito da adição de ácido aracdônico (PEREIRA et al., 2001; MARQUES et al., 2007) ou EPA (MARQUES et al., 2007) durante a maturação ovocitária *in vitro* no subsequente desenvolvimento embrionário. O desenvolvimento dos embriões está relacionado à composição dos ácidos graxos, principalmente, aos fosfolipídios presentes na membrana celular (McEVOY et al., 2000). Mensurações de ácidos graxos diretamente do embrião podem fornecer adicionais explicações para a diferença na criotolerância encontrada para os embriões dos grupos experimentais.

O diâmetro embrionário no cultivo *in vitro* não diferiu entre os grupos G e C, concordando com Green et al. (2008b) que não observaram efeito da suplementação lipídica com AGP n-6 no tamanho dos conceitos colhidos de ovelhas. A menor taxa de eclosão encontrada para embriões provenientes de novilhas que receberam o suplemento G pode estar associada ao estágio de desenvolvimento em que os embriões foram criopreservados, sendo que neste grupo, foram colhidos estágios embrionários menos avançados. O estágio de desenvolvimento embrionário no momento da criopreservação é considerado um fator crítico para a viabilidade dos embriões pós-descongelação e aquecimento. Esta diminuição de viabilidade pode ser causada pela alta sensibilidade a baixas temperaturas dos estágios iniciais de desenvolvimento (DINNYÉS et al., 1996; SOMMERFELD & NIEMANN, 1999). Resultados prévios de nosso laboratório com embriões provenientes de vacas aneloradas superovuladas mostraram que mórulas são menos resistentes ao processo de congelação lenta do que blastocistos quando comparados aos respectivos estágios a fresco (SARTORI et al., 2008). Para embriões ovinos produzidos *in vivo* e congelados, Garcia-Garcia et al. (2006) encontraram maior taxa de sobrevivência para blastocistos (83,7%, n = 43) do que para mórulas (46,3%, n = 41), assim como Cocero et al. (1996) que demonstraram um melhor desenvolvimento embrionário *in vitro* para blastocisto de ovelhas produzidos *in vivo* (70,5%, 31/44) comparado ao estágio de mórula (57,9%, 22/38). Para

embriões produzidos *in vitro* resultados semelhantes são encontrados. Após a vitrificação em OPS de embriões zebuínos provenientes de ovócitos de aspiração folicular *in vivo* (VARAGO et al., 2006) ou congelação em glicerol de embriões bovinos derivados de ovócitos de abatedouro (CARVALHO et al., 1996), os blastocistos expandidos apresentaram melhores taxas de sobrevivência em comparação aos blastocistos ou blastocistos iniciais. O aumento da criotolerância em estágios mais avançados parece estar relacionado a maior número de células e a um menor tamanho celular, o qual melhora a resistência ao resfriamento quando comparado aos estágios iniciais embrionários que possuem poucas e grandes células, e junções fracas entre os blastômeros (DINNYÉS et al., 1996; GARCIA-GARCIA et al., 2006). Além disso, a permeabilidade ao crioprotetor talvez seja menor em embriões em estágios mais recentes (GARCIA-GARCIA et al., 2006). O fato dos blastocistos produzidos *in vivo* possuírem menor número de gotas de lipídeos do que mórulas sugere que isto seja responsável pela menor criotolerância de estágios menos desenvolvidos (ABE et al., 1999). Por outro lado, em bovinos, Peres et al. (2006) observaram maiores taxas de concepção em receptoras inovuladas com mórulas descongeladas quando comparado a blastocistos descongelados. Após vitrificação, Green et al. (2008a) também observaram aumento na taxa de prenhez de ovelhas quando foram inovuladas com embriões vitrificados em estágio mais jovem (64,0% em 25 receptoras vs 44,4% em 18 receptoras). No entanto, estes autores não relataram diferença estatística entre os estágios embrionários congelados quanto à taxa de prenhez de ovelhas, sendo 38,9% (18 receptoras) para mórula e 36,0% (25 receptoras) para blastocisto. Da mesma forma, Cocero et al. (1996), Lopatarova et al. (2002) e Campos-Chillon et al. (2006) relataram similaridade na taxa de sobrevivência embrionária quando inovularam (COCERO et al., 1996) ou cultivaram *in vitro* (LOPATAROVA et al., 2002; CAMPOS-CHILLON et al., 2006) embriões vitrificados em estágios mais recentes ou avançados de desenvolvimento.

7.3 Técnica de criopreservação

Considerando a técnica de criopreservação, semelhantes taxas de eclosão foram obtidas para embriões do grupo vitrificados e congelados cultivo. Van Wagtendonk-de Leeuw et al. (1995), Dattena et al. (2000), Kong et al. (2000), El-Gayar & Holtz (2001), Lopatatova et al. (2002), Papadopoulos et al. (2002), Begin et al. (2003), Cuello et al. (2004), Guignot et al. (2006), Lopatarova et al. (2006), El-Gayar et al. (2008), Green et al. (2008a) também estudaram a criotolerância de embriões produzidos *in vivo* e vitrificados, entretanto poucos trabalhos com bovinos foram relatados (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW et al., 1995; LOPATAROVA et al., 2002; LOPATAROVA et al., 2006). Isso se deve, provavelmente, ao fato dos embriões provenientes da produção *in vitro* serem mais sensíveis aos processos de criopreservação e requererem mais pesquisas. Entretanto, devido às vantagens da vitrificação, como sendo um processo rápido e de baixo custo e principalmente pelos resultados favoráveis encontrados para esta técnica em embriões provenientes de vacas superovuladas, como mostrado no presente estudo, faz-se necessária a padronização das técnicas de vitrificação para utilização em larga escala para este tipo de embriões.

Apesar de não ter havido diferenças no presente estudo quanto à técnica de criopreservação embrionária, a vitrificação ainda parece ser favorável em relação à congelação, baseando em suas vantagens e também nos resultados positivos na literatura. Por exemplo, a taxa de eclosão, avaliada pelo cultivo *in vitro* por 72 h para blastocistos expandidos bovinos produzidos *in vivo* e vitrificados em OPS (29,3%, 11/37) foi maior em relação aos congelados convencionalmente (11,4%, 5/44; LOPATAROVA et al., 2002). Para embriões ovinos produzidos *in vivo* e inovulados pela técnica de transferência direta, maior taxa de prenhez foi obtida para os criopreservados pelo método de vitrificação em OPS do que os congelados (57,1%, 23 receptoras vs 34,8%, 21 receptoras $P = 0,07$; GREEN et al., 2008a). Adicionalmente, embriões vitrificados tiveram maior viabilidade *in vivo* em estágio de mórula em relação aos embriões congelados no mesmo estágio (64,0%, 25 receptoras vs 38,9%, 18 receptoras, $P = 0,07$; GREEN et al., 2008a). Para embriões caprinos, as taxas de prenhez aos 40 dias e sobrevivência foram superiores para os

vitricados em OPS (100%, 14/14 e 64%, 18/28), comparando com embriões congelados (58%, 7/12 e 42%, 10/24; EI-GAYAR & HOLTZ, 2001), respectivamente. Da mesma forma, Guignot et al. (2006) ao transferirem embriões caprinos vitricados com a adição de sucrose ou submetidos à congelação lenta observaram taxa de nascimento maior após a vitrificação (34%, 20/58 vs 21%, 12/58, $P < 0,10$), apesar da taxa de prenhez ter sido semelhante para ambas as técnicas (52%, 15/29 vs 31%, 9/29, respectivamente). Resultados favoráveis para a vitrificação em relação à congelação também são obtidos para embriões bovinos produzidos *in vitro*. Publicações relataram que a taxa de sobrevivência em 24 h de cultivo foi superada por blastocistos bovinos vitricados em relação aos congelados em glicerol (81% vs 62%, DINNYÉS et al., 1995, 1996). Melhores taxas também foram encontradas para embriões humanos na substituição do método tradicional de congelação pela vitrificação (KULESHOVA et al., 2002). Por outro lado, os embriões de ovelhas desenvolvidos *in vitro* foram vitricados (propilenoglicol e glicerol) ou congelados em glicerol e sucrose e posteriormente foi avaliado o seu desenvolvimento *in vitro*. Mórulas e blastocistos congelados (31% e 67%) tiveram maiores taxas de desenvolvimento do que os vitricados (12% e 19%; De PAZ et al., 1994). Silva & Metelo (2005) relacionaram alterações físicas na zona pelúcida com a viabilidade de embriões bovinos produzidos *in vitro* submetidos à congelação lenta ou à vitrificação (utilizando etilenoglicol, ficol e sucrose). Maior viabilidade foi obtida para embriões provenientes do grupo de embriões frescos, seguida dos grupos de embriões congelados e por último, embriões vitricados. As taxas de prenhez de embriões bovinos produzidos *in vivo* vitricados foram avaliadas em receptoras, e não diferiram entre embriões vitricados em OPS ou congelados (LOPATAROVA et al., 2006). Ao se comparar a congelação lenta e a vitrificação com glicerol, embriões bovinos criopreservados por estas duas técnicas se desenvolveram similarmente em receptoras (59%, 20/34 vs 43%, 17/40). Guignot et al. (2006) também não encontraram diferença entre vitrificação em glicerol e etilenoglicol e congelação lenta de embriões provenientes de cabras superovuladas, após a transferência para receptoras, sendo a taxa de prenhez de 69% (18/26) vs 48% (14/29) e a taxa de nascimento, 45% vs 35%, respectivamente. Green et al. (2008a) relataram que

a taxa de prenhez de ovelhas inovuladas com embriões a fresco foi de 50% (50 receptoras), sendo similares às encontradas para embriões congelados (38,6%, 44 receptoras) e vitrificados (55,8%, 43 receptoras). Similarmente, após 72 h de cultivo *in vitro*, as taxas de sobrevivência e eclosão de embriões vitrificados não foram diferentes para o grupo congelado (DINNYÉS et al., 1996). Entretanto, os estudos que avaliaram o desenvolvimento embrionário *in vivo* utilizaram baixo número de receptoras.

A maior resistência dos embriões à técnica de vitrificação está associada às características da OPS em relação às palhetas de 0,25mL utilizadas na congelação, tais como, a redução da espessura da parede da palheta (de 1,7 para 0,8 mm) e do diâmetro interno da OPS de 0,15 para 0,07 mm. Estas características da OPS proporcionam alta taxa de resfriamento, redução do volume de crioprotetor e menor tempo de exposição do embrião à solução de vitrificação e às temperaturas que são sensíveis e conseqüentemente diminuição dos danos celulares em relação à congelação convencional. Por exemplo, através da vitrificação há significativa redução na fratura da zona pelúcida, o que é comum na congelação convencional (LAPATAROVA et al., 2002; BEGIN et al., 2003). A eficácia da vitrificação em OPS também está ligada à desvitrificação dos embriões, em que a reidratação ocorre imediatamente após a imersão na solução de aquecimento. Além disso, a presença do carboidrato não permeável na solução de desvitrificação previne o influxo excessivo de água, já que esta penetra mais rapidamente do que a difusão dos crioprotetores. Assim há redução de danos às membranas e conseqüentemente aumento na sobrevivência embrionária (VAJTA et al., 1998).

Devido à variação nas condições experimentais mostradas nos diversos estudos, há necessidade da otimização da técnica de vitrificação, com intuito de se obter taxas de prenhez semelhantes à dos embriões transferidos a fresco e aplicar esta técnica na rotina do campo, principalmente devido ao baixo custo da mesma. Apesar da técnica de vitrificação necessitar de maior aperfeiçoamento técnico, na área de reprodução assistida, diversos laboratórios substituíram a congelação tradicional pela vitrificação para embriões humanos. Associado a este fato, empresas já desenvolveram

equipamentos e materiais que facilitam a manipulação. Portanto, é uma técnica bastante promissora para criopreservação de embriões bovinos.

7.4 Concentrações circulantes de IGF-I e insulina

Neste estudo, em ambos os grupos experimentais, a categoria animal utilizada foi novilha. Esperava-se, portanto, que estes animais em crescimento tivessem apresentado concentrações plasmáticas similares de GH (dosagem não realizada). Entretanto, pelo fato das novilhas do grupo C terem consumido maior quantidade de concentrado para igualar a energia e proteína do suplemento fornecido ao grupo G, provavelmente apresentavam níveis circulantes de insulina suficientes para manter os GHR ativos. Desta forma, estaria estimulando o fígado a secretar e liberar IGF-I (GUTIERREZ et al., 1997), podendo explicar através deste mecanismo, as maiores concentrações séricas de IGF-I encontradas nos animais do grupo C. Além disso, o grupo G pode ter produzido menos propionato no rúmen, obtendo assim menor estímulo para a produção de IGF-I pelo fígado.

O IGF-I aumenta a capacidade de desenvolvimento embrionário, o que foi observado em embriões produzidos *in vitro* (VELAZQUEZ et al., 2008), sendo uma das possíveis explicações para as melhores taxas de eclosão encontradas no presente experimento para embriões do grupo C tanto com 48 quanto 72 h de cultivo *in vitro*. Entretanto, quando Willemsen et al. (1995) produziram embriões *in vitro* com suplementação de IGF-I no meio de cultivo e avaliaram a viabilidade embrionária *in vitro* pós-vitrificação não observaram efeito deste metabólito na criotolerância. Da mesma forma, a taxa de clivagem, o desenvolvimento *in vitro* e os resultados de prenhez de embriões produzidos *in vitro* sob suplementação de IGF-I e congelados posteriormente, não apresentaram melhora (HERNANDEZ-FONSECA et al., 2002). A falta de efeito positivo pode estar ligada ao número baixo de receptoras utilizado, bem como à baixa concentração de IGF-I no meio de cultivo. Além disso, o IGF-I pode aumentar a taxa de desenvolvimento de embriões bovinos a blastocistos (BLOCK et al., 2007), podendo ser uma das explicações da aceleração no desenvolvimento dos embriões provenientes do grupo C, cujas novilhas apresentaram também maior concentração plasmática de IGF-I.

O consumo de gordura pode provocar alterações no metabolismo, principalmente nos tecidos adiposo e hepático, refletindo em mudanças nos hormônios metabólicos (BECÚ-VILLALOBOS et al., 2007). Tais alterações são influenciadas não somente pelo tipo de gordura suplementado, mas também pelo estado fisiológico e momento do ciclo estral em que o animal se encontra (STAPLES et al., 1998; BECÚ-VILLALOBOS et al., 2007). Deste modo, os trabalhos relatando o efeito dos suplementos lipídicos nas concentrações dos hormônios metabólicos apresentam variação nos resultados. Thomas et al. (1997) relataram aumento na concentração de GH, colesterol e IGF-I intra-folicular nos folículos grandes de vacas de corte que receberam dietas lipídicas isoenergéticas. Childs et al. (2008a), em um estudo comparando diferentes níveis de AGP linolênico em dietas isoprotéicas e isoenergéticas fornecidas por 14 dias antes da sincronização do ciclo estral em novilhas de corte, constataram aumento nas concentrações plasmáticas de IGF-I. Da mesma forma, a dieta composta de ácido graxo linoléico, em comparação às concentrações de dietas controle e rica em linolênico, aumentou a concentração deste metabólito, em vacas de leite (ROBINSON et al., 2002), discordando dos resultados do presente trabalho. Em outros trabalhos, entretanto, a concentração sanguínea de IGF-I não apresentou diferença entre os grupos de vacas que foram submetidas a dietas ricas em ácidos graxos n-9 *cis* (oléico), n-9 *trans*, linoléico ou linolênico (BILBY et al., 2006a). O mesmo foi encontrado em estudo recente, em que Childs et al. (2008b) compararam dietas de ácido saturado e AGP n-3, isoenergéticas e isoprotéicas, fornecidas por 50 dias antes do protocolo de superestimulação para novilhas de corte. Em outro estudo (PONTER et al., 2006a), o tipo de ácido graxo (linoléico ou linolênico) presente na dieta não foi capaz de afetar este metabólito em novilhas de leite. Esta similaridade também foi relatada por Spicer et al. (1993), Bottger et al. (2002), Fouladi-Nashta et al. (2007) e Green et al. (2008b). Entretanto, Becú-Villalobos et al. (2007) descreveram uma queda na concentração sanguínea de IGF-I após suplementação lipídica em vacas de leite.

Alguns trabalhos relatados por Velazquez et al. (2008) perceberam que aumento nas concentrações de IGF-I plasmáticas são correlacionados com as concentrações deste metabólito no fluido folicular. Por outro lado, Bilby et al.

(2006) observaram que as concentrações de IGF-I no sistema reprodutivo podem não estar correlacionadas às concentrações circulantes deste metabólito e que as concentrações de IGF-I total podem ser um valor limitante para prever o número de embriões viáveis (VELAZQUEZ et al., 2008). Deste modo, adicionalmente à dosagem plasmática do IGF-I total (IGF-I livre e IGF-I ligado às proteínas) realizada no presente estudo, mensurações do IGF-I livre no plasma, no líquido folicular, ou mesmo nos órgãos reprodutivos também seriam interessantes para avaliar o efeito do IGF-I no desenvolvimento embrionário e sistema reprodutivo.

Na literatura, o efeito da suplementação de gordura sobre as concentrações de insulina também é contraditório. Aumento foi relatado por Thomas et al. (1997) e Becú-Villalobos et al. (2007) mostraram decréscimo na concentração de insulina sob suplementação lipídica, em vacas de leite. De acordo com os resultados do presente trabalho, Thangavelu et al. (2007) também não encontraram diferença nas concentrações de insulina em vacas que receberam dieta rica em ácido linoléico, linolênico ou saturado, juntamente com Robinson et al. (2002), Ponter et al. (2006a), Fouladi-Nashta et al. (2007), Green et al. (2008b) e Childs et al. (2008b). As concentrações plasmáticas de insulina exibem variação diurna, sendo que as alterações em resposta à dieta são mais agudas em relação ao IGF-I. O fato de não encontrar diferença entre os tratamentos nas concentrações circulantes deste metabólito pode também estar relacionado ao momento da colheita do sangue, que foi realizada anteriormente ao fornecimento dos concentrados.

8. CONCLUSÕES

Nas condições do presente estudo, a hipótese de que o suplemento composto com ácido linoléico na forma de gordura protegida aumenta a tolerância de embriões produzidos *in vivo* submetidos à criopreservação foi negada, pois os animais desse grupo apresentaram menores taxas de eclosão e desenvolvimento embrionário mais retardado em relação ao grupo controle.

A suplementação com gordura protegida também não influenciou na resposta superestimulatória, bem como na qualidade e quantidade de embriões colhidos.

A vitrificação mostrou ser uma técnica alternativa em relação à congelação tradicional, com resultados similares para embriões produzidos em novilhas zebuínas superovuladas.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Baseando-se nos resultados do presente trabalho, em que não foi detectado efeito positivo da suplementação com gordura protegida ruminal na qualidade embrionária, acredita-se que, se houver efeito positivo dos AGP na fertilidade de fêmeas bovinas, este deve ser diretamente no útero, inibindo a resposta luteolítica e contribuindo para a manutenção da prenhez. Desta forma, estudos para avaliar o efeito da suplementação de gordura protegida na expressão gênica embrionária e uterina e no desenvolvimento *in vivo* se mostram necessários para determinar a sua ação. Além disso, a técnica de vitrificação de embriões produzidos *in vivo* é bastante promissora. Por isso o seu aprimoramento, inclusive para realização de transferência direta de embriões bovinos, é de grande importância para a aplicabilidade a campo.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, H.; OTOI, T.; TACHIKAWA, S.; YAMASHITA, S.; SATOH, T.; HOSHI, H. Fine structure of bovine morulae and blastocysts in vivo and in vitro. **Anatomy Embryology**, v.199, p.519-527, 1999.

ADAMIAK, S.J.; MACKIE, K.; EWEN, M.; POWELL, K.A.; WATT, R.G.; ROOKE, J.A.; WEBB, R.; SINCLAIR, K.D. Dietary carbohydrates and lipids affect in vitro embryo production following OPU in heifers. **Reproduction Fertility and Development**, v.16, n.2, p.193-194, 2004. Abstract.

ADAMIAK, S.J.; POWELL, K.; ROOKE, J.A.; WEBB, R.; SINCLAIR, K.D. Body composition, dietary carbohydrates and fatty acids determine post-fertilisation development of bovine oocytes in vitro. **Reproduction**, v.131, p.247-258, 2006.

AHMAD, N.; SCHRICK, F.N.; BUTCHER, R.L.; INSKEEP, E.K. Effect of persistent follicles on early embryonic losses in beef cows. **Biology of Reproduction**, v.52, p.1129-1135, 1995.

AMBROSE, D.J.; KASTELIC, J.P.; CORBETT, R.; PITNEY, P.A.; PETIT, H.V.; SMALL, J.A.; ZALKOVIC, P. Lower pregnancy losses in lactating dairy cows fed a diet enriched in α -linolenic acid. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.3066–3074, 2006.

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

BADER, J.F.; KOJIMA, F.N.; WEHRMAN, M.E.; LINDSEY, B.R.; KERLEY, M.S.; PATTERSON, D.J. Effects of prepartum lipid supplementation on FSH superstimulation and transferable embryo recovery in multiparous beef cows. **Animal Reproduction Science**, v.85, p.61-70, 2005.

BAGLEY, C.P. Nutritional management of replacement beef heifers: a review. **Journal of Animal Science**, v.71, p.3155-3163, 1993.

BARIL, G.; TRALDI, A.L.; COGNIE, Y.; LEBOEUF, B.; BECKERS, J.F.; MERMILLO, D.P. Successful direct transfer of vitrified sheep embryos. **Theriogenology**, v.56, p.299–305, 2001.

BARROS, C.M.; NOGUEIRA, M.F.G. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v.56, p.1463-1496, 2001.

BARUSELLI, P.S.; SÁ FILHO, M.F.; MARTINS, C.M.; NASSER, L.F.; NOGUEIRA, M.F.G.; BARROS, C.M.; BÓ, G.A. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v.65, p.77-88, 2006.

BASTOS, M.R. **Influência da ingestão de matéria seca e da condição corporal na produção *in vivo* de embriões bovinos**. 2008. 170f. Dissertação

(Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu.

BEGIN, I.; BHATIA, B.; BALDASSARRE, H.; DINNYES, A.; KEERFER, C.L. Cryopreservation of goat oocytes and in vivo derived 2- to 4-cell surface vitrification (SSV) methods. **Theriogenology**, v.59, p.1839-1850, 2003.

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

BILBY, T. R.; SOZZI, A.M.M.; SILVESTRE, F.T.; EALY, A.D.; STAPLES, C. R.; THATCHER, W.W. Pregnancy, bovine somatotropin, and dietary n-3 fatty acids in lactating dairy cows: I. ovarian, conceptus, and growth hormone–insulin-like growth factor system responses. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.3360-3374, 2006b.

BINELLI, M.; THATCHER, W.W.; MATTOS, R.; BARUSELLI, P.S. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. **Theriogenology**, v.56, p.1451-1463, 2001.

BLOCK, J.; FISCHER-BROWN, A.E.; RODINA, T.M.; EALY, A.D.; HANSEN, P.J. The effect of in vitro treatment of bovine embryos with IGF-I on subsequent development in utero to Day 14 of gestation. **Theriogenology**, v.68, p.153-161, 2007.

BLOCK, S.S.; SMITH, J.M.; EHRHARDT, R.A.; DIAZ, M.C.; RHOADS, R.P.; VAN AMBURGH, M.E.; BOISCLAIR, Y.R. Nutritional and developmental regulation of plasma leptin in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.3206-3214, 2003.

BÓ, G.A.; GUERRERO, D.C.; ADAMS, G.P. Alternative approaches to setting up donor cows for superstimulation. **Theriogenology**, v.69, p.81–87, 2008.

BOTTGER, J.D.; HESS, B.W.; ALEXANDER, B.M.; HIXON, D.L.; WOODARD, L.F.; FUNSTON, R.N.; HALLFORD, D.M.; MOSS, G.E. Effects of supplementation with high linoleic or oleic cracked safflower seeds on postpartum reproduction and calf performance of primiparous beef heifers. **Journal of Animal Science**, v.80, p.2023-2030, 2002.

CAMPOS-CHILLON, L.F.; WALKER, D.J.; De la TORRE-SANCHEZ, J.F.; SEIDEL Jr, G.E. In vitro assessment of a direct transfer vitrification procedure for bovine embryos. **Theriogenology**, v.65, p.1200-1214, 2006.

CARVALHO, R.V.; DEL CAMPO, M.R.; PALASZ, A.T.; PLANTE, Y.; MAPLETOFT, R.J. Survival rates and sex ratio of bovine IVF embryos frozen at different developmental stages on day 7. **Theriogenology**, v.45, p.489-498, 1996.

CERRI, R.L.A.; BRUNO, R.G.S; CHEBEL, R.C.; GALVÃO, K.N.; RUTGLIANO, H.; JUCHEM, S.O.; THATCHER, W.W.; LUCHINI, D.; SANTOS, J.E.P. Effect of fat sources differing in fatty acid profile on fertilisation rate and embryo quality in lactating dairy cows. **Journal of Animal Science**, v.82, suppl.1, p.586, 2004. Abstract.

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

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

CHILDS, S.; CARTER, F.; LYNCH, C.O.; SREENAN, J.M.; LONERGAN, P.; HENNESSY, A.A.; KENNY, D.A. Embryo yield and quality following dietary supplementation of beef heifers with n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA). **Theriogenology**, v. 70, p. 992-1003, 2008b.

CHILDS S.; LYNCH, C.O.; HENNESSY, A.A.; STANTON, C.; WATHES, D. C.; SREENAN, J.M.; DISKIN, M.G.; KENNY, D.A. Effect of dietary enrichment with either n-3 or n-6 fatty acids on systemic metabolite and hormone concentration and ovarian function in heifers. **Animal**, v.2, n.6, p.883-893, 2008c.

CLANDININ, M.T.; CHEEMA; FIELD, C.J.; GARG, T.M.L.; VENKATRAMAN, J; CLANDININ; T.R. Dietary fat: exogenous determination of membrane structure and cell function. **The FASEB Journal**, v.5, p.2761-2769, 1991.

COCERO, M.J.; LOPEZ SEBASTIAN, A.; BARRAGAN, M.L.; PICAZO, R.A. Differences on post-thawing survival between ovine morulae and blastocysts cryopreserved with ethylene glycol or glycerol. **Cryobiology**, v.33, p.502-507, 1996.

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

COYNE, G.S.; KENNY, D.A.; CHILDS, S.; SREENAN, J.M.; WATERS, S.M. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids alter the expression of genes involved in prostaglandin biosynthesis in the bovine uterus. **Theriogenology**, v.70, p.772-782, 2008.

CUELLO, C.; BERTHELOT, F.; MARTINAT-BOTTE, F.; GUILLOUET, P.; FURSTOSS, V.; BOISSEAU, C.; MANCEAU, P.; LOCATELLI, A.; MARTÍNEZ, E.A. Transfer of vitrified blastocysts from one or two superovulated Large White

Hyperprolific donors to Meishan recipients: reproductive parameters at Day 30 of pregnancy. **Theriogenology**, v.61, p.843–850, 2004.

DARVELID, U.; GUSTAFSSON, H.; SHAMSUDDIN, M.; LARSSON, B.; RODRIGUEZ MARTINEZ, H. Survival rate and ultrastructure of vitrified bovine in vitro and in vivo developed embryos. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.35, n.4, p.417-426, 1994. Abstract.

DATTENA, M.; PTAK, G.; LOI, P.; CAPPAL, P. Survival and viability of vitrified in vitro and in vivo produced ovine Blastocysts. **Theriogenology**, v.53, p.1511-1519, 2000.

De PAZ, P.; SANCHEZ, A.J.; FERNANDEZ, J.G.; CARBAJO, M.; DOMINGUEZ, J.C.; CHAMORO, C.A.; ANEL, L. Sheep embryo cryopreservation by vitrification and convencional freezing. **Theriogenology**, v.42, p.327-338, 1994.

DINNYÉS, A.; CAROLAN, C.; LONERGAN, P.; MASSIP, A.; MERMILLOD, P. Survival of frozen or vitrified bovine blastocysts produced in vitro in synthetic oviduct fluid. **Theriogenology**, v.46, p.1425-1439, 1996.

DINNYÉS, A.; CAROLAN, C.; LONERGAN, P.; SOLT, L.; MASSIP, A.; MERMILLOD, P. In vitro survival of in vitro produced (ivp) bovine embryos frozen or vitrified by techniques suitable for direct transfer. **Theriogenology**, v.43, n.1, p.197, 1995. Abstract.

DOBRINSKY, J.R. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. **Theriogenology**, v.57, p.285-302, 2002.

DOMINGUES, M.C.N. Viabilidade de embriões vitrificados resultantes da fertilização *in vitro* de oócitos de vacas suplementadas com canola em grão. 2008. 66f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá.

DOREAU, M.; CHILLIARD, Y. Digestion and metabolism of dietary fat in farm animals. **British Journal of Nutrition**, v.78, suppl., p.15-35, 1997.

EITEL, K.; STAIGER, H.; RIEGER, J.; MISCHAK, H.; BRANDHORST, H.; BRENDL, M.D.; BRETZEL, R.G.; HÄRING, H.U.; KELLERER, M. Protein Kinase C activation and translocation to the nucleus are required for fatty acid-induced apoptosis of insulinsecreting cells. **Diabetes**, v.52, p.991–997, 2003.

EL-GAYAR, M.; HOLTZ, W. Technical note: Vitrification of goat embryos by the open pulled-straw method. **Journal of Animal Science**, v.79, p.2436-2438, 2001.

EL-GAYAR, M.; GAULY, M.; HOLTZ, W. Contents lists One-step dilution of open-pulled-straw (OPS)-vitrified mouse blastocysts in sucrose-free medium. **Cryobiology**, v.57, p.191–194, 2008.

FAIR, T.P.; LONERGAN, P.; DINNYES, A.; COTTELL, D.C; HYTTEL, P.; WARD, F.A.; BOLAND, M.P. Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: effect of method of blastocyst production. **Molecular Reproduction and Development**, v.58, p.186-195, 2001.

FERGUSON, J.D.; SKLAN, D.; CHALUPA, W.V.; KRONFELD D.S. Effects 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.

FILLEY, S.J.; TURNER, H. A.; STORMSHAK, F. Prostaglandin F2 α concentrations, fatty acid profiles, and fertility in lipid-infused postpartum beef heifers. **Biology of Reproduction**, v.61, p.1317-1323, 1999.

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

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

GARCIA-BOJALIL, C.M.; STAPLES, C.R.; RISCO, C.A.; SAVIO, J.D.; THATCHER, W.W. 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.

GÓMEZ, E.; MUÑOZ, M.; RODRÍGUEZ, A.; CAAMAÑO, J.N.; FACAL, N.; DÍEZ, C. Vitrification of bovine blastocysts produced in vitro inflicts selective damage to the inner cell mass. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p.194-199, 2009.

GREEN, R.E; SANTOS, B.F.S.; SICHERLE, C.C.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; BICUDO, S.D. Viability of ops vitrified sheep embryos after direct transfer. **Reproduction in Domestic Animals**. v.44, n.3, p.406-410, 2008a.

GREEN, M.P.; SPATE, L.D.; PARK, T.E.; KIMURA, K.; MURPHY, C.N.; WILLIAMS, J.E.; KERLEY, M.S.; GREEN, J.A.; KEISLER, D.H.; ROBERTS, R.M. Nutritional skewing of conceptus sex in sheep: effects of a maternal diet enriched in rumen-protected polyunsaturated fatty acids (PUFA). **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.6, n.21, 2008b. doi:10.1186/1477-7827-6-21.

GREEN, R.E. **Viabilidade de embriões ovinos vitrificados ou congelados submetidos às técnicas direta e indireta de inovulação**. 2007. 60f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu.

GUIGNOT, F.; BOUTTIER, A.; BARIL, G.; SALVETTI, P.; PIGNON, P.; BECKERS, J.F.; TOUZÉ, J.L.; COGNIÉ, J.; TRALDI, A.S.; COGNIÉ, Y.; MERMILLO, P. Improved vitrification method allowing direct transfer of goat embryos. **Theriogenology**, v.66, p.1004–1011, 2006.

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

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

HAWKINS, D.E.; NISWENDER, K.D.; OSS, G.M.; MOELLER, C.L.; ODDER, K.G.; SAWYER, H.R.; NISWENDER, G.D. 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.

HERNANDEZ-FONSECA, H.J.; SIRISATHIEN, S.; BOSCH, P.; CHO, H.S.; LOTT, J.D.; HAWKINS, L.L.; HOLLET, R.B.; COLEY, S.L.; BRACKETT, B.G. Offspring resulting from direct transfer of cryopreserved bovine embryos produced in vitro in chemically defined media. **Animal Reproduction Science**, v.69, p.151-158, 2002.

HIGHTSHOE, R.B.; COCHRAN, R.C.; CORAH, L.R.; KIRACOFE, G.H.; HARMON, D.L.; PERRY, R.C. Effects of calcium soaps of fatty acids on postpartum reproductive function in beef cows. **Journal of Animal Science**, v.69, p.4097-4103, 1991.

HOCHI, S.; KIMURA, K.; HANADA, A. Effect of linoleic acid-albumin in the culture medium on freezing sensitivity of in vitro-produced bovine morulae. **Theriogenology**, v.52, p.497–504, 1999.

HOMA, S.T.; BROWN, C.A. Changes in linoleic acid during follicular development and inhibition of spontaneous breakdown of germinal vesicles in cumulus-free bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.94, n.1, p.153-160, 1992.

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

KANE, M.T. Fatty Acids as energy sources for culture of one-cell rabbit ova to viable morulae. **Biology of Reproduction**, v.20, p.323-332, 1979.

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

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, T.; IWASAKI, T.; ZENIYA, Y.; YOSHINO, J.; TOTSUKAWA, K. Effect of dietary administration with linoleic acid and α -tocopherol on freezing tolerance in porcine embryos. **Journal of Reproduction and Development**, v.42, n.1, p.67-72, 1996.

KOJIMA, T.; ZENIYA, Y.; AOYAMA, T.; KONDO, A.; YOSHINO, J. Dietary administration of fatty acids-enriched mold dried cell containing γ -linolenic acid to female pigs improves ovulation rate and embryo quality in summer. **Journal of Reproduction and Development**, v.43, n.2, p.121-127, 1997.

KONG, L.K.; LEE, S.I.; CHO, S.G.; CHO, S.K.; PARK, S.K. Comparison of open pulled straw (OPS) vs glass micropipette (GMP) vitrification in mouse blastocysts. **Theriogenology**, v.53, p.1817-1826, 2000.

KUBOW, S.; KOSKI, K.G. Maternal dietary glucose-lipid interactions modulate embryological development in vivo and in embryo culture. **Biology of Reproduction**, v.52, p.145-155, 1995.

KULESHOVA, L.L.; LOPATA, A. Vitrification can be more favorable than slow cooling. **Fertility and Sterility**, v.78, n.3, p.449, 2002.

LAMMOGLIA, M.A.; BELLOWES, R.A.; GRINGS, E.E.; BERGMAN, J.W. Effects of prepartum supplementary fat and muscle hypertrophy genotype on cold tolerance in newborn calves. **Journal of Animal Science**, v.77, p.2227-2233, 1999.

LAZAR, L.; SPAK, J.; DAVID, V. The vitrification of in vitro fertilized cow blastocysts by the open pulled straw method. **Theriogenology**, v.54, p.571-578, 2000.

LEMLEY, C.O.; BUTLER, S.T.; BUTLER, W.R.; WILSON, M.E. Short communication: insulin alters hepatic progesterone catabolic enzymes cytochrome p450 2c and 3a in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.91, p.641-645, 2008.

LEROY, J.L.M.R.; VAN SOOM, A.; OPSOMER, G.; GOOVAERTS, I.G.F.; BOLS, P.E.J. Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? Part II Mechanisms linking nutrition and reduced oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v.43, n.5, p. 623-632, 2008.

LEWIS, G.S.; THATCHER, W.W.; BAZER, F.W.; CURL, J.S. Metabolism of arachidonic acid in vitro by bovine blastocysts and endometrium. **Biology of Reproduction**, v.27, p.431-439, 1982.

LEWIS, I.M.; LANE, M.W.; VAJTA, G. Pregnancy rates following transfer of in vitro produced bovine embryos vitrified by the open pulled straw (ops) method. **Theriogenology**, v.51, n.1, p.168, 1999. Abstract.

LOPATAROVA, M.; CECHE, S.; HAVLÍČEK, V.; HOLÝ, L. Effect of vitrification in open pulled straws on survival of bovine embryos from superovulated cows. **Acta Veterinaria Brunensis**, v.71, p.93-99, 2002.

LOPATAROVA, M.; CECHE, S.; HOLÝ, L.; DOLEZEL, R. The effect of vitrification in open pulled straws on pregnancy rates after transfer of in vivo produced bovine embryos. **Veterinarni Medicina**, v.51, n.9, p.454-460, 2006.

LOPES, C.N.; VASCONCELOS, J.L.M.; ARAÚJO, T.P.B.; OLIVEIRA, L.O.F. Effect of supplementation with Megalac-E on pregnancy rate in primiparous Nelore cows. In: ANNUAL MEETING AMERICAN DAIRY SCIENCE ASSOCIATION, 2007, San Antonio. **Abstracts...**San Antonio, 2007, v.90, p.531.

LOPES, C.N.; ZILIOTI, C.; ARAÚJO, T.; RAINNER, A.; RODRIGUES JUNIOR, M. M.; PERES, R.F.G.; CLARO JUNIOR, I.; SÁ FILHO, O.G.; VASCONCELOS, J.L.M. Efeito do tratamento do Megalac e Megalac-E na taxa de prenhez em vacas Nelore pós-parto submetidas a IATF. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.36, suppl.2, p.616, 2008. Abstract.

LUCY, M.C.; STAPLES, C.R.; MICHEL, F.M.; THATCHER, W.W. Effect of feeding calcium soaps to early postpartum dairy cows on plasma prostaglandin F_{2α}, luteinizing hormone, and follicular growth. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.483-489, 1991.

Manual de transferência e micromanipulação de embriões nas espécies bovina e eqüina. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2008. 261p.

MAPLETOFT, R.J. Bovine embryo transfer. **Reviews in Veterinary Medicine, I.V.I.S.**, In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF BOVINE PRACTITIONERS (AABP), 2006.

MARQUES, C.C.; BAPTISTA, M.C.; VASQUES, M.I.; HORTA, A.E.M.; PEREIRA, R.M. Effect of polyunsaturated fatty acids (PUFA) on bovine oocyte in vitro maturation and subsequent embryo development and freezability. **Reproduction in Domestic Animals**, v.109, suppl.2, p.116, 2007.

MASSIP, A. Cryopreservation of Embryos of Farm Animals. **Reproduction in Domestic Animals**, v.36, p.49-55, 2001.

MATTOS, R.; GUZELOGLU, A.; BADINGA, L.; STAPLES, C.R.; THATCHER, W.W. Polyunsaturated fatty acids and bovine interferon- γ modify phorbol ester-induced secretion of prostaglandin f2a and expression of prostaglandin endoperoxide synthase-2 and phospholipase-a2 in bovine endometrial cells. **Biology of Reproduction**, v.69, p.780-787, 2003.

MATTOS, R.; STAPLES, C.R.; ARTECH, A.; WILTBANK, M.C.; DIAZ, F.J.; JENKINS, T.C.; THATCHER, W.W. The effects of feeding fish oil on uterine secretion of PGF_{2α}, milk composition, and metabolic status of periparturient Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.921-932, 2004.

McEVOY, T.G.; COULL, G.D.; BROADBENT, P.J.; HUTCHINSON, J.S.M.; SPEAKE, B.K. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.118, p.163-170, 2000.

MENEZO, Y.; RENARD, J.; DELOBEL, B.; PAGEAUX, J. Kinetic study of fatty acid composition of day 7 to day 14 cow embryos. **Biology of Reproduction**, v.26, p.787-790, 1982.

MILLER JUNIOR, R.R.; CORNETT, C.L.; WATERHOUSE, K.E.; FARSTAD, W. Comparative aspects of sperm membrane fatty acid composition in silver (*Vulpes vulpes*) and blue (*Alopex lagopus*) foxes, and their relationship to cell cryopreservation. **Cryobiology**, v.51, p.66-75, 2005.

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

MONTEIRO, F.M.; MELO, D.S.; FERREIRA, M.M.G.; CARVALHO, L.C.; SARTORELI E SARTORELI, E.; EDERHARDT, B.G.; NOGUEIRA, G.P.; BARROS, C.M. LH surge in Nelore cows (*Bos indicus*), after induced estrus or after ovarian superstimulation. **Animal Reproduction Science**, v.110, p.128-138, 2009.

NELDER, J.A.; WEDDERBURN, R.W.M Generalized Linear Models. **Journal of the Royal Statistical Society Series A**, v.135, p.370-384, 1972.

NONOGAKI, T.; NODA, Y.; GOTO, Y.; KISHI, J.; MORI, T. Developmental blockage of mouse embryos caused by fatty acids. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.11, n.9, 1994.

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

PALASZ, A.T.; MAPLETOFT, R.J. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. **Biotechnology Advances**, v.14, n.2, p.127-149, 1996.

PAPADOPOULOS, S.; RIZOS, D.; DUFFY, P.; WADE, M.; QUINN, K.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Embryo survival and recipient pregnancy rates after transfer of fresh or vitrified, in vivo or in vitro produced ovine blastocysts. **Animal Reproduction Science**, v.74, p.35-44, 2002.

PEREIRA, R.M.; BAPTISTA, M.C.; VASQUES, M.I.; HORTA, A.E.M.; PORTUGAL, P.V.; BESSA, R.J.B.; CHAGAS e SILVA, J.; SILVA PEREIRA, M.; MARQUES, C. C. Cryosurvival of bovine blastocysts is enhanced by culture with trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid (10t,12c CLA). **Reproduction Science**, v.98, p.293-301, 2007.

PEREIRA, R.M.; MARQUES, C.C.; BAPTISTA, M.C.; VASQUES, M.I.; HORTA, A.E.M. Efeito do ácido araquidônico (aa) no desenvolvimento de embriões em cocultura com células placentárias. In: CONGRESSO IBÉRICO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 3., 2001, Porto. **Proceedings...**Porto: Exponor, 2001. p.587-594.

PEREIRA, R.M.; CARVALHAIS, I.; PIMENTA, J.; BAPTISTA, M.C.; VASQUES, M.I.; HORTA, A.E.M.; SANTOS, I.C.; MARQUES, M.R.; REIS, A.; SILVA PEREIRA, M.; MARQUES, C.C. Biopsied and vitrified bovine embryos viability is improved by trans10, cis12 conjugated linoleic acid supplementation during in vitro embryo culture. **Animal Reproduction Science**, v.106, p.322-332, 2008.

PERES, I.C.; PINCINATO, D.; TRIBULO, R.; CUTAIA, L.; BÓ, G.A. Fatores que afetam a taxa de prenhez em programas de transferência de embriões em tempo fixo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.34, supl.1, p.518, 2006. Resumo.

PERES, M.S.; SANTOS, P.G.; ANDRIGHETTO, C.; PEREIRA, F.T.V.; FONSECA, R.; ASSIS NETO, A.C.; MACHADO, R.; MADUREIRA, E.H.; BINELLI, M.; BERTAN, C.M. Efeito da semente de girassol na taxa de concepção de vacas Nelore no período pós-parto. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.36, p.639, suppl.2, 2008. Resumo.

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

PETIT, H.V.; DEWHURST, R.J.; SCOLLAN, N.D.; PROULX, J.G.; KHALID, M.; HARESIGN, W.; TWAGIRAMUNGU, H.; MANN, G.E. Milk production and composition, ovarian function and prostaglandin secretion of dairy cows fed omega-3 fats. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.889-899, 2002.

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

PICCINATO, C.A.; SARTORI, R.; SANGRISTAVONG, S.; SOUZA, A.H.; GRUMMER, R.R.; LUCHINI, D.; WILTBANK, M.C. In vitro and in vivo analysis of fatty acid effects on metabolism of 17 β -estradiol and progesterone in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 2009. No prelo.

PONTER, A.; ARNAULT, J.; JOLY, C.; GUELOU, K.; VALY, G.; PONCHON, S.; GONZALES, C.; GRIMARD, B.; HUMBLLOT, P. Effect of the type of dietary fatty acid (α -linolenic acid or linoleic acid) on the number and the quality of oocytes

collected by ovum pickup and on in vitro embryo production by dairy heifers. **Reproduction, Fertility and Development**, v.19, n.1, p. 244-244, 2006a.

PONTER, A.A.; PARASY, A.E.; SAADÉ, M.; MIALOT, J.P.; FICHEUX, C.; PONTER, C.D.; GRIMARD, B. Effect of a supplement rich in linolenic acid added to the diet of post partum dairy cows on ovarian follicle growth, and milk and plasma fatty acid compositions. **Reproduction Nutrition Development**, v.46, p.19-29, 2006b.

PTAK, G.; DATTENA, M.; LOI, P.; TISCHNER, M.; CAPPAL, P. Ovum pick-up in sheep: efficiency of in vitro embryo production, vitrification and birth of offspring. **Theriogenology**, v.52, p.1105-1114, 1999.

QUINN, P.; WHITTINGHAM, D.G. Effects of fatty acids on fertilization and development of mouse embryos in vitro. **Journal of Andrology**, v.3, p.440-443, 1982.

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

ROBINSON, R.S.; PUSHPAKUMARA P.G.A.; CHENG, Z.; PETERS, A.R.; ABAYASEKARA, D.R.E.; WATHES, D.C. Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on ovarian and uterine function in lactating dairy cows. **Reproduction**, v.124, p.119-131, 2002.

RODRIGUES JUNIOR, M.M. Efeito da suplementação mineral protéica com Megalac-E[®] na taxa de prenhez em receptoras de embrião. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.36, suppl.2, p. 612, 2008. Resumo.

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-stimulation hormone. **Journal of Animal Science**, v.70, p.3505-3513, 1992.

SARTORI, R.; MACHADO, G.M.; GUARDIEIRO, M.M. ; BASTOS, M.R.; LEME, L.O.; SIQUEIRA FILHO, E.; RUMPF, R.; DODE, M.A.N. In vitro development of in vivo produced embryos frozen at morula or blastocyst stages. In: Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, 2008, Denver. **Reproduction Fertility and Development**, v.20, p.135, 2008.

SARTORI, R.; DODE, M.A.N.; RUMPF, R. Produção *in vivo* e *in vitro* de embriões bovinos. In: Pires, A.V. Bovinocultura de corte. 1 ed. Piracicaba. Fealq, 2009. No prelo.

SARTORI, R.; SOUZA, A.H.; PICCINATO, C.A.; SANGSRITAVONG, S.; LUCHINI, D.; GRUMMER, R.R.; WILTBANK, M.C. Effects of intra-abomasal infusion of linseed oil on steroid metabolism in dairy cows. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15., 2004, Porto Seguro.

Abstracts... Porto Seguro, 2004. v.2, p.331.

SCHERZER, J.; FAYRER-HOSKEN, R.A.; RAY, L.; HURLEY, D.J.; HEUSNER, G.L. Review article advancements in large animal embryo transfer and related biotechnologies. **Reproduction in Domestic Animals**, v.43, p.371-376, 2008.

SCHOLLJEGERDES, E.J.; LAKE, S.L.; WESTON, T.R.; RULE, D.C.; MOSS, G.E; NETT, T.M.; HESS, B.W. Fatty acid composition of plasma, medial basal hypothalamus, and uterine tissue in primiparous beef cows fed high-linoleate safflower seeds. **Journal of Animal Science**, v.85, p.1555-1564, 2007.

SCOTT, T.A.; SHAVER, R.D.; ZEPEDA, L.; YANDELL, B.; SMITH T.R. Effects of rumen-inert fat on lactation, reproduction, and health of high producing Holstein herds. **Journal of Dairy Science**, v.78, p.2435-2451, 1995.

SEIDEL Jr, G.E. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. **Theriogenology**, v.65, p.228-235, 2006.

SENGER, P.L. **Pathways to pregnancy and parturition**. Pullman: Current Conceptions, 1999. 281p.

SHEHAB-EL-DEEN, M.A.; LEROY, J.L.M.R.; MAES, D.; SOOM, A.V. Cryotolerance of bovine blastocysts is affected by oocyte maturation in media containing palmitic or stearic acid. **Reproduction in Domestic Animals**, v.44, p.140-142, 2009.

SILVA, F.M.; METELO, R. Relation between physical properties of the zona pellucida and viability of bovine embryos after slow-freezing and vitrification. **Reproduction in Domestic Animals**, v.40, p.205-209, 2005.

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.

SOMMERFELD, V.; NIEMANN, H. Cryopreservation of bovine in vitro produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. **Cryobiology**, v.38, p.95-105, 1999.

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

SOUZA, A.H.; SARTORI, R.; GUENTHER, J.N.; CARAVIELLO, D.; MONSON, R.; WILTBANK, M.C. Effect of semen source and dose of FSH on superovulatory response and embryo production in Holstein heifers. **Animal Reproduction**, v.4, n.3/4, p.70-76, 2007.

SPICER, L.J.; VERNON, R.K.; TUCKERP, W.E.; WEITEMANN, R.P.; HOGUE, J.F.; ADAMS, G.D. Effects of inert fat on energy balance, plasma

concentrations of hormones, and reproduction in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.2664-2673, 1993.

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.

STAPLES, C.R.; WILTBANK, M.C.; GRUMMER, R.R.; GUENTHER, J.N.; SARTORI, R.; DIAZ, F.J.; BERTICS, S.; MATTOS, R.; THATCHER, W.W. Effect of long chain fatty acids on lactation performance and reproductive tissues of Holstein cows. **Journal Dairy Science**, v.83, p.278, 2000. Abstract.

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

THATCHER, W.; JENKINS, T. Feeding fatty acids for fertility? In: ANNUAL FLORIDA RUMINANT NUTRITION SYMPOSIUM, 13., 2002, Florida. **Proceedings...**Florida, 2002, n.13, p.71.

THOMAS, M.G.; BAO, B.; WILLIAM, G.L. Dietary fats varying in their fatty acid composition differentially influence follicular growth in cows fed isoenergetic diets. **Journal of Animal Science**, v.75, p.2512-2519, 1997.

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

TOMINAGA, K.; HAMADA, Y.; YABUUE, T.; ARIYOSHI, T. Effect of linoleic acid-albumin on post-thaw survival of in vitro-produced bovine embryos at the 16-cell stage. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v.62, n.4, p.465-467, 2000.

VAJTA, G.; BOOTH, P.J.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Successful vitrification of early stage bovine in vitro produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. **Cryo-Letters**, v.18, p.191-195, 1997.

VAJTA, G.; HOLM, P.; KUWAYAMA, J.P.; BOOTH, P.J.; JACOBSEN, H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.51, p.53-58, 1998.

VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A.M.; DEN DAAS, J.H.G.; KRUIP, T.H.A.M.; RALL, W.F. Comparison of the efficacy of conventional slow freezing and rapid cryopreservation methods for bovine embryos. **Cryobiology**, v.32, p.157-167, 1995.

VARAGO, F.C.; SALIBA, W.P.; ALVIM, M.T.T.; VASCONCELOS, A.B.; OLIVEIRA, C.H.; STAHLBERG, R.; LAGARES, M.A. Vitrification of in vitro produced Zebu embryos. **Animal Reproduction**, v.3, n.3, p.353-358, 2006.

VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A. A produção de embriões bovinos no Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, supl.3, p.915-918, 2007.

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

WAKEFIELD, S.L.; LANE, M.; SCHULZ, S.J.; HEBART, M.L.; THOMPSON, J.G.; MITCHELL, M. Maternal supply of omega 3 polyunsaturated fatty acids alter mechanisms involved in oocyte and early embryo development in the mouse. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**, v.294, n.2, p.425-434, 2007.

WALTER, B.M.T.; SAMPAIO, A.B. **A vegetação da fazenda Sucupira**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998. 110p.

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

WEHRMAN, M.E.; WELSH JUNIOR, T.H.; WILLIAMS, G.L. Diet-induced hyperlipidemia in cattle modifies the intrafollicular cholesterol environment, modulates ovarian follicular dynamics, and hastens the onset of postpartum luteal activity. **Biology of Reproduction**, v.45, p.514-522, 1991.

WILLEMSSEN, D.; PALMA, G.A.; WOLF, E. Vitrification of in-vitro produced bovine embryos after culture in medium supplemented with insulin-like growth factor-I (IGFI). **Theriogenology**, v.43, p.352, 1995. Abstract.

YAO, H.T.; CHANG, Y.W.; LAN, S.J.; CHEN, C.T.; HSU, J.T.A.; YEH, T.K. The inhibitory effect of polyunsaturated fatty acids on human CYP enzymes. **Life Sciences**, v.79, p.2432-2440, 2006.

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

YU, H.Y.; INOBUCHI, T.; KAKIMOTO, M.; NAKASHIMA, N.; IMAMURA, M.; HASHIMOTO, T.; UMEDA, F.; NAWATA, H. Saturated non-esterified fatty acids stimulate de novo diacylglycerol synthesis and protein kinase C activity in cultured aortic smooth muscle cells. **Diabetologia**, v.44, p.614-620, 2001. Abstract.

ZANENGA, C.A. Freezing on zebu embryos - Development and viability. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 10., 1993, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte, 1993. p.125-130.

ZERON, Y.; OCHERETNY, A.; KEDAR, O.; BOROCHOV, A.; SKLAN, D.; ARAV, A. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. **Reproduction**, v.121, p.447-454, 2001.

ZERON, Y.; PEARL, M.; BOROCHOV, A.; ARAV, A. Kinetic and temporal factors influence chilling injury to germinal vesicle and mature bovine oocytes. **Cryobiology**, v.38, p.35-42, 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, n.2, p.271-278, 2002.

Trabalho enviado à revista PESQUISA AGROPECUÁRIA BRASILEIRA

Função ovariana em novilhas Nelore suplementadas com gordura protegida ruminal

5 Monique Mendes Guardieiro⁽¹⁾, Michele Ricieri Bastos⁽¹⁾, Gerson Barreto Mourão⁽²⁾, Luiz
Henrique Dantas Carrijo⁽³⁾, Rodolfo Rumpf⁽⁴⁾ e Roberto Sartori^(1,2)

⁽¹⁾Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Distrito de
Rubião Júnior, s/nº, CEP 186018-000, Botucatu-SP, Brasil. E-mail:
10 moniqueguardieiro@yahoo.com.br, michelerbastos@hotmail.com ⁽²⁾Universidade de São
Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, CEP 13418-900, Caixa Postal 09,
Piracicaba, SP, Brasil. E-mail: gbmourao@esalq.usp.br, sartori@esalq.usp.br ⁽³⁾Integral
Nutrição Animal, Rodovia GO-070, Km 8,3, CEP 74477-228, Goiânia, GO. E-mail:
carrijo@integralprodubon.com.br ⁽⁴⁾Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Caixa
15 Postal 02372, CEP 70770-900, Brasília-DF, Brasil. E-mail: rodolfo@cenargen.embrapa.br

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação alimentar com gordura
protegida nas estruturas ovarianas e concentração sérica de progesterona em novilhas Nelore
20 mantidas a pasto. Quarenta novilhas foram divididas em dois grupos (G = concentrado com
gordura protegida ruminal [Megalac-E[®]] e C = controle, sem gordura) em um delineamento
“cross-over”. Os suplementos eram isoenergéticos e isoprotéicos. Após 15 dias de
suplementação, os animais foram submetidos a um protocolo para avaliar a influência da
suplementação com gordura no metabolismo de progesterona (D0: inserção de CIDR[®] e
25 aplicação im de PGF2 α ; D7: retirada do CIDR[®] e aplicação de PGF2 α). Onze dias após, uma

nova aplicação de PGF2 α foi feita, além da realização diária de observações de estro e de exames ultra-sonográficos ovarianos. Sangue foi colhido 4 dias após a inserção do dispositivo intravaginal de progesterona e 7 e 14 dias após ovulação para dosagem de progesterona. Não houve diferença ($P>0,07$) entre os grupos G e C, para as concentrações séricas de progesterona nos 3 dias avaliados, nem no maior diâmetro do folículo ovulatório ou no volume luteal. Portanto, suplementação com 100 g/d de gordura protegida não alterou a função ovariana ou o metabolismo de progesterona em novilhas zebuínas a pasto.

Termos para indexação: ácidos graxos, folículo, corpo lúteo, progesterona, *Bos indicus*.

Ovarian function in Nellore heifers supplemented with rumen-protected fat

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of rumen-protected fat supplementation with on ovarian structures and serum progesterone concentration in Nellore heifers kept in pasture. Forty heifers were divided into two groups (G = concentrate with rumen-protected fat [Megalac-E[®]] and C = control, without fat) in a cross-over design. The supplements were formulated to be isocaloric and isoproteic. After 15 days of feeding, the animals were submitted the a protocol to evaluate the influence of fat supplementation on progesterone metabolism (D0: insertion of CIDR[®] and im injection of PGF2 α ; D7: CIDR[®] removal and injection of PGF2 α). Eleven days later, heifers were again treated with PGF2 α and daily estrus observations and ovarian ultrasound exams were performed. Blood samples were collected 4 days after the insertion of the intravaginal progesterone releasing device and 7 and 14 days following ovulation for progesterone assay. There was no difference ($P>0,07$) between G and C groups for serum progesterone concentration at all three time points that evaluation was done. The greatest diameter of the ovulatory follicle and CL volume was also

similar between groups. Therefore, supplementation with 100 g/d of protected fat did not alter ovarian function or progesterone metabolism in zebu heifers kept in pasture.

Index terms: fatty acids, follicle, corpus luteum, progesterone, *Bos indicus*.

5

Introdução

A suplementação de gordura é uma prática comum para aumentar a densidade energética da dieta, principalmente em gado de leite. Entretanto, além de fornecer calorias, a gordura possui efeito direto na reprodução através da ação dos ácidos graxos presentes em sua composição (Funston, 2004; Raes et al., 2004), elevando a fertilidade em muitas situações.

10 Nos ovários, há relatos de efeito dos ácidos graxos sobre o número e tamanho de folículos ovarianos (Lucy et al., 1991; Staples et al., 2000; Robinson et al., 2002; Bilby et al., 2006), tamanho do corpo lúteo (CL; Kojima et al., 1997, Bilby et al., 2006) e na qualidade ovocitária (Kim et al., 2001; Zeron et al., 2002). Além disso, outros estudos também observaram influência de dietas contendo ácidos graxos sobre a qualidade embrionária (Kojima et al.,

15 1997; Childs et al., 2008a; Cerri et al., 2009) e concentração circulante de prostaglandina e hormônios esteróides (Ryan et al., 1992; Thomas et al., 1997, Petit et al., 2002; Childs et al., 2008b). Neste último caso, a causa da associação observada entre suplementação com lipídeos e maiores concentrações circulantes de hormônios esteróides relatada por diversos autores, não está bem definida. Especula-se que pode ser através da ação de ácidos graxos

20 poliinsaturados (AGP), aumentando pulsatilidade de LH (Hightshoe et al., 1991), com um conseqüente aumento no tamanho do folículo pré-ovulatório e subseqüente CL (Raes et al., 2004), ou pela diminuição do metabolismo hepático desses hormônios (Hawkins et al., 1995). Outra possibilidade seria atuando como substrato para o colesterol, precursor da síntese de esteróides (Thomas et al., 1997) ou mesmo alterando a síntese de prostaglandina (Petit &

25 Twagiramungu, 2006; Childs et al., 2008a).

A teoria da diminuição do metabolismo dos esteróides é atualmente uma das mais discutidas para explicar as maiores concentrações de esteróides na suplementação lipídica. Hawkins et al. (1995) avaliaram o mecanismo pelo qual a inclusão de gordura na dieta aumenta a concentração de progesterona circulante, através do fornecimento de sais de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa, iniciando 100 dias antes do parto. A concentração de progesterona foi maior para novilhas de corte mantidas nesta dieta, porém as concentrações luteais de progesterona foram similares entre os grupos, sugerindo que não houve diferença na taxa de secreção de progesterona. Por outro lado, o tempo requerido para a queda pela metade das concentrações circulantes de progesterona, após ovariectomia, foi maior nas novilhas suplementadas com gordura. Os autores sugeriram, então, que em vacas alimentadas com dieta rica em lipídios, o fator principal relacionado ao aumento das concentrações circulantes de progesterona seria redução no *clearance* hepático. Adicionalmente, Piccinato et al. (2009) observaram *in vitro* que ácidos graxos com cadeias de carbono de diferentes comprimentos diminuíram o metabolismo de esteróides. Entretanto, esses resultados não foram corroborados por um experimento subsequente realizado *in vivo*, através de infusão de óleo de linhaça no abomaso. Por outro lado, ainda não foi realizado um estudo de maneira precisa para calcular o fluxo sanguíneo hepático nestas condições experimentais.

Devido às diferenças na ingestão de matéria seca e no nível de produção de leite, os resultados das pesquisas com gado de leite não são necessariamente aplicáveis aos animais para produção de carne (Funston, 2004; Raes et al., 2004). Neste sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da suplementação de novilhas Nelore com gordura protegida no tamanho folicular, volume luteal e nas concentrações séricas de progesterona.

Material e Métodos

O experimento foi realizado na Estação Experimental da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, localizada em Brasília-DF (15°52' a 15°56'S e 48°00' a 48°02' W), com altitudes que variam de 1050 a 1250 m (Walter & Sampaio, 1998), entre os meses de fevereiro e julho de 2008. Os protocolos de experimentação utilizados estavam de acordo com as regras do Comitê de Ética na Experimentação com Animais da Universidade Estadual Paulista e foram aprovados sob o número 19/2007 - CEEA.

Quarenta novilhas da raça Nelore não lactantes com idade entre 24 e 36 meses foram utilizadas em um experimento tipo “cross-over” com duas repetições e intervalo de 66 dias entre o início de cada repetição. Todos os animais foram submetidos a avaliações ultrasonográficas ovarianas semanais desde o início do experimento para acompanhamento de ciclicidade (presença de CL em pelo menos uma de duas avaliações consecutivas). Estas avaliações ultra-sonográficas foram realizadas por um único operador, utilizando um aparelho de ultra-som em tempo real (Aloka SSD-500 V; Aloka Co., Tóquio, Japão) com transdutor linear trans-retal de 7,5 MHz.

Ao início do experimento, os animais foram divididos, aleatoriamente, em dois grupos experimentais: C = Controle e G = Suplementação com gordura protegida ruminal e mantidos em sistema de pastejo com *Brachiaria decumbens* e água à vontade. Nesse momento inicial, os animais dos grupos C e G apresentavam peso de $356,1 \pm 7,8$ Kg e $361,7 \pm 7,4$ Kg e ECC médios (escala de 1 a 5; Houghton et al., 1990) de $2,86 \pm 0,03$ e $2,96 \pm 0,05$, respectivamente. Além disso, ao início da primeira repetição havia oito e sete fêmeas em anestro para os grupos G e C, respectivamente. Ao início da segunda repetição, sete e oito novilhas estavam anovulatórias para estes grupos experimentais.

Os suplementos foram oferecidos uma vez ao dia em cochos cobertos coletivos respeitando a relação de 50 cm de cocho por animal, totalizando 50 dias de fornecimento para

cada repetição. Dezesesseis dias após a primeira repetição, iniciou-se a segunda repetição e os tratamentos foram invertidos, ou seja, os animais do grupo C passaram para o grupo G e vice-versa. Os animais foram manejados em sistema de rodízio em seis piquetes de 5 ha, e para eliminar o efeito de piquete, a rotação dos animais nos piquetes foi realizada baseando-se no período de crescimento da forrageira. A taxa de lotação (unidade animal/ha) para ambos os grupos experimentais foi de 3,2 UA/ha.

Os dois suplementos experimentais foram formulados para atender os requerimentos de manutenção para novilhas em crescimento. O suplemento G foi formulado para fornecer 100 g de Megalac-E[®] (Arm & Hammer, Rio de Janeiro, Brasil)/cabeça/dia, gordura “by pass” derivada de óleo de soja que possui predominância de ácido linoléico em sua composição, acrescido de 400 g de concentrado, totalizando 500 g. O suplemento C foi formulado para fornecer 800 g de concentrado. Dessa forma, os suplementos experimentais seriam isoenergéticos e isoprotéicos. No entanto, devido a problemas de consumo total diário do suplemento G, o qual se manteve com 75,8%, enquanto que o C foi de 96,2% do esperado na primeira repetição do estudo, para a segunda, adicionou-se 100 g de milho moído por cabeça/dia a cada um dos tratamentos, com o propósito de elevar a palatabilidade. Tal alteração resultou em um fornecimento diário de 900 g de concentrado/cabeça/dia para o grupo C e 600 g concentrado/cabeça/dia para o G.

Após a adição do milho moído, o consumo aumentou e manteve-se bem próximo do desejado, com 95,7% no grupo G e 98,0% no grupo C e mesmo após a alteração, os suplementos continuaram isoenergéticos e isoprotéicos. O consumo foi estimado através da pesagem diária da sobra do cocho.

A porcentagem relativa dos ingredientes utilizados para cada suplemento experimental se encontra na Tabela 1.

Durante o experimento foram realizadas avaliações semanais de ECC e mensais do peso corporal dos animais para monitoramento do efeito dos suplementos no estado físico das fêmeas.

Quinze dias após o início do fornecimento dos suplementos experimentais, todos os
5 animais receberam um dispositivo intravaginal de liberação de progesterona (1,9 g de progesterona natural, CIDR[®], Pfizer, Hamilton, Nova Zelândia) e uma aplicação i.m. de 25 mg de PGF2 α (Dinoprost Trometamina, Lutalyse[®], Pfizer, Paulínia, Brasil), com o propósito de obter novilhas com concentrações circulantes de progesterona advindas exclusivamente do CIDR[®]. Sete dias após, o dispositivo intravaginal foi retirado e as novilhas receberam outro
10 tratamento com PGF2 α . Onze dias após, uma nova aplicação de PGF2 α foi feita e a partir deste dia foram realizadas observações de estro quatro vezes ao dia, com duração de uma hora em cada período (00:00 h, 06:00 h, 12:00 h, 18:00 h) e exames ultra-sonográficos diários para acompanhamento do desenvolvimento folicular até confirmação da ovulação. Além disso, foram obtidas mensurações ultra-sonográficas do diâmetro do folículo pré-ovulatório e do
15 volume luteal 7 e 14 dias após a ovulação. O cálculo do volume luteal foi realizado conforme descrito por Sartori et al. (2002).

Colheitas de sangue foram realizadas através de punção da veia jugular em tubos sem anticoagulante nos seguintes períodos: 4 dias após a inserção do dispositivo intravaginal de progesterona a fim de detectar um possível efeito da gordura no metabolismo da progesterona
20 e 7 e 14 dias após a ovulação subsequente ao terceiro tratamento com PGF2 α para dosagem da concentração sérica de progesterona. Após a colheita, o sangue foi mantido por 4 h em temperatura ambiente e depois permaneceu à temperatura de 4°C por 24 h. As amostras foram então, centrifugadas a 1529 x g por 15 min para obtenção do soro. Em seguida, foram armazenadas a -20°C para posterior análise.

A dosagem de progesterona foi realizada em duplicatas através de radioimunoensaio (Coat-a-count Progesterone[®]) conforme indicação do fabricante e obteve-se um coeficiente de variação intra-ensaio de 9,1%. A sensibilidade do ensaio foi de 0,02 ng/mL.

Na análise estatística, as variáveis peso corporal, ECC, tamanho do folículo ovulatório, volume luteal e concentrações séricas de progesterona 7 e 14 dias após ovulação foram analisadas com um modelo que incluiu efeito aleatório de novilha, considerando a matriz de correlação auto-regressiva de primeira ordem devido às medidas repetidas, assim como os efeitos fixos tratamento (G e C) e período (1 e 2), com o uso do procedimento MIXED do SAS. Além disso, o efeito ciclicidade dentro de período foi incluído no modelo para a variável concentração sérica de progesterona 4 dias após a inserção do dispositivo intravaginal de progesterona.

Resultados e Discussão

Apesar de os animais terem ganhado peso durante o experimento, não houve diferença entre os tratamentos em relação ao peso e ECC médios das novilhas durante todo o período experimental ($P > 0,10$). Tal resultado era esperado, já que os animais dos dois grupos experimentais receberam suplementos isoenergéticos e isoprotéicos.

Com relação à avaliação indireta da influência da suplementação com gordura protegida ruminal no metabolismo de hormônios esteróides, não foi possível detectar diferença ($P > 0,07$) nas concentrações séricas de progesterona 4 dias após a inserção do dispositivo intravaginal de progesterona e aplicação de PGF2 α entre os grupos G ($3,4 \pm 0,3$ ng/mL) e C ($2,8 \pm 0,3$ ng/mL). Esses resultados devem ser analisados com cautela e mais experimentos devem ser desenvolvidos, para produzir subsídios científicos suficientes e convincentes para refutar definitivamente a hipótese de que a suplementação com gordura protegida ruminal reduz o metabolismo hepático de hormônios esteróides.

Apesar de terem sido realizados 80 protocolos de sincronização com PGF2 α , a taxa de detecção de estro foi de 30% (12/40) para o grupo G e de 22,5% (9/40) para o grupo C, enquanto que a taxa de ovulação representou 45% (18/40) e 50% (20/40), para os respectivos grupos experimentais, sendo que todas as novilhas que manifestaram estro, ovularam. Essas baixas taxas de detecção de estro podem ter sido devido a diversos fatores. O primeiro deles, foi o insucesso total em se induzir ciclicidade nas novilhas pré-púberes com o uso do dispositivo intravaginal de progesterona novo por 7 dias. Logo, era de se esperar que pelo menos 30 dos 80 animais submetidos ao protocolo de sincronização não teriam resposta satisfatória. Além disso, outros estudos em Nelore também obtiveram baixos índices de detecção de estro após sincronização (Figueiredo et al., 1997; Pinheiro et al., 1998). Deve-se considerar também que as novilhas foram submetidas a um manejo intensivo para avaliações ultra-sonográficas e colheitas sanguíneas e tais fatores estressantes podem ter influenciado negativamente na expressão de estro e subsequente ovulação (Dobson et al., 2001).

O tamanho do folículo ovulatório, o volume luteal 7 e 14 dias após a ovulação, bem como as concentrações séricas de progesterona não diferiram entre os animais que receberam suplementação G ou C (Tabela 2). Contrariamente a esses resultados, outros estudos detectaram aumento do diâmetro do folículo dominante em vacas de leite que receberam dieta rica em AGP (Staples et al., 2000; Robinson et al., 2002). Da mesma forma, maior folículo pré-ovulatório também foi relatado em vacas de leite que receberam ácido linolênico (Ambrose et al., 2006; Bilby et al., 2006) e linoléico (Bilby et al., 2006) em relação a grupos controle. Para novilhas de corte submetidas a dietas isoenergéticas e isoprotéicas ricas em lipídios (óleo de soja), apesar de não terem tido as concentrações de estradiol do fluido folicular afetadas, apresentaram maiores concentrações de progesterona e aumento da capacidade da granulosa em produzir progesterona (Ryan et al., 1992) em relação ao grupo que foi alimentado com dieta sem a adição de gordura.

Uma das razões a ser considerada pela ausência de efeito da suplementação com gordura nas variáveis reprodutivas analisadas neste estudo poderia ser o fornecimento insuficiente de Megalac-E para as novilhas (100 g/d). Entretanto, estudos recentes em que também foi oferecido 100 g/d de Megalac-E para vacas Nelore lactantes a pasto, observaram incremento na fertilidade destes animais em programas de inseminação artificial em tempo fixo em relação a grupos controle (Lopes et al., 2007; 2008).

Concordando com nossos resultados, suplementação com dieta rica em ácido linoléico ou linolênico não alterou o tamanho do folículo dominante (Ambrose et al., 2006), o diâmetro e a taxa de crescimento do folículo pré-ovulatório (Childs et al., 2008b), e o tamanho do CL e a concentração plasmática de progesterona (Ambrose et al., 2006; Childs et al., 2008b). Vacas leiteiras alimentadas com sais de cálcio de ácidos graxos linoléico e trans também apresentaram diâmetros similares do folículo pré-ovulatório e luteal, em comparação aos animais que receberam óleo de palma (Cerri et al., 2009). Da mesma forma, os suplementos lipídicos enriquecidos com ácidos graxos n-9 cis (18:1c, oléico), n-9 trans (18:1t), n-6 (18:2, linoléico, Megalac-R) ou n-3 (18:3, linolênico) não interferiram nas concentrações circulantes de progesterona (Bilby et al., 2006).

Pelo fato de não ter havido diferença entre os grupos experimentais para as variáveis analisadas neste estudo e que outros trabalhos utilizando suplementação similar obtiveram incremento na fertilidade de vacas Nelore (Lopes et al., 2007, 2008), acredita-se que os AGP atuem de forma positiva na fertilidade por outro mecanismo, seja através da ação direta nos embriões; no útero, inibindo a resposta luteolítica e contribuindo para a manutenção da prenhez (Petit & Twagiramungu, 2006; Childs et al., 2008a) ou mesmo na expressão gênica uterina e embrionária. Desta forma, estudos para avaliar o efeito da suplementação de gordura protegida na qualidade embrionária, na expressão gênica embrionária e uterina e no

desenvolvimento embrionário *in vivo* se mostram necessários para determinar a sua ação em animais zebuínos.

Conclusão

1. A suplementação com 100 g/d de gordura protegida aparentemente não afeta as concentrações circulantes de progesterona em fêmeas zebuínas a pasto.

2. Esta suplementação também não é capaz de alterar o tamanho do folículo ovulatório e o volume luteal em novilhas Nelore.

Agradecimentos

À Fapesp, pela bolsa de estudos concedida a Monique Mendes Guardieiro e às empresas (Arm & Hammer, Integral Nutrição Animal e Pfizer Saúde Animal) pela doação dos produtos para realização do experimento.

Referências

AMBROSE, D.J., KASTELIC, J.P.; CORBETT, R.; PITNEY, P.A.; PETIT, H.V.; SMALL, J.A., ZALKOVIC, P. Lower pregnancy losses in lactating dairy cows fed a diet enriched in α -linolenic acid. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.3066-3074, 2006.

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

CERRI, R.L.A.; JUCHEM, S.O.; CHEBEL, R.C.; RUTIGLIANO, H.; BRUNO, R.G.S.; GALVÃO, K.N.; THATCHER, W.W.; SANTOS, J.E.P. Effect of fat source differing in fatty

acid profile on metabolic parameters, fertilization, and embryo quality in high-producing dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.1520-1531, 2009.

CHILDS, S.; CARTER, F.; LYNCH, C.O.; SREENAN, J.M.; LONERGAN, P.; HENNESSY, A.A.; KENNY, D.A. Embryo yield and quality following dietary
5 supplementation of beef heifers with n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA). **Theriogenology**, v. 70, p. 992-1003, 2008a.

CHILDS, S.; LYNCH, C.O.; HENNESSY, A.A.; STANTON, C.; WATHES, D. C.; SREENAN, J.M.; DISKIN, M.G.; KENNY, D.A. Effect of dietary enrichment with either n-3 or n-6 fatty acids on systemic metabolite and hormone concentration and ovarian function in
10 heifers. **Animal**, v.2, n.6, p.883-893, 2008b.

DOBSON, H.; TEBBLE, J.E.; SMITH, R.F.; WARD, W.R. Is stress really all that important? **Theriogenology**, v.55, p.65-73, 2001.

FIGUEIREDO, R.A.; BARROS, C.M.; PINHEIRO, O.L.; SOLER, J.M. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v.47, p.1489-1505, 1997.

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

HAWKINS, D.E.; NISWENDER, K.D.; OSS, G.M.; MOELLER, C.L.; ODDER, K.G.; SAWYER, H.R.; NISWENDER, G.D. An increase in serum lipids increases luteal lipid content and alters the disappearance rate of progesterone in cows. **Journal of Animal
20 Science**, v.73, p. 541-545, 1995.

HIGHTSHOE, R.B.; COCHRAN, R.C.; CORAH, L.R.; KIRACOFE, G.H.; HARMON, D.L.; PERRY, R.C. Effects of calcium soaps of fatty acids on postpartum reproductive function in beef cows. **Journal of Animal Science**, v.69, p.4097-4103, 1991.

- HOUGHTON, P.L.; LEMENAGER, R.P.; HENDRIX, K.S.; MOSS, G.E.; STEWART, T.S. Effects of body composition, pre- and postpartum energy intake and stage of production of energy utilization by beef cows. **Journal of Animal Science**, v.68, p.1447-1456, 1990.
- KIM, M.; KINOSHITA, J.Y. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed
 5 immature and in vitro matured bovine oocytes. **Reproduction**, v.122, p.131-138, 2001.
- KOJIMA, T.; ZENIYA, Y.; AOYAMA, T.; KONDO, A.; YOSHINO, J. Dietary administration of fatty acids-enriched mold dried cell containing γ -linolenic acid to female pigs improves ovulation rate and embryo quality in summer. **Journal of Reproduction and Development**, v.43, n.2, p.121-127, 1997.
- 10 LOPES, C.N.; VASCONCELOS, J.L.M.; ARAUJO, T.P.B.; OLIVEIRA, L.O.F. Effect of supplementation with Megalac-E on pregnancy rate in primiparous Nelore cows. In: ANNUAL MEETING AMERICAN DAIRY SCIENCE ASSOCIATION, 2007, San Antonio. **Abstracts...**San Antonio, 2007, v.90, p.531.
- LOPES, C.N.; ZILIOTI, C.; ARAÚJO, T.; RAINNER, A.; RODRIGUES JUNIOR, M. M.;
 15 PERES, R.F.G.; CLARO JUNIOR, I.; SÁ FILHO, O.G.; VASCONCELOS, J.L.M. Efeito do tratamento do Megalac e Megalac-E na taxa de prenhez em vacas Nelore pós-parto submetidas a IATF. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.36, suppl.2, p.616, 2008. Rsumo.
- LUCY, M.C.; STAPLES, C.R.; MICHEL, F.M.; THATCHER, W.W. Effect of feeding calcium soaps to early postpartum dairy cows on plasma prostaglandin $F_{2\alpha}$, luteinizing
 20 hormone, and follicular growth. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.483-489, 1991.
- PETIT, H.V.; DEWHURST, R.J.; SCOLLAN, N.D.; PROULX, J.G.; KHALID, M.; HARESIGN, W.; TWAGIRAMUNGU, H.; MANN, G.E. Milk production and composition, ovarian function and prostaglandin secretion of dairy cows fed omega-3 fats. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.889-899, 2002.

- PETIT, H.V.; TWAGIRAMUNGU, H. Conception rate and reproductive function of dairy cows fed different fat sources. **Theriogenology**, v.66, p.1316-1324, 2006.
- PICCINATO, C.A.; SARTORI, R.; SANGRISTAVONG, S.; SOUZA, A.H.; GRUMMER, R.R.; LUCHINI, D.; WILTBANK, M.C. In vitro and in vivo analysis of fatty acid effects on metabolism of 17 β -estradiol and progesterone in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 2009. No prelo.
- PINHEIRO, O.L.; BARROS, C.M.; FIGUEIREDO, R.A.; DO VALLE, E.R.; ENCARNACÃO, R.O.; PADOVANI, C.R. Estrous behavior and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F2 alpha or norgestomet and estradiol valerate. **Theriogenology**, v.49, p.667-681, 1998.
- RAES, K.; DE SMET, S.; DEMEYER, D. Effect of dietary fatty acids on incorporation of long chain polyunsaturated fatty acids and conjugated linoleic acid in lamb, beef and pork meat: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v.113, p.199-221, 2004.
- ROBINSON, R.S.; PUSHPAKUMARA P.G.A.; CHENG, Z.; PETERS, A.R.; ABAYASEKARA, D.R.E.; WATHES, D.C. Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on ovarian and uterine function in lactating dairy cows. **Reproduction**, v.124, p.119-131, 2002.
- RYAN, D.P.; SPOON, R.A.; WILLIAMS, G.L. Ovarian follicular characteristics, embryo recovery, and embryo viability in heifers fed high-fat diets and treated with follicle-stimulation hormone. **Journal of Animal Science**, v.70, p.3505-3513, 1992.
- SARTORI, R.; ROSA, G.J.M.; WILTBANK, M.C. Ovarian structures and circulating steroids in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.2813-2822, 2002.
- STAPLES, C.R.; WILTBANK, M.C.; GRUMMER, R.R.; GUENTHER, J.N.; SARTORI, R.; DIAZ, F.J.; BERTICS, S.; MATTOS, R.; THATCHER, W.W. Effect of long chain fatty acids

on lactation performance and reproductive tissues of Holstein cows. **Journal Dairy Science**, v.83, p.278, 2000. Abstract.

THOMAS, M.G.; BAO, B.; WILLIAM, G.L. Dietary fats varying in their fatty acid composition differentially influence follicular growth in cows fed isoenergetic diets. **Journal of Animal Science**, v.75, p.2512-2519, 1997.

WALTER, B.M.T.; SAMPAIO, A.B. **A vegetação da fazenda Sucupira**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998. 110p.

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, n.2, p.271-278, 2002.

Tabela 1. Porcentagem relativa dos ingredientes utilizados na composição dos suplementos experimentais com gordura protegida ruminal (G) e controle (C) para novilhas Nelore.

Componentes	Grupo G (% relativa)	Grupo C (% relativa)
Fosfato bicálcico	12,5	7,8
Carbonato de cálcio	-(*)	2,5
Sulfato de cálcio	1,0	0,6
Flor de enxofre	0,8	0,5
Iodato de cálcio	0,006	0,004
Óxido de magnésio	0,8	0,5
Sulfato de zinco	0,2	0,1
Sulfato ferroso	0,08	0,05
Sulfato de manganês	0,1	0,06
Sulfato de cobre	0,1	0,09
Selenito de sódio	0,002	0,001
Sulfato de cobalto	0,01	0,008
Sal comum	17,0	10,6
Uramido 40	13,0	10,0
Farelo de soja tostada	15,0	-(*)
Agalmatolito	4,0	5,1
Milho	15,3	62,0
Vitamina A-1000000/g	0,003	0,002
Vitamina E-500/g	0,01	0,008
Vitamina D3-500000/g	0,004	0,003
Megalac-E	20,0	-(*)
TOTAL	100,0	100,0

(*)Componente não adicionado ao suplemento.

Tabela 2. Resultados (média dos quadrados mínimos $\pm$ EP) do tamanho do folículo ovulatório, volume luteal e concentração sérica de progesterona 7 e 14 dias após a ovulação, em novilhas Nelores suplementadas com gordura protegida ruminal (G) ou sem a adição de gordura protegida (C).

	Grupo G (n = 18)	Grupo C (n = 20)	P
Folículo ovulatório; mm	12,5 $\pm$ 0,3	12,3 $\pm$ 0,3	0,64
Volume luteal 7 dias após ovulação; mm ³	2.270,2 $\pm$ 312,8	2.356,1 $\pm$ 300,5	0,80
Progesterona sérica 7 dias após ovulação; ng/mL	3,4 $\pm$ 0,3	3,4 $\pm$ 0,2	0,82
Volume luteal 14 dias após ovulação; mm ³	2.861,6 $\pm$ 223,1	2.627,3 $\pm$ 215,2	0,30
Progesterona sérica 14 dias após ovulação; ng/mL	6,9 $\pm$ 0,4	6,2 $\pm$ 0,4	0,12

INSTRUÇÕES PARA SUBMISSÃO DE TRABALHOS NA REVISTA PESQUISA AGROPECUÁRIA BRASILEIRA

Os trabalhos enviados à PAB devem ser inéditos e não podem ter sido encaminhados a outro periódico científico ou técnico. Dados publicados na forma de resumos, com mais de 250 palavras, não devem ser incluídos no trabalho.

A Comissão Editorial faz análise dos trabalhos antes de submetê-los à assessoria científica. Nessa análise, consideram-se aspectos como: escopo; apresentação do artigo segundo as normas da revista; formulação do objetivo de forma clara; clareza da redação; fundamentação teórica; atualização da revisão da literatura; coerência e precisão da metodologia; resultados com contribuição significativa; discussão dos fatos observados frente aos descritos na literatura; qualidade das tabelas e figuras; originalidade e consistência das conclusões. Após a aplicação desses critérios, se o número de trabalhos aprovados ultrapassa a capacidade mensal de publicação, é aplicado o critério da relevância relativa, pelo qual são aprovados os trabalhos cuja contribuição para o avanço do conhecimento científico é considerada mais significativa. Esse critério só é aplicado aos trabalhos que atendem aos requisitos de qualidade para publicação na revista, mas que, em razão do elevado número, não podem ser todos aprovados para publicação. Os trabalhos rejeitados são devolvidos aos autores e os demais são submetidos à análise de assessores científicos, especialistas da área técnica do artigo.

São considerados, para publicação, os seguintes tipos de trabalho: Artigos Científicos, Notas Científicas, Novas Cultivares e Artigos de Revisão, este último a convite do Editor. Os trabalhos publicados na PAB são agrupados em áreas técnicas, cujas principais são: Entomologia, Fisiologia Vegetal, Fitopatologia, Fitotecnia, Fruticultura, Genética, Microbiologia, Nutrição Mineral, Solos e Zootecnia.

O texto deve ser digitado no editor de texto Word, em espaço duplo, fonte Times New Roman, corpo 12, folha formato A4, margens de 2,5 cm, com páginas e linhas numeradas.

APRESENTAÇÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo científico deve ter, no máximo, 20 páginas, incluindo-se as ilustrações (tabelas e figuras), que devem ser limitadas a seis, sempre que possível.

A ordenação do artigo deve ser feita da seguinte forma:

Artigos em português – Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumo, Termos para indexação, título em inglês, Abstract, Index terms, Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusões, Agradecimentos, Referências, tabelas e figuras.

Artigos em inglês – Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Abstract, Index terms, título em português, Resumo, Termos para indexação, Introduction, Material and Methods, Results and Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References, tables, figures.

Artigos em espanhol – Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumen, Términos para indexación; título em inglês, Abstract, Index terms, Introducción, Material y Métodos, Resultados y Discusión, Conclusiones, Agradecimientos, Referencias, cuadros e figuras.

O título, o resumo e os termos para indexação devem ser vertidos fielmente para o inglês, no caso de artigos redigidos em português e espanhol, e para o português, no caso de artigos redigidos em inglês.

Título

* Deve representar o conteúdo e o objetivo do trabalho e ter no máximo 15 palavras, incluindo-se os artigos, as preposições e as conjunções.

* Deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.

* Deve ser iniciado com palavras chaves e não com palavras como "efeito" ou "influência".

* Não deve conter nome científico, exceto de espécies pouco conhecidas; neste caso, apresentar somente o nome binário.

* Não deve conter subtítulo, abreviações, fórmulas e símbolos.

* As palavras do título devem facilitar a recuperação do artigo por índices desenvolvidos por bases de dados que catalogam a literatura.

Nomes dos autores

- * Grafar os nomes dos autores com letra inicial maiúscula, por extenso, separados por vírgula; os dois últimos são separados pela conjunção "e", "y" ou "and", no caso de artigo em português, espanhol ou em inglês, respectivamente.
- * O último sobrenome de cada autor deve ser seguido de um número em algarismo arábico, em forma de expoente, entre parênteses, correspondente à respectiva chamada de endereço do autor.

Endereço dos autores

- * São apresentados abaixo dos nomes dos autores, o nome e o endereço postal completos da instituição e o endereço eletrônico dos autores, indicados pelo número em algarismo arábico, entre parênteses, em forma de expoente.
- * Devem ser agrupados pelo endereço da instituição.
- * Os endereços eletrônicos de autores da mesma instituição devem ser separados por vírgula.

Resumo

- * O termo Resumo deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda, e separado do texto por travessão.
- * Deve conter, no máximo, 200 palavras, incluindo números, preposições, conjunções e artigos.
- * Deve ser elaborado em frases curtas e conter o objetivo, o material e os métodos empregados na pesquisa, os resultados e a conclusão.
- * O objetivo deve estar separado da descrição de material e métodos.
- * Não deve conter citações bibliográficas nem abreviaturas.
- * O final do texto deve conter a principal conclusão, com o verbo no presente do indicativo.

Termos para indexação

- * A expressão Termos para indexação, seguida de dois-pontos, deve ser grafada em letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- * Os termos devem ser separados por vírgula e iniciados com letra minúscula.
- * Devem ser no mínimo três e no máximo seis, considerando-se que um termo pode possuir duas ou mais palavras.
- * Não devem conter palavras que componham o título.
- * Devem conter o nome científico (só o nome binário) da espécie estudada.

Introdução

- * A palavra Introdução deve ser centralizada na página e grafada com letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.
- * Deve ocupar, no máximo, duas páginas.
- * Deve apresentar a justificativa para a realização do trabalho, situar a importância do problema científico a ser solucionado e estabelecer sua relação com outros trabalhos publicados sobre o assunto.
- * O último parágrafo deve expressar o objetivo, de forma coerente com o descrito no início do Resumo.

Material e Métodos

- * A expressão Material e Métodos deve ser centralizada na página e grafada em negrito; Os termos Material e Métodos devem ser grafados com letras minúsculas, exceto as letras iniciais.
- * Deve ser organizado, de preferência, em ordem cronológica.
- * Deve apresentar a descrição do local, a data e o delineamento do experimento, e indicar os tratamentos, o número de repetições e o tamanho da unidade experimental.
- * Deve conter a descrição detalhada dos tratamentos e variáveis.
- * Deve-se evitar o uso de abreviações ou as siglas.
- * Os materiais e os métodos devem ser descritos de modo que outro pesquisador possa repetir o experimento.
- * Devem ser evitados detalhes supérfluos e extensas descrições de técnicas de uso corrente.
- * Deve conter informação sobre os métodos estatísticos e as transformações de dados.
- * Deve-se evitar o uso de subtítulos; quando indispensáveis, grafá-los em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda da página.
- * Pode conter tabelas e figuras.

Resultados e Discussão

- * A expressão Resultados e Discussão deve ser centralizada na página e grafada em negrito; Os termos Resultados e Discussão devem ser grafados com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- * Deve ocupar quatro páginas, no máximo.
- * Todos os dados apresentados em tabelas ou figuras devem ser discutidos.
- * As tabelas e figuras são citadas sequencialmente.
- * Os dados das tabelas e figuras não devem ser repetidos no texto, mas discutidos frente aos apresentados por outros autores.
- * Dados não apresentados não podem ser discutidos.
- * Não deve conter afirmações que não possam ser sustentadas pelos dados obtidos no próprio trabalho ou por outros trabalhos citados.
- * As chamadas às tabelas ou às figuras devem ser feitas no final da primeira oração do texto em questão; se as demais sentenças do parágrafo referirem-se à mesma tabela ou figura, não é necessária nova chamada.
- * Não apresentar os mesmos dados em tabelas e em figuras.
- * As novas descobertas devem ser confrontadas com o conhecimento anteriormente obtido.

Conclusões

- * O termo Conclusões deve ser centralizado na página e grafado em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- * Devem ser apresentadas em frases curtas, sem comentários adicionais, com o verbo no presente do indicativo, e elaboradas com base no objetivo do trabalho.
- * Não podem consistir no resumo dos resultados.
- * Devem apresentar as novas descobertas da pesquisa.
- * Devem ser numeradas e no máximo cinco.

Agradecimentos

- * A palavra Agradecimentos deve ser centralizada na página e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- * Devem ser breves e diretos, iniciando-se com "Ao, Aos, À ou Às" (pessoas ou instituições).
- * Devem conter o motivo do agradecimento.

Referências

- * A palavra Referências deve ser centralizada na página e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- * Devem ser de fontes atuais e de periódicos: pelo menos 70% das referências devem ser dos últimos 10 anos e 70% de artigos de periódicos.
- * Devem ser normalizadas de acordo com as normas vigentes da ABNT.
- * Devem ser apresentadas em ordem alfabética dos nomes dos autores, separados por ponto-e-vírgula, sem numeração.
- * Devem apresentar os nomes de todos os autores da obra.
- * Devem conter os títulos das obras ou dos periódicos grafados em negrito.
- * Devem conter somente a obra consultada, no caso de citação de citação.
- * Todas as referências devem registrar uma data de publicação, mesmo que aproximada.
- * Devem ser trinta, no máximo.

Exemplos:

Artigos de Anais de Eventos (aceitos apenas trabalhos completos)

AHRENS, S. A fauna silvestre e o manejo sustentável de ecossistemas florestais. In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO SOBRE MANEJO FLORESTAL, 3., 2004, Santa Maria. Anais. Santa Maria: UFSM, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, 2004. p.153-162.

Artigos de periódicos

SANTOS, M.A. dos; NICOLÁS, M.F.; HUNGRIA, M. Identificação de QTL associados à simbiose entre *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* e soja. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.41, p.67-75, 2006.

Capítulos de livros

AZEVEDO, D.M.P. de; NÓBREGA, L.B. da; LIMA, E.F.; BATISTA, F.A.S.; BELTRÃO, N.E. de M. Manejo cultural. In: AZEVEDO, D.M.P.; LIMA, E.F. (Ed.). O agronegócio da mamona no Brasil. Campina Grande: Embrapa Algodão; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p.121-160.

Livros

OTSUBO, A.A.; LORENZI, J.O. Cultivo da mandioca na Região Centro-Sul do Brasil. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 116p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Sistemas de produção, 6).

Teses e dissertações

HAMADA, E. Desenvolvimento fenológico do trigo (cultivar IAC 24 - Tucuruí), comportamento espectral e utilização de imagens NOAA-AVHRR. 2000. 152p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

Fontes eletrônicas

EMBRAPA AGROPECUÁRIA OESTE. Avaliação dos impactos econômicos, sociais e ambientais da pesquisa da Embrapa Agropecuária Oeste: relatório do ano de 2003. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2004. 97p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Documentos, 66).

Disponível

em:

'<http://www.cpaio.embrapa.br/publicacoes/ficha.php?tipo=DOC&num=66&ano=2004>. Acesso em: 18 abr. 2006.

Citações

* Não são aceitas citações de resumos, comunicação pessoal, documentos no prelo ou qualquer outra fonte, cujos dados não tenham sido publicados.

* A autocitação deve ser evitada.

Redação das citações dentro de parênteses

* Citação com um autor: sobrenome grafado com a primeira letra maiúscula, seguido de vírgula e ano de publicação

* Citação com dois autores: sobrenomes grafados com a primeira letra maiúscula, separados pelo "e" comercial (&), seguidos de vírgula e ano de publicação.

* Citação com mais de dois autores: sobrenome do primeiro autor grafado com a primeira letra maiúscula, seguido da expressão et al., em fonte normal, vírgula e ano de publicação.

* Citação de mais de uma obra: deve obedecer à ordem cronológica e em seguida à ordem alfabética dos autores.

* Citação de mais de uma obra dos mesmos autores: os nomes destes não devem ser repetidos; colocar os anos de publicação separados por vírgula.

* Citação de citação: sobrenome do autor e ano de publicação do documento original, seguido da expressão "citado por" e da citação da obra consultada.

* Deve ser evitada a citação de citação, pois há risco de erro de interpretação; no caso de uso de citação de citação, somente a obra consultada deve constar da lista de referências.

Redação das citações fora de parênteses

* Citações com os nomes dos autores incluídos na sentença: seguem as orientações anteriores, com os anos de publicação entre parênteses; são separadas por vírgula.

Fórmulas, expressões e equações matemáticas

* Fórmulas, expressões, símbolos ou equações matemáticas, escritas no editor de equações do programa Word, devem ser enviadas também em arquivos separados, no programa Corel Draw, gravadas com extensão CDR.

* No texto, devem ser iniciadas à margem esquerda da página e apresentar tamanho padronizado da fonte Times New Roman.

* Não devem apresentar letras em itálico ou negrito.

Tabelas

- * As tabelas devem ser numeradas sequencialmente, com algarismo arábico, e apresentadas em folhas separadas, no final do texto, após referências.
- * Devem ser auto-explicativas.
- * Seus elementos essenciais são: título, cabeçalho, corpo (colunas e linhas) e coluna indicadora dos tratamentos ou das variáveis.
- * Os elementos complementares são: notas-de-rodapé e fontes bibliográficas.
- * O título, com ponto no final, deve ser precedido da palavra Tabela, em negrito; deve ser claro, conciso e completo; deve incluir o nome (vulgar ou científico) da espécie e das variáveis dependentes.
- * No cabeçalho, os nomes das variáveis que representam o conteúdo de cada coluna devem ser grafados por extenso; se isso não for possível, explicar o significado das abreviaturas no título ou nas notas-de-rodapé.
- * Todas as unidades de medida devem ser apresentadas segundo o Sistema Internacional de Unidades.
- * Nas colunas de dados, os valores numéricos devem ser alinhados pelo último algarismo.
- * Nenhuma célula (cruzamento de linha com coluna) deve ficar vazia no corpo da tabela; dados não apresentados devem ser representados por hífen, com uma nota-de-rodapé explicativa.
- * Na comparação de médias de tratamentos são utilizadas, no corpo da tabela, na coluna ou na linha, à direita do dado, letras minúsculas ou maiúsculas, com a indicação em nota-de-rodapé do teste utilizado e a probabilidade.
- * Devem ser usados fios horizontais para separar o cabeçalho do título, e do corpo; usá-los ainda na base da tabela, para separar o conteúdo dos elementos complementares.
- * Fios horizontais adicionais podem ser usados dentro do cabeçalho e do corpo; não usar fios verticais.
- * As tabelas devem ser editadas em arquivo Word, usando os recursos do menu Tabela; não fazer espaçamento utilizando a barra de espaço do teclado, mas o recurso recuo do menu Formatar Parágrafo.

Notas de rodapé das tabelas

- * Notas de fonte: indicam a origem dos dados que constam da tabela; as fontes devem constar nas referências.
- * Notas de chamada: são informações de caráter específico sobre partes da tabela, para conceituar dados. São indicadas em algarismo arábico, na forma de expoente, entre parênteses, à direita da palavra ou do número, no título, no cabeçalho, no corpo ou na coluna indicadora. São apresentadas de forma contínua, sem mudança de linha, separadas por ponto.
- * Para indicação de significância estatística, são utilizadas, no corpo da tabela, na forma de expoente, à direita do dado, as chamadas ^{ns} (não-significativo); * e ** (significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente).

Figuras

- * São consideradas figuras: gráficos, desenhos, mapas e fotografias usados para ilustrar o texto.
- * Só devem acompanhar o texto quando forem absolutamente necessárias à documentação dos fatos descritos.
- * O título da figura, sem negrito, deve ser precedido da palavra Figura, do número em algarismo arábico, e do ponto, em negrito.
- * Devem ser auto-explicativas.
- * A legenda (chave das convenções adotadas) deve ser incluída no corpo da figura, no título, ou entre a figura e o título.
- * Nos gráficos, as designações das variáveis dos eixos X e Y devem ter iniciais maiúsculas, e devem ser seguidas das unidades entre parênteses.
- * Figuras não-originais devem conter, após o título, a fonte de onde foram extraídas; as fontes devem ser referenciadas.
- * O crédito para o autor de fotografias é obrigatório, como também é obrigatório o crédito para o autor de desenhos e gráficos que tenham exigido ação criativa em sua elaboração.
- * As unidades, a fonte (Times New Roman) e o corpo das letras em todas as figuras devem ser padronizados.
- * Os pontos das curvas devem ser representados por marcadores contrastantes, como: círculo, quadrado, triângulo ou losango (cheios ou vazios).

- * Os números que representam as grandezas e respectivas marcas devem ficar fora do quadrante.
- * As curvas devem ser identificadas na própria figura, evitando o excesso de informações que comprometa o entendimento do gráfico.
- * Devem ser elaboradas de forma a apresentar qualidade necessária à boa reprodução gráfica e medir 8,5 ou 17,5 cm de largura.
- * Devem ser gravadas no programa Word, Excel ou Corel Draw (extensão CDR), para possibilitar a edição em possíveis correções.
- * Usar fios com, no mínimo, 3/4 ponto de espessura.
- * No caso de gráfico de barras e colunas, usar escala de cinza (exemplo: 0, 25, 50, 75 e 100%, para cinco variáveis).
- * Não usar negrito nas figuras.
- * As figuras na forma de fotografias devem ter resolução de, no mínimo, 300 dpi e ser gravadas em arquivos extensão TIF, separados do arquivo do texto.
- * Evitar usar cores nas figuras; as fotografias, porém, podem ser coloridas.