RODRIGO VASCONCELLOS SALA

***Influência das concentrações de AGNE na qualidade
oocitária e produção in vitro de embriões de vacas
Holandesas no início da lactação***

São Paulo

2013

Rodrigo Vasconcellos Sala

**Influência das concentrações de AGNE na qualidade oocitária e
produção *in vitro* de embriões de vacas Holandesas no início
da lactação**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli

São Paulo

2013

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP

29/5/13

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2799
FMVZ

Sala, Rodrigo Vasconcellos

Influência das concentrações de AGNE na qualidade oócitaria e produção *in vitro* de embriões de vacas Holandesas no início da lactação / Rodrigo Vasconcellos Sala. -- 2013.

87 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli.

1. Balanço energético negativo. 2. OPU/PIV. 3. Taxa de blastocisto. 4. Perfil metabólico. I. Título.

ERRATA

SALA, R. V. Influência das concentrações de AGNE na qualidade oocitária e produção *in vitro* de embriões de vacas Holandesas no início da lactação. 2013. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Página	Parágrafo	Onde se lê	Leia-se
Resumo	1º parágrafo	[...] in early laction.	[...] during early lactation.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Fatores que podem interferir na produção in vitro e na taxa de concepção de embriões de vacas holandesas de alta produção", protocolado sob o nº 2256/2011, utilizando 180 (cento e oitenta) vacas holandesas, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 17/8/2011.

We certify that the Research "Factors that may interfere with in vitro production and conception rate of embryos of high producing Hostein cows", protocol number 2256/2011, utilizing 180 (one hundred eighty) Hostein cows, under the responsibility Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 8/17/2011.

São Paulo, 18 de agosto de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SALA, Rodrigo Vasconcellos

Título: **Influência das concentrações de AGNE na qualidade oocitária e produção *in vitro* de embriões de vacas Holandesas no início da lactação**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

A minha esposa Luciana Cristina Carrenho Sala uma mulher guerreira, inteligente e companheira com quem tenho a sorte de dividir meus sonhos e minha vida.

A minha mãe Inayá Cabral de Vasconcellos por toda dedicação e esforço que fez, para permitir que hoje eu estivesse realizando este sonho, e pelos seus ensinamentos que me fizeram ser o homem que sou hoje.

Ao meu pai José Roberto Sala por ser um exemplo de homem e profissional, uma referência de caráter a quem me espelho.

E ao meu avô materno Wilson Macedo Cabral de Vasconcellos (*in memoriam*) que junto de meus pais foi meu maior exemplo de educação e caráter, formando meus alicerces de ética e moral.

A vocês ficam o meu agradecimento e carinho, pois sempre me permitiram tentar ser o melhor que posso. OBRIGADO!!!

Dedico

AGRADEÇO

À minha esposa Luciana Cristina Carrenho Sala por acreditar nos meus sonhos e dividi-los comigo, me incentivando e compreendendo, nos diversos momentos de distância e ausência. Obrigado por ser esta amante, companheira e amiga. Te amo muito!!!

À minha família: ao meu pai José Roberto Sala pelo exemplo de homem e profissional, a minha mãe Inayá Cabral de Vasconcellos por nunca medir esforços possibilitando-me realizar meus sonhos, a minha irmã Patrícia Vasconcellos Sala por sempre estar ao meu lado e me apoiar em minhas decisões, ao meu irmão João Augusto Baptista Sala por mesmo que indiretamente me fazer cada dia querer ser melhor e servir de exemplo a ele como meu pai é para mim.

À minha nova família: meu sogro José Roberto Carrenho e minha sogra Elza Aparecida de Andrade Carrenho por me apoiarem e me receberem como um filho. Obrigado pelo carinho e cuidado que vocês sempre tiveram comigo.

Ao meu orientador Pietro Sampaio Baruselli, pelo apoio e ensinamentos durante esses anos de convívio, um exemplo de simplicidade, profissionalismo e competência. Agradeço a oportunidade de trabalhar e conviver com o senhor!

Ao Carlos Alberto Rodrigues (Carlão) e toda equipe da Fazenda Santa Rita (Agrindus S/A) pelo conhecimento dividido durante a minha graduação e na realização deste experimento.

A toda a equipe da Bioembryo Biotecnologia da Reprodução Animal pela competência, profissionalismo, dedicação e amor com que realiza o seu trabalho.

Ao Augusto Castro Netto (Fininho) por toda a ajuda e dedicação na realização desse trabalho, sempre simpático, parceiro e competente profissional.

Ao grande amigo Fabio Jardim de Carvalho que fiz neste período do mestrado. Agradeço o constante aprendizado e as inúmeras horas de convivência, obrigado!

Ao amigo Renato Giroto por compartilhar momentos de alegria e na realização de experimentos e IATFs. Também a todas as fazendas, as quais permitiram desenvolver nossas ideias e fornecer toda a infraestrutura e animais.

Aos meus amigos Caio, Gian, Matheus (Bivão) e Tenner que sempre estão ao meu lado e mesmo distantes sei da torcida deles para que tudo que almejo se

realize. Gostaria de agradecer especialmente ao Bivão por compartilhar e acreditar nos meus sonhos profissionais, apoiando e me hospedando em sua casa durante os anos de mestrado.

Ao Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Animal (LBFA-VNP/USP) em nome do Prof. Dr. Francisco Palma Rennó e do Dr. José Esler de Freitas Junior pelas análises bioquímicas do presente estudo.

Aos amigos Bruno e José Nélío pela ajuda na análise estatística, pelos incentivos, convivência e amizade.

Ao Márcio pelo apoio incondicional na realização deste e outros experimentos, ao convívio e as conversas sempre produtivas. Obrigado!!!

Ao Manoel pela ajuda, inúmeros ensinamentos e pelo auxílio em todos os trabalhos realizados durante o mestrado.

Aos amigos do grupo: Gustavo, Tomas, Mariana, Laís, Emiliana, Julia, Gabriela, Bruna, Roberta, Henderson, Kedson, Lindsay, Alessandra e Gabriel. Obrigado pelos momentos de alegria, trabalho e aprendizado.

A todos os professores do Departamento de Reprodução Animal (André F. C. Andrade, Annelise S. Traldi, Camila I. Vannucchi, Cláudia B. Fernandes, Cláudio A. Oliveira, Ed H. Madureira, Eneiva C. C. Celeghini, José A. Visintin, Marcelo A. B. Vaz Guimarães, Mário Binelli, Mayra E. O. D. Assumpção, Renato C. Barnabé, Ricardo J. G. Pereira, Rubens P. Arruda, Valquíria H. Barnabé) que me acolheram e não mediram esforços para fornecer seus conhecimentos.

Às queridas Harumi, Roberta e Thais e ao amigo Miguel por todo o apoio durante esse tempo no VRA.

À bibliotecária Elza Faquim, por me atender com a maior urgência e deixar minha dissertação padronizada e dentro das normais.

A todas as empresas e seus respectivos funcionários por financiarem vários experimentos que pude realizar e ajudar durante estes últimos três anos.

A Alta Genetics do Brasil pela doação das doses de sêmen utilizadas no presente estudo.

A Universidade de São Paulo por me acolher e pelo órgão de fomento (CAPES) pelo incentivo financeiro concedido durante o período de meu mestrado.

*“A educação e o ensino são
as armas mais poderosas
que você pode usar para
mudar o mundo.”*

Nelson Mandela

RESUMO

SALA, R. V. **Influência das concentrações de AGNE na qualidade oocitária e produção *in vitro* de embriões de vacas Holandesas no início da lactação.** [Influence of NEFA concentrations on oocyte quality and *in vitro* embryo production in Holstein cows in early lactation]. 2013. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O presente estudo avaliou a influência das concentrações de ácidos graxos não esterificados (AGNE – Alto vs. Baixo) no dia 44±3 pós-parto, e dos dias pós-parto nas concentrações de metabólitos (β -hidroxibutirato e glicose) e na qualidade oocitária e produção *in vitro* de embriões de vacas Holandesas no início da lactação (até 90 dias pós-parto). O experimento foi realizado na Fazenda Santa Rita (Agrindus S/A) localizada no município de Descalvado – SP. A partir da data do parto foram selecionadas 30 vacas Holandesas para serem aspiradas a cada 14 dias em cinco diferentes momentos no início da lactação (30±3, 44±3, 58±3, 72±3 e 86±3 dias pós-parto). No momento da aspiração folicular (OPU), foram realizadas as colheitas de sangue para dosagem dos metabólitos, a avaliação do escore de condição corporal (ECC) e a contagem dos folículos visualizados. Os procedimentos de produção *in vitro* de embriões (maturação, fertilização e cultivo) foram realizados no laboratório da Bioembryo, localizado no município de Bauru – SP. A análise estatística foi realizada pelo procedimento GLM do SAS. Não se observou efeito de tratamento (Alto AGNE = 0,45 vs. Baixo AGNE = 0,52 mmol/L; P=0,20) e de tempo (30±3 = 0,54; 44±3 = 0,43; 58±3 = 0,43; 72±3 = 0,52 e 86±3 = 0,51 mmol/L; P=0,11) para as concentrações de β -hidroxibutirato. Para as concentrações de glicose não se verificou efeito do tratamento (Alto AGNE = 61,1 vs. Baixo AGNE = 63,6 mg/dL; P=0,26). No entanto, observou-se efeito de tempo para as concentrações de glicose (30±3 = 60,1; 44±3 = 63,0; 58±3 = 63,5; 72±3 = 62,1 e 86±3 = 63,0 mg/dL; P=0,03). O tratamento (Alto vs. Baixo AGNE) não influenciou a quantidade de folículos recrutados (P=0,36), oócitos totais recuperados (P=0,28) e oócitos viáveis (P=0,25). Assim como o tempo não alterou a quantidade de folículos recrutados (P=0,87), oócitos totais recuperados (P=0,42) e oócitos viáveis (P=0,44). A quantidade de oócitos grau I não foi influenciada pelo tratamento (Alto vs. Baixo AGNE; P=0,14).

Porém, os dias pós-parto reduziram a sua quantidade ($P=0,05$). A quantidade de oócitos clivados por vaca aspirada ($P=0,45$) e a taxa de clivagem ($P=0,95$) não apresentaram diferenças estatísticas conforme as concentrações de AGNE (Alto vs. Baixo) no dia 44 pós-parto. Os dias pós-parto também não alteraram a quantidade de oócitos clivados por vaca aspirada ($P=0,31$) e a taxa de clivagem ($P=0,80$). Para a produção *in vitro* de embriões, a quantidade de blastocisto por vaca aspirada conforme as concentrações de AGNE (Alto = 0,4 vs. Baixo = 1,2; $P=0,37$) e os dias pós-parto ($30\pm3 = 0,4$; $44\pm3 = 0,7$; $58\pm3 = 0,8$; $72\pm3 = 0,9$ e $86\pm3 = 1,2$; $P=0,39$) não apresentaram diferenças estatísticas. Assim como, a taxa de blastocisto para os animais dos grupos (Alto AGNE = 6,2% vs. Baixo AGNE = 11,6%; $P=0,51$) e para os diferentes momentos pós-parto ($30\pm3 = 4,8\%$; $44\pm3 = 8,9\%$; $58\pm3 = 10,7\%$; $72\pm3 = 10,0\%$ e $86\pm3 = 12,8\%$; $P=0,41$). Conclui-se que a maior concentração de AGNE no dia 44 pós-parto em vacas Holandesas não influenciou as concentrações de β -hidroxibutirato e de glicose, assim como a qualidade e a produção *in vitro* de embriões. No entanto, o aumento dos dias pós-parto incrementou as concentrações de glicose e reduziu a quantidade de oócitos grau I de vacas holandesas submetidas à OPU/PIV até 90 dias após o parto.

Palavras-chave: Balanço energético negativo. OPU/PIV. Taxa de blastocisto. Perfil metabólico.

ABSTRACT

SALA, R. V. **Influence of NEFA concentrations on oocyte quality and *in vitro* embryo production in Holstein cows during early lactation.** [Influência das concentrações de AGNE na qualidade oocitária e produção *in vitro* de embriões de vacas Holandesas no início da lactação]. 2013. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The present study evaluated the influence of the days postpartum and the concentrations of non-esterified fatty acids (NEFA - High vs. Low) on concentrations of metabolites (β -hydroxybutyrate and glucose), oocyte quality and *in vitro* embryo production of Holstein cows during early lactation (90 days postpartum). The experiment was carried out in a commercial dairy farm (Santa Rita - Agrindus S/A), located at Descalvado - SP. At the calving moment, 30 Holstein cows were selected to be submitted to ovum pick-up (OPU) procedures each 14 days, in 5 different moments during the early lactation (30 ± 3 , 44 ± 3 , 58 ± 3 , 72 ± 3 and 86 ± 3 days postpartum). Previously to the OPU session blood samples were collected for metabolite assay, body condition score (BCS) was recorded and the number of follicles able to be aspirated was also registered. The High and Low concentration of NEFA were established with the samples of day 44 ± 3 postpartum. The laboratory procedures for *in vitro* embryo production (*in vitro* maturation, fertilization and culture) were performed in the same laboratory (Bioembryo, Bauru – SP). Statistical analysis was performed by the GLM procedure of SAS. No effect was observed for different NEFA concentrations (High NEFA = 0.45 vs. Low NEFA = 0.52 mmol / L, $P = 0.20$), nor for days postpartum ($30 \pm 3 = 0.54$; $44 \pm 3 = 0.43$; $58 \pm 3 = 0.43$; $72 \pm 3 = 0.52$ e $86 \pm 3 = 0.51$ mmol/L; $P=0.11$) on β -hydroxybutyrate concentrations. Considering glucose concentrations there was no treatment effect (High NEFA = 61.1 vs. Low NEFA = 63.6 mg / dL, $P = 0.26$). However, the glucose concentrations were influenced by days postpartum ($30 \pm 3 = 60.1$; $44 \pm 3 = 63.0$; $58 \pm 3 = 63.5$; $72 \pm 3 = 62.1$ e $86 \pm 3 = 63.0$ mg/dL; $P=0.03$). Treatment (High vs. Low NEFA) did not impact the number of recruited follicles ($P = 0.36$), total oocytes recovered ($P = 0.28$) and viable oocytes ($P = .25$). As well as, time did not alter the amount of recruited follicles ($P = 0.87$), total oocytes recovered ($P = 0.42$) and viable oocytes ($P = .44$). The amount of grade I oocytes was not influenced by treatment (High NEFA vs. Low NEFA, $P = 0.14$).

However, days postpartum reduced the quantity of grade I oocytes ($P = 0.05$). Also, no treatment effect (High and Low NEFA) was observed for number of cleaved oocytes per OPU session ($P = 0.45$) and cleavage rate ($P = 0.95$). In the same way, days postpartum had no influence in the amount of cleaved oocytes per OPU session ($P = 0.31$) and cleavage rate ($P = 0.80$). In addition, for the *in vitro* embryo production, the NEFA concentrations (High NEFA = 0.4 vs. Low NEFA = 1.2, $P = 0.37$) and days postpartum ($30 \pm 3 = 0.4$; $44 \pm 3 = 0.7$; $58 \pm 3 = 0.8$; $72 \pm 3 = 0.9$ e $86 \pm 3 = 1.2$; $P=0.39$) did not affect the number of blastocysts per OPU session. Also, the blastocyst rate was not influenced by treatment (High NEFA = 6.2% vs. Low NEFA = 11.6%, $P = 0.51$) and days postpartum ($30 \pm 3 = 4.8\%$; $44 \pm 3 = 8.9\%$; $58 \pm 3 = 10.7\%$; $72 \pm 3 = 10.0\%$ e $86 \pm 3 = 12.8\%$; $P=0.41$). It was concluded that high concentration of NEFA on day 44 postpartum in Holstein cows did not alter the concentrations of β -hydroxybutyrate and glucose, as well as, the oocyte quality and *in vitro* embryo production. However, the increase in days postpartum elevated the glucose concentrations and decreased the number of grade I oocytes of Holstein cows submitted to OPU and *in vitro* embryo production up to 90 days postpartum.

Keywords: Negative energy balance. Ovum pick-up. Blastocyst rate. Metabolic profile.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Modelo hipotético da influência da concentração de AGNE 44 dias pós-parto, nos parâmetros metabólicos qualidade e competência oocitária em vacas Holandesas no início da lactação (até 90 dias pós-parto) 35
- Figura 2 - Desenho experimental das aspirações foliculares realizadas nas vacas Holandesas em diferentes momentos pós-parto..... 38
- Figura 3 - Concentrações plasmáticas de AGNE conforme os níveis de AGNE 44 dias após o parto (grupo Alto ou Baixo AGNE) em vacas Holandesas.... 44
- Figura 4 - Concentrações plasmáticas de BHB conforme os níveis de AGNE 44 dias após o parto (grupo Alto ou Baixo AGNE) em vacas Holandesas 48
- Figura 5 - Concentrações plasmáticas de glicose conforme os níveis de AGNE 44 dias após o parto (grupo Alto ou Baixo AGNE) em vacas Holandesas.... 48
- Figura 6 – Número de corpos lúteos por vaca aspirada conforme os níveis de AGNE 44 dias após parto (grupo Alto ou Baixo AGNE) em vacas Holandesas.. 50
- Figura 7 – Avaliação do escore de condição corporal (ECC) conforme os níveis AGNE 44 dias após o parto (grupo Alto ou Baixo AGNE) em vacas Holandesas 51
- Figura 8 - Média ($\pm$ EPM) de folículos visualizados no momento da aspiração folicular conforme os níveis de AGNE 44 dias após o parto (grupo Alto ou Baixo AGNE) em vacas Holandesas..... 52
- Figura 9 – Média ($\pm$ EPM) da quantidade de folículos pequenos no momento da aspiração folicular conforme os níveis de AGNE 44 dias após o parto (grupo Alto ou Baixo AGNE) em vacas Holandesas 54
- Figura 10 - Média ($\pm$ EPM) da quantidade de folículos médio no momento da aspiração folicular conforme os níveis de AGNE 44 dias após o parto (grupo Alto ou Baixo AGNE) em vacas Holandesas 55

Figura 11 - Média ($\pm$ EPM) da quantidade de folículos grandes no momento da aspiração folicular conforme os níveis de AGNE 44 dias após o parto (grupo Alto ou Baixo AGNE) em vacas Holandesas	55
Figura 12 - Média ($\pm$ EPM) do número total de oócitos recuperados conforme os níveis de AGNE 44 dias após o parto (grupo Alto ou Baixo AGNE) em vacas Holandesas	57
Figura 13 - Taxa de recuperação de oócitos (%) conforme os níveis de AGNE 44 dias após o parto (grupo Alto ou Baixo AGNE) em vacas Holandesas	57
Figura 14 - Média ($\pm$ EPM) do número de oócitos viáveis conforme os níveis de AGNE 44 dias após o parto (grupo Alto ou Baixo AGNE) em vacas Holandesas	60
Figura 15 - Taxa de oócitos viáveis (%) conforme os níveis de AGNE 44 dias após o parto (grupo Alto ou Baixo AGNE) em vacas Holandesas	60
Figura 16 - Média ($\pm$ EPM) do número de oócitos grau I (GI) conforme os níveis de AGNE 44 dias após o parto (grupo Alto ou Baixo AGNE) em vacas Holandesas	62
Figura 17 - Média ($\pm$ EPM) do número de oócitos grau II (GII) conforme os níveis de AGNE 44 dias após o parto (grupo Alto ou Baixo AGNE) em vacas Holandesas	62
Figura 18 - Média ($\pm$ EPM) do número de oócitos grau III (GIII) conforme os níveis de AGNE 44 dias após o parto (grupo Alto ou Baixo AGNE) em vacas Holandesas	63
Figura 19 - Média ($\pm$ EPM) do número de oócitos grau III (GIII) conforme os níveis de AGNE 44 dias após o parto (grupo Alto ou Baixo AGNE) em vacas Holandesas	63
Figura 20 - Média ($\pm$ EPM) do número de oócitos clivados por vaca aspirada conforme os níveis de AGNE 44 dias após o parto (grupo Alto ou Baixo AGNE) em vacas Holandesas.....	66
Figura 21 - Taxa de clivagem (%) de oócitos aspirados conforme os níveis de AGNE 44 dias após o parto (grupo Alto ou Baixo AGNE) em vacas Holandesas	66

Figura 22 - Média ($\pm$ EPM) do número de blastocisto por vaca aspirada conforme os níveis de AGNE 44 dias após o parto (grupo Alto ou Baixo AGNE) em vacas Holandesas..... 69

Figura 23 - Taxa de blastocisto (%) conforme os níveis de AGNE 44 dias após o parto (grupo Alto ou Baixo AGNE) em vacas Holandesas..... 69

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Concentrações plasmáticas de AGNE (mmol/L) em vacas Holandesas no início da lactação. Vacas do grupo Alto AGNE e do grupo Baixo AGNE - Descalvado, SP – 2011.....43
- Tabela 2 - Concentrações plasmáticas de BHB (mmol/L) em vacas Holandesas no início da lactação. Vacas do grupo Alto AGNE e do grupo Baixo AGNE - Descalvado, SP – 2011.....45
- Tabela 3 - Concentrações plasmáticas de glicose (mg/dL) em vacas Holandesas no início da lactação. Vacas do grupo Alto AGNE e do grupo Baixo AGNE - Descalvado, SP – 2011.....46
- Tabela 4 - Quantidade e qualidade oocitária (média $\pm$ EPM) em vacas Holandesas conforme as concentrações de AGNE (Alto AGNE ou Baixo AGNE) no início da lactação - Descalvado, SP – 2011.....58
- Tabela 5 - Quantidade e qualidade oocitária (média $\pm$ EPM) em vacas Holandesas conforme os dias em lactação (DEL) no início da lactação - Descalvado, SP – 2011.....59
- Tabela 6 - Efeito da concentração de ácidos graxos não-esterificados (AGNE) no início da lactação de vacas Holandesas sobre a produção *in vitro* de embriões. Grupo Alto AGNE (n=13) e grupo Baixo AGNE (n=13) - Descalvado, SP – 2011.....65
- Tabela 7 - Efeito dos dias em lactação (DEL) de vacas Holandesas sobre a produção *in vitro* de embriões - Descalvado, SP – 2011.....68

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	CICLO ESTRAL EM <i>BOS TAURUS</i>	20
2.2	FISIOLOGIA E CICLICIDADE NO PÓS-PARTO	26
2.3	BALANÇO ENERGETICO NO PRÉ E PÓS-PARTO	28
2.4	ASPIRAÇÃO FOLICULAR E PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES	32
3	HIPÓTESE	36
4	OBJETIVOS	37
4.1	OBJETIVOS GERAIS	37
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
5	MATERIAL E MÉTODOS	38
5.1	LOCAL E ANIMAIS DO EXPERIMENTO	38
5.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	38
5.3	ASPIRAÇÃO FOLICULAR GUIADA POR ULTRASSONOGRRAFIA	39
5.4	PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES	41
5.5	COLHEITA DE SANGUE E ANALISE METABÓLICA	42
5.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
6.1	AVALIAÇÃO DOS PARAMETROS METABÓLICOS	44
6.2	AVALIAÇÃO DA CICLICIDADE E DO SCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL	50
6.3	AVALIAÇÃO OVARIANA E OOCITÁRIA	53
6.4	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES	65
7	CONCLUSÕES	71
	REFERÊNCIAS	72

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o quinto maior produtor de leite do mundo, com produção anual de 32 bilhões de litros (ANUALPEC, 2012). Nos últimos nove anos o país obteve um incremento de quase 28% na produção de leite/vaca/ano (ANUALPEC, 2012). Porém, o país apresenta uma baixa produtividade por vaca, com produção média de 1.485 litros por lactação (ANUALPEC, 2012). A produtividade por vaca no Brasil é quase sete vezes inferior a dos EUA e três vezes menor que a produtividade dos rebanhos argentinos (EMBRAPA, 2011).

Ainda, considerando que o consumo populacional nacional foi de 149 litros/per capita/ano (DBO, 2011) e o Brasil exportou 250.000 t de equivalente em leite em 2011, houve a necessidade de importação de 1.000.000 t de leite para atender a demanda nacional (BRASIL, 2012). O resultado foi o déficit de US\$ 463,4 milhões na balança comercial de lácteos no ano em questão (BRASIL, 2012).

Em todo o mundo, os rebanhos vêm apresentando aumento na produção de leite por vaca, decorrente da melhora das técnicas de manejo e da seleção genética (WASHBURN et al., 2002). Durante décadas, pesquisadores descreveram decréscimo na eficiência reprodutiva decorrente do aumento da produção de leite, porém, na década de 90 esse declínio tornou-se alarmante (LUCY, 2001; WASHBURN et al., 2002). Esta baixa eficiência reprodutiva foi relacionada às alterações metabólicas ocasionadas pela alta produção de leite interferindo na fisiologia reprodutiva (LEROY et al., 2005; WILTBANK et al., 2006).

No período inicial da lactação, caracterizado como sendo os primeiros 90 dias após o parto, ocorrem grandes mudanças na demanda de nutrientes necessários para a produção de leite, principalmente por glicose, ácidos graxos e proteína (LEROY et al., 2008a). Essas mudanças ocorrem principalmente nas primeiras semanas de lactação, estando a vaca neste momento incapaz de suprir a necessidade energética com o aumento da ingestão de matéria seca, acarretando no balanço energético negativo (BEN; BUTLER, 2003; LLEWELLYN et al., 2007).

Estudos evidenciaram que as mudanças fisiológicas relacionadas às alterações do perfil metabólico e do aumento do metabolismo hepático, afetam as concentrações circulantes de estradiol (E_2) no proestro e de progesterona (P_4) no

diestro, comprometendo a qualidade dos oócitos (LEROY et al., 2008b), do embrião (SARTORI et al., 2002; WILTBANK et al., 2006) e do ambiente uterino após a ovulação (LEROY et al., 2008c).

Além da influência do metabolismo hepático nas concentrações de hormônios esteróides que regulam a eficiência reprodutiva (WILTBANK et al., 2006), as alterações metabólicas do pós-parto, ocasionadas pelo BEN, podem interferir no funcionamento do eixo hipotálamico-hipofisário-ovariano (BUTLER, 2003). A duração e a severidade do BEN agravam a redução das concentrações circulantes de insulina, glicose e IGF-1, e incrementam as concentrações de AGNE e BHB, aumentando o intervalo entre o parto e a primeira ovulação (BUTLER; SMITH, 1989). Além disso, o efeito direto das concentrações sanguíneas de AGNE, BHB e glicose podem comprometer a qualidade e a competência oocitária em vacas Holandesas (LEROY et al., 2008b).

Apesar da causa não ser sempre estabelecida, é bem descrito que o status nutricional e a saúde metabólica inadequada influenciam negativamente a reprodução em vacas leiteiras (BISINOTTO et al., 2012). As concentrações plasmáticas de AGNE estão positivamente correlacionadas ao grau de deficiência energética e podem potencialmente enviar sinais referentes ao status nutricional aos centros neurais (WALTERS et al., 2002). Além disto, produtos do metabolismo de gordura podem ser prejudiciais para a competência de oócitos e subsequente desenvolvimento do embrião. A saúde metabólica prejudicada muitas vezes leva à imunossupressão e ocorrência de doenças que reduzem a fertilidade (BISINOTTO et al., 2012).

O conhecimento do mecanismo de ação das alterações metabólicas pós-parto na qualidade e competência oocitária em vacas leiteiras permite a busca de estratégias de manejo e nutrição com o intuito de amenizar os prejuízos reprodutivos. Portanto, a realização de estudos que ajudem a compreender como as alterações metabólicas comprometem a qualidade oocitária e a produção de embrião em diferentes momentos pós-parto são necessários.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CICLO ESTRAL EM *BOS TAURUS*

O ciclo estral é definido como o intervalo entre dois comportamentos de estro consecutivos e sua duração normal é de 18-24 dias (FORDE et al., 2011). O intervalo médio entre estros em animais *Bos taurus* é de 21 dias, no entanto vacas Holandesas de alta produção possuem um maior intervalo, sendo em média de 23 dias (SARTORI et al., 2010). Segundo Adams et al. (2008), vacas com duas ondas foliculares tendem a apresentar duração menor do ciclo estral (média de 19 dias) e vacas com três ondas foliculares duração maior do ciclo estral (média de 22 dias). Em um estudo foi observado duração do ciclo estral para novilhas e vacas em lactação Holandesas de $22,0 \pm 0,4$ e $22,9 \pm 0,7$ dias, respectivamente (SARTORI et al., 2004).

O ciclo estral pode ser dividido em duas fases distintas: fase luteal (14 – 18 dias) e a fase folicular (4 – 6 dias). A fase luteal é alusiva ao período após a ovulação onde ocorre a formação do corpo lúteo (CL) e o aumento gradativo da progesterona (P4) plasmática (podendo também ser designado de metaestro e diestro). Já a fase folicular compreende o período após a luteólise, onde as concentrações plasmáticas de P4 diminuem para níveis basais e o hormônio em maior concentração circulante é o 17β -estradiol, terminando esta fase com a ovulação (podendo também ser designada de pró-estro e estro; PETER et al., 2009; FORDER et al., 2011).

Nos bovinos o crescimento dos folículos nos ovários é caracterizado por ondas de desenvolvimento folicular, denominados de ondas foliculares (ADAMS et al., 2008; WILTBANK et al., 2011). As ondas foliculares são um processo contínuo de crescimento e regressão dos folículos ovarianos, este processo ocorre durante todas as etapas da vida de uma fêmea: anterior à puberdade, durante a gestação e no pós-parto (WILTBANK; GÜMEN; SARTORI, 2002). Durante o ciclo estral ocorre normalmente o desenvolvimento de duas ou três ondas de crescimento folicular, podendo ocorrer uma, quatro ou cinco ondas foliculares em alguns casos (BARUSELLI; GIMENES; SALES, 2007; SARTORI et al., 2010).

O início da onda de crescimento folicular consiste na emergência simultânea de um grupo de folículos com diâmetro de aproximadamente 2 a 5 mm (GINTHER et al., 2003; SARTORI et al., 2010), a emergência da onda folicular, também denominada recrutamento folicular, ocorre simultaneamente ao aumento transitório do hormônio folículo-estimulante (FSH; GINTHER et al., 1996a). A quantidade de folículos recrutados está associada às concentrações circulantes de insulina e do fator de crescimento semelhante à insulina - 1 (IGF – 1; WEBB et al., 2004). Após a emergência folicular os folículos recrutados apresentam um crescimento até aproximadamente o terceiro dia, a partir deste momento apenas o folículo dominante (FD) continua o seu desenvolvimento e os demais folículos (folículos subordinados, FS) sofrem regressão (LUCY et al., 1992; GINTHER et al., 2001), este evento é denominado desvio ou divergência folicular (GINTHER et al., 1996b).

Durante o processo de divergência folicular os hormônios gonadotróficos sofrem alterações de extrema importância para o estabelecimento da dominância folicular, é observada uma diminuição nas concentrações circulantes de FSH, ocasionados por fatores ovarianos (em especial o estradiol e a inibina) que causam “feedback” negativo na hipófise (ADAMS et al., 2008; WILTBANK et al., 2011) e adicionalmente alguns estudos reportam o aumento da expressão de receptores de hormônio luteinizante (rLH) nas células da granulosa e uma maior responsividade ao hormônio luteinizante (LH) pelo FD neste momento (revisado por WILTBANK et al., 2011). Além disso, mudanças intrafoliculares no sistema IGF vêm sendo relatados com importante papel no folículo que se tornará dominante por aumentar a capacidade de resposta às gonadotrofinas. Beg et al. (2001) demonstraram que o maior folículo (futuro folículo dominante) apresenta aumento da quantidade de IGF-1 livre e reduzidas concentrações de proteínas de ligação do fator de crescimento semelhante à insulina (IGFBP) em comparação com o segundo maior folículo (FS).

No momento da divergência folicular, animais *Bos taurus* apresentam diâmetro folicular médio entre 8,5 a 9,0 mm (GINTHER et al., 1996b; BASTOS et al., 2010) enquanto animais *Bos indicus* apresentam folículo dominante com diâmetro médio entre 6,0 a 7,0 mm (GIMENES et al., 2008; BASTOS et al., 2010). No entanto, o período entre a emergência e a divergência folicular é semelhante entre *Bos taurus* e *Bos indicus* (BASTOS et al., 2010).

Após a divergência folicular, apenas o FD continua a crescer, principalmente em resposta a pulsatilidade do LH (importante no crescimento final e maturação do

FD) que é estimulado através do “feedback” positivo no hipotálamo pelo estradiol (E2) produzido pelo próprio folículo (FORDE et al., 2011). Porém, durante a fase luteínica (concentrações elevadas de progesterona) o E2 produzido pelo FD não consegue induzir uma frequência e/ou amplitude necessárias para ocasionar um pico de LH, a manifestação de estro e a ovulação (STOCK; FORTUNE, 1993), assim o FD entra em atresia cessando a produção de E2 e inibindo, desbloqueando o “feedback” negativo hipofisário ao FSH e permitindo o início de uma nova onda folicular (GINTHER et al., 2003).

No entanto, após o processo de luteólise e redução das concentrações de progesterona circulante, o FD presente neste momento nos ovários, consegue através do E2 produzido, estimular um “feedback” positivo no hipotálamo aumentando a síntese e liberação do GnRH que aumentará a frequência dos pulsos de LH (FORDE et al., 2011). A liberação do pico pré-ovulatório de LH é um importante sinalizador para a retomada do processo de meiose do oócito que estava em metáfase I para II, além de induzir a ovulação do FD (LINDSEY et al., 2002).

Após o pico de GnRH/LH a ovulação ocorre em média entre 24 a 32 horas (WILTBANK; GÜMEN; SARTORI, 2002; SOUZA et al., 2009) ocasionando a liberação do oócito e a ação do LH nas células da granulosa e da teca do folículo ovulado, transformando-as em células luteínicas que dará origem ao CL (NISWENDER et al., 2000; FORDE et al., 2011). As células da teca darão origem as células luteínicas pequenas e as células da granulosa as células luteínicas grandes, no entanto, com o desenvolvimento do CL as células luteínicas pequenas podem se transformar em células luteínicas grandes (HANSEL; DOWD, 1986).

O CL é uma glândula transitória que permanece funcional por 17 a 19 dias em vacas com ciclo estral normal e não prenhez (SAVIO et al., 1990; SARTORI et al., 2004), a principal função do CL é produzir progesterona, hormônio necessário para um controle adequado do ciclo estral e responsável pelo estabelecimento e manutenção da gestação (KAWAGUCHI et al., 2013 in press)¹. O CL é composto por células luteais grandes e pequenas, tecido vascular, células do sistema imunológico e da matriz extracelular (FARIN et al., 1986).

O primeiro evento associado com a formação do CL é a mudança da produção de E2 para a produção de P4 pelas células luteais (GIOMETTI et al., 2009). Após o

¹ KAWAGUCHI, S.; BOWOLAKSONO, A.; YOSHIOBA, S.; SAKUMOTO, R.; OKUDA, K. Luteoprotective mechanisms of prostaglandin F2 α stimulated hormone in the bovine corpus luteum. **The Journal of Reproduction and Development**. 2013. (In press)

pico pré-ovulatório de LH as concentrações circulantes de E2 diminuem 50% nas primeiras 5 horas e voltam a concentrações basais 9 horas após (CHENAULT et al., 1974). Essa inibição da esteroidogênese ocorre de forma coordenada, através da diminuição na expressão das enzimas P450 *side chain cleavage* (P450scc), 3-beta-hidroxiesteróide-desidrogenase (3 β -HSD) e P450 aromatase (P450arom) nas células da granulosa e da citocromo 450 17-alpha-hidroxilase (P450c17) e da 3 β -HSD nas células da teca até 18 horas após o pico pré-ovulatório de LH (VOSS; FORTUNE, 1993a,b). Diminuindo assim, as concentrações de androstenediona, testosterona e estradiol no fluido folicular (KOMAR et al., 2001).

A capacidade esteroidogênica da célula luteal não é a única responsável pelas concentrações de progesterona circulantes, sendo estas influenciadas pela quantidade de tecido esteroidogênico e pelo fluxo sanguíneo que existe no CL. Segundo Vasconcelos et al. (2001) vacas leiteiras que ovularam folículos maiores resultaram na formação subsequente de um maior CL com maiores concentrações séricas de progesterona, possivelmente devido ao aumento das células luteais secretoras.

O controle da angiogênese é crucial para o desenvolvimento e manutenção do CL e para a produção de P4 (FARIN et al., 1986). Há evidências de que fatores de crescimento estejam envolvidos nesses processos. O estabelecimento de uma nova vascularização durante o desenvolvimento precoce do CL envolve a interação dos sistemas dos fatores de crescimento do endotélio vascular (VEGFs) e dos fatores de crescimento fibroblásticos (FGFs; BERISHA et al., 2000). Injeções intraluteais de anticorpos específicos contra o VEGF e FGF durante o metaestro reduziu o volume do CL e as concentrações plasmáticas de P4 de vacas Holandesas (KAMADA et al., 2004; YAMASHITA et al., 2008).

Todos os componentes do sistema VEGF são encontrados durante o desenvolvimento do corpo lúteo bovino (BERISHA et al., 2000). Estudos com imunohistoquímica demonstraram que o VEGF é localizado nas células luteínicas grandes e pequenas em bovinos (ROBINSON et al., 2007). Enquanto a proteína VEGF é predominantemente encontrada nas células luteínicas, os seus receptores (VEGFR-1 e VEGFR-2) são encontrados nas células endoteliais, indicando que o VEGF deve agir na quimiotaxia das células endoteliais para a formação de novos vasos sanguíneos (SCHAMS; BERISHA, 2004). Além disso, este fator promove também a permeabilidade vascular no corpo lúteo bovino (ROBINSON et al., 2007).

A expressão gênica dos FGFs já foi confirmada no corpo lúteo bovino (BERISHA; SCHAMS, 2005). A presença do FGF-2 (também conhecido como FGF básico ou bFGF) no corpo lúteo bovino foi verificada por Van Wezel et al. (1995) por meio de imuno-histoquímica. No corpo lúteo, ele é localizado em maior quantidade nas células endoteliais na fase inicial do desenvolvimento luteínico, e exclusivamente nas células luteínicas na fase intermediária de desenvolvimento (SCHAMS et al., 1994).

As angiopoietinas (ANPT-1 e ANPT-2) e seus receptores tirosina quinase (Tie1 e Tie2) têm um importante papel na modulação da angiogênese no corpo lúteo (GOEDE et al., 1998). A angiopoietina-1 é necessária para manter e estabilizar os vasos sanguíneos (YANCOPOULOS et al., 2000). No entanto, os vasos estáveis são inadequados para a ativação da angiogênese. Um aumento na proporção angiopoietina-2/angiopoietina-1 desestabiliza a estrutura vascular e na presença de fator angiogênico, como o VEGF, reverte tecido endotelial para um estado mais plástico e permite a formação da rede vascular (YANCOPOULOS et al., 2000). Portanto, o equilíbrio no sistema angiopoietina é susceptível de desempenhar um papel importante no desenvolvimento do CL e na produção de P4.

Durante os dias 15 a 19 do ciclo estral, na ausência de um embrião viável ocorre um importante aumento da secreção endometrial de $\text{PGF}_{2\alpha}$, iniciando assim a luteólise (BINELLI et al., 2001; TANIKAWA et al., 2005). A regressão luteínica ocorre de duas formas sendo observado de imediato a luteólise funcional com a diminuição da P4 para concentrações basais dentro de 24 horas e a luteólise estrutural com a involução do tecido luteínico dentro de alguns dias (NISWENDER et al., 2000; DIAZ et al., 2002; SALES et al., 2007). Contudo, quando estabelecida a prenhez, a prostaglandina E1 desempenha importante função, prevenindo a conversão de PGE_2 em $\text{PGF}_{2\alpha}$, mantendo o corpo lúteo e evitando a queda de P4 (WEEMS et al., 2010). No reconhecimento materno da gestação em bovinos a principal proteína responsável por sinalizar para o organismo a presença do concepto é o interferon tau (INF_τ), o concepto deve se alongar de uma forma esférica para uma tubular e, então, adquirir a forma de filamento para produzir o INF_τ (SPENCER; OTT; BAZER, 1998). Esta citocina, produzida pelo concepto, age no endométrio inibindo o mecanismo luteolítico, por meio da ligação e da ativação dos seus receptores endometriais (KALUZ et al., 1996), prevenindo a síntese dos receptores de ocitocina (OT) e E2, e a consequente produção da $\text{PGF}_{2\alpha}$ luteolítica

(BAZER; SPENCER; OTT, 1997). Este efeito antiluteolítico do INF_τ resulta na manutenção do corpo lúteo e na continuidade da secreção de P4, essenciais para a manutenção do ambiente uterino requerido para a manutenção inicial da gestação (SPENCER et al., 2004).

A luteólise é desencadeada pelo aumento da amplitude dos pulsos de $\text{PGF2}\alpha$. Inicialmente, observam-se picos (2-3) de secreção que elevam a concentração plasmática de PGFM a valores $>100\text{-}125\text{ pg/mL}$. Subsequentemente, observa-se grande aumento da magnitude do pulso, e a PGFM alcança valores em torno de 550 pg/ml (GINTHER; SHREATA; BEG, 2010). Nesse momento, o fluxo sanguíneo ovariano e a síntese de P4, que já se encontram em declínio, apresentam súbita elevação por duas horas e voltam a declinar progressivamente até a P4 alcançar valores menores que $0,5\text{ ng/mL}$. Durante o período de declínio continuam acontecendo picos de secreção de $\text{PGF2}\alpha$, contudo a amplitude deles diminui progressivamente. Os pulsos sequenciais acontecem a cada 9-12 horas, duram, em média, quatro horas, e o processo todo tem duração aproximada de 30 h (MIYAMOTO et al., 2005; GINTHER et al., 2007, 2010; GINTHER; SHREATA; BEG, 2010).

A $\text{PGF2}\alpha$ estimula a secreção de OT pelo CL e a OT, por sua vez, estimula a secreção de $\text{PGF2}\alpha$ no útero. Esses dois hormônios compreendem um mecanismo de “feedback” positivo que atua entre o útero e o CL para reforçar a regressão luteal, iniciando a partir do dia 15 do ciclo estral, devido à expressão dos receptores endometriais de ocitocina (ROBINSON et al., 2001). Contudo, existem evidências de que, no início da fase lútea, a OT pode ser um importante fator luteotrópico (SHIRASUNA et al., 2007).

A expressão de mRNA para receptor de OT (OTR) no útero apresenta-se aumentada durante os dias 17 a 20 do ciclo estral (REKAWIECKI et al., 2010). O estradiol desempenha papel importante neste processo através dos estímulos endometriais, que aumentam a expressão de receptores para OT e estimulando a pulsatilidade de OT hipotalâmica (McCRACKEN; CUSTER; LAMSA, 1999). No CL existe a expressão de dois diferentes receptores de E2 ($\text{ER}\alpha$ e $\text{ER}\beta$) estes receptores apresentam níveis altos de expressão durante toda a fase lútea, no entanto durante a luteólise ocorre uma queda na expressão do $\text{ER}\alpha$, podendo este estar envolvido na luteólise estrutural (SHIBAYA et al., 2007).

A produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ endometrial é consequência da ligação da OT com seus receptores específicos no útero, que ativa a fosfolipase C e a liberação de inositol fosfatase (IP) e diacilglicerol (DAG), fazendo com que ocorra uma mobilização intracelular de Ca^{2+} , ocasionando o aumento da secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (DURAS et al., 2005).

A ligação da $\text{PGF}_{2\alpha}$ a seus receptores na membrana das células luteais esteroidogênicas estimula a atividade da proteína quinase C, que interrompe a produção de P4 de diversas maneiras: diminuindo a captação e o transporte de colesterol para o citoplasma e para a mitocôndria, promovendo retroalimentação negativa dos receptores de LH e, possivelmente, aumentando a expressão e a ativação das proteínas envolvidas nos processos de apoptose (revisado por BERTAN et al., 2006).

2.2 FISIOLOGIA E CICLICIDADE NO PÓS-PARTO

No final da gestação as concentrações circulantes de E2 e P4 apresentam-se altas, suprimindo a liberação de gonadotrofinas pela hipófise, ocorrendo à última emergência da onda folicular $21,6 \pm 2,4$ dias antes do parto (GINTHER et al., 1996a). Após o parto as concentrações circulantes dos hormônios esteroides diminuem rapidamente a níveis basais, possibilitando a síntese e a liberação do FSH pela hipófise na primeira semana após o parto (BEAM; BUTLER, 1997), proporcionando assim, um intervalo médio do parto até a emergência da primeira onda folicular de $4,0 \pm 0,9$ dias (variando de 2 a 7 dias; GINTHER et al., 1996a). Porém, para a ovulação do folículo dominante é necessário o re-estabelecimento e secreção pulsátil de LH na hipófise anterior e produção de estradiol do FD (BUTLER, 2003).

O folículo dominante da primeira onda folicular pós-parto possui três possíveis destinos, a ovulação, a atresia ou se tornar um folículo grande anovular (como um cisto folicular) dependendo das alterações fisiológicas (BUTLER, 2003; WILTBANK et al., 2011;). Para o FD ser capaz de produzir E2 suficiente e estimular um pico de LH e ovular, existe a necessidade de um pulso de LH por hora (CROWE, 2008). Em vacas leiteiras lactantes os principais fatores que afetam esta retomada da

pulsatilidade de LH incluem o escore de condição corporal (ECC) ao parto, o balanço energético negativo (ocasionados pela produção de leite e diminuição de ingestão de matéria seca), época do ano, paridade e doenças (BEAM; BUTLER, 1997; OPSOMER et al., 2000; WATHES et al., 2007).

A extensão do anestro pós-parto é afetada por vários fatores, tais como problemas de saúde e equilíbrio energético (SANTOS; RUTIGLIANO; SÁ FILHO, 2009), e pode variar de 18 a 24 dias até 60 a 90 dias. As vacas leiteiras estabuladas e alimentadas no cocho têm a retomada da ciclicidade em média $33,3 \pm 2,1$ dias após o parto (WILTBANK et al., 2006). A prevalência de vacas anovulares até 65 dias pós-parto é em média de 24,1% em rebanhos leiteiros americanos podendo variar de 18,6 a 41,2% entre os rebanhos (SANTOS; RUTIGLIANO; SÁ FILHO, 2009), esta grande variação pode ser atribuída a diferenças na qualidade, composição e disponibilidade de alimentos (WALSH; WILLIAMS; EVANS, 2011).

O atraso para a primeira ovulação pós-parto foi influenciado pela paridade, vacas primíparas apresentaram maior intervalo parto primeira ovulação ($31,8 \pm 8,3$ dias) do que as vacas múltíparas ($17,3 \pm 6,3$ dias) (TANAKA et al., 2008). Esse maior atraso para vacas primíparas podem estar relacionado a um maior BEN ocasionado pela demanda energética para o crescimento, bem como para a lactação quando comparada a vacas múltíparas (LUCY, 2001). As concentrações de insulina, IGF1 e GH no período pós-parto influenciam a retomada mais precoce da ciclicidade em vacas leiteiras (DISKIN; MURPHY; SREENAN, 2006).

O retorno tardio da atividade cíclica pós-parto em vacas leiteiras normalmente resulta em um menor desempenho reprodutivo do rebanho, ocasionadas pela baixa taxa de serviço, reduzida taxa de concepção e aumento do risco da perda gestacional (SANTOS; RUTIGLIANO; SÁ FILHO, 2009).

Segundo revisado por Crowe (2008) os dois principais problemas para o estabelecimento do ciclo estral normal são o prolongado intervalo parto primeira ovulação e a fase luteal prolongada. No caso do prolongado intervalo parto primeira ovulação as principais causas são a perda de ECC aguda até 60 dias pós-parto, cetose clínica, doenças clínicas, corrimento vaginal anormal e partos distócicos (OPSOMER et al., 2000). Na fase luteal prolongada ocasionada por um ambiente uterino anormal que interrompe a produção de prostaglandina, os principais fatores de risco são metrite, corrimento vaginal anormal, retenção de placenta, paridade e o re-estabelecimento da ciclicidade mais precoce (OPSOMER et al., 2000).

2.3 BALANÇO ENERGETICO NO PRÉ E PÓS-PARTO

Durante a fase final da gestação, as necessidades nutricionais do animal aumentam, devido a um maior aporte de nutrientes para o útero gravídico e a diminuição da ingestão de matéria seca (LEROY et al., 2008a). Após o parto, ocorre um drástico aumento na demanda de glicose, ácidos graxos e proteína para a síntese do leite (WATHES et al., 2007). Essas mudanças fisiológicas ocasionam um período prolongado de balanço energético negativo (BEN) durante ao qual o consumo de energia é inferior às exigências energéticas (BUTLER, 2003).

O BEN geralmente inicia alguns dias antes da parição, à medida que a ingestão de matéria seca diminui, e torna-se visível e aparente durante o início da lactação, através da perda do escore de condição corporal (BUTLER, 2000). Durante este período, ocorre grande mobilização das reservas corporais de tecido adiposo aumentando as concentrações de ácidos graxos não esterificados (AGNE) na corrente sanguínea (CHILLIARD; BOCQUIER; DOREAU, 1998; ADEWYUI; GRUYS; VAN EEDENBURG, 2005). No fígado os AGNE são oxidados em dióxido de carbono para fornecer energia para o animal, poupando a glicose preferencialmente utilizada pela glândula mamária para a produção de lactose (WATHES et al., 2007; LEROY et al., 2008a). No entanto, quando a produção de AGNE supera a capacidade hepática de oxidá-los, ocorre a formação de corpos cetônicos que também podem ser utilizados como fonte alternativa de energia pelo animal, dentre os quais se destaca o β -hidroxibutirato (BHB; SMITH et al., 1997).

Nos ruminantes a capacidade hepática de oxidação é relativamente baixa, assim o excesso de AGNE na circulação das vacas no pós-parto pode ser esterificado em triglicerídeos que são armazenados no fígado, podendo gerar a esteatose hepática (DRACKLEY, 1999). O acúmulo de triglicerídeos no parênquima hepático reduz a capacidade do fígado em detoxicar amônia em ureia (STRANG et al., 1998), resultando na diminuição da capacidade de gliconeogênese hepática a partir do propionato, o principal precursor de glicose em ruminantes (OVERTON; DRACKLEY; OTTEMANN-ABBAMONTE, 1999).

Praticamente nenhuma glicose escapa a fermentação ruminal, assim os ruminantes têm alta dependência da gliconeogênese no fígado para a produção de glicose. O hormônio do crescimento (GH) é um hormônio chave para a produção de glicose, pois estimulam as enzimas gliconeogênicas (KNAPP et al., 1992). Durante o pós-parto de vacas Holandesas as concentrações de GH no sangue estão aumentadas, mas as concentrações de glicose estão baixas (hipoglicemia), ocasionadas pelo alto consumo de glicose pela glândula mamária para produção de leite (LEROY et al., 2008a; LUCY et al., 2009). As altas concentrações de GH no pós-parto induz a um estado de insulinoresistente, preservando a glicose para a síntese de lactose mamária (HAYIRLI, 2006). As baixas concentrações sanguíneas de glicose resultam em baixas concentrações de insulina no sangue (LUCY, 2001). Esta hipoinsulinemia atua como um potente ativador da lipólise (LEROY et al., 2008a), juntamente com o GH que antagoniza a atividade antilipolítica da adenosina e estimula a atividade lipolítica das catecolaminas (HOUSEKNECHT; BAUMAN, 1997; LANNA; BAUMAN, 1999).

Durante o período de BEN as concentrações de GH no sangue estão aumentadas, mas as concentrações de IGF1 apresentam-se baixas ocasionadas pela baixa expressão do receptor de GH 1A (GHR 1A) no fígado, esse estado refratário do fígado ao GH representa o desacoplamento do eixo somatotrópico (LUCY et al., 2009). O IGF1 é produzido no fígado e controla a secreção do GH no hipotálamo/hipófise através de “feedback” negativo (LE ROITH et al., 2001). Além de atuar no “feedback” negativo do GH o IGF1 controla o crescimento e a função de células e tecidos em todo o corpo, através de um mecanismo endócrino (JONES; CLEMMONS, 1995).

Para que ocorra o reacoplamento do eixo somatotrópico, o incremento nas concentrações de insulina é fundamental, através dos seus efeitos positivos na expressão do GHR 1A no fígado. Esses dados foram demonstrados por Butler et al. (2003) que observaram aumento na expressão de RNAm para GHR e IGF1 no fígado e elevação das concentrações circulantes de IGF1 quando infundiu-se insulina em vacas Holandesas pós-parto. Existe uma relação fisiológica entre a glicose e a insulina (a glicose estimula a secreção de insulina), sendo assim, a glicose também pode apresentar um importante papel no reacoplamento do eixo somatotrópico (LUCY, 2007).

As mudanças metabólicas sanguíneas e a síntese de hormônios ligados ao metabolismo são utilizadas para avaliar a relação entre a nutrição e a reprodução (HESS et al., 2005). A maioria dos estudos concentra-se em avaliar os efeitos do BEN sobre os hormônios do eixo hipotálamo-hipófise-ovários, sendo menos estudados os possíveis efeitos diretos dos metabólicos, tais como as concentrações baixas de glicose e elevadas de BHB e AGNE (LEROY et al., 2008b). Leroy et al. (2004) verificaram que a constituição do fluido folicular de vacas de alta produção está diretamente associada às mudanças bioquímicas séricas durante o BEN. Desta forma, o aumento de BHB e AGNE séricos durante o BEN pode interferir negativamente na qualidade do oócito, induzindo apoptose e necrose das células da granulosa (LEROY et al., 2005). Sendo assim, o efeito da alta concentração de BHB e AGNE na qualidade do oócito pode ser um dos fatores pelos quais o BEN exerce efeito negativo na fertilidade de vacas durante o período pós-parto inicial (LEROY et al., 2008b).

Outro hormônio metabólico importante na reprodução é a insulina, responsável por estimular o transporte da glicose para dentro das células por proteínas (GLUT) presentes na membrana plasmática. Dessa forma, semelhante à glicose, a insulina tem papel importante no metabolismo energético celular (LAWRENCE; MCKERN; WARD, 2007). Além disso, a insulina apresenta efeitos anticetogênicos que podem interferir positivamente na eficiência reprodutiva durante o BEN. A insulina reduz a produção de AGNE pelo fígado, estimula a lipogênese, inibe a lipólise, aumenta a utilização de corpos cetônicos em tecidos periféricos e diminui tanto a disponibilidade de substrato como a atividade de enzimas hepáticas responsáveis pela cetogênese (BROCKMAN; LAARVELD, 1986).

A associação entre a baixa fertilidade de vacas de leite durante o BEN no pós-parto e as concentrações de insulina e IGF-1 já foi evidenciada (BEAM; BUTLER, 1998). Gong et al. (2002a) observaram que maiores concentrações de insulina no período pós-parto inicial antecipam a primeira ovulação em vacas de leite de alta produção. Nesse estudo, duas dietas isoenergéticas foram formuladas para estimular ou diminuir as concentrações plasmáticas de insulina em vacas de alto ou baixo mérito genético. O intervalo parto/primeira ovulação e a retomada dos ciclos estrais normais no pós-parto foram maiores nas vacas de alta produção, atribuído a baixas concentrações de insulina circulante nessa categoria animal. Além disso, não foram observadas diferenças nas concentrações plasmáticas basais de

gonadotrofinas e nos padrões de desenvolvimento folicular ovariano. Vacas alimentadas com dietas ricas em amido apresentam alta concentração plasmática de insulina, essa elevada concentração de insulina até o início da ciclicidade pós-parto incrementou as taxa de prenhez de vacas até 120 dias em lactação (GARNSWORTHY et al., 2009). Um grande número de estudos *in vitro* demonstra que a secreção das células da granulosa e da teca são dependentes da ação da insulina (GUTIERREZ; CAMPBELL; WEBB, 1997; LUCY, 2000; SPICER; CHAMBERLAIN; MACIEL, 2002; ARMSTRONG; GONG; WEBB, 2003). A insulina exerce um papel importante no fornecimento de energia para as células e seu desequilíbrio pode interferir direta ou indiretamente na qualidade do oócito.

Os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) são produzidos principalmente no fígado e o GH é o principal regulador da expressão do gene e secreção de IGF-1 hepático (ETHERTON; BAUMAN, 1998). Os IGFs são essenciais para desencadear e manter o crescimento folicular, pois participam de mecanismos reguladores das células foliculares e formação do corpo lúteo. Ainda, atuam sinergicamente com o FSH e LH regulando a proliferação e diferenciação das células da granulosa e da teca (ARMSTRONG et al., 2002). Na esteroidogênese o IGF-1 também tem papel importante agindo sinergicamente com o FSH, aumentando a atividade da aromatase P450 (ECHTERNKAMP et al., 1994).

Semelhante à insulina, existe uma relação entre as mudanças na concentração de IGFs, induzidas por fatores nutricionais, e a atividade ovariana (WEBB et al., 2004). Em vacas de leite, a baixa ingestão de matéria seca próxima ao parto está associada à redução da concentração de IGF-1, por diminuir a expressão de receptores de GH no fígado (KOBAYASHI et al., 2002). Vários estudos descrevem os efeitos da concentração circulante dos IGFs na reprodução, podendo ser positivos ou negativos (KIRBY et al., 1993; ARMSTRONG; GONG; WEBB, 2003; LEON et al., 2004; LEROY et al., 2008a).

Desta maneira as concentrações de insulina, de glicose e de IGF-1 no pós-parto possuem um papel importante no desenvolvimento do corpo lúteo e folículos, na involução uterina e no desenvolvimento do concepto de vacas Holandesas em lactação (LUCY, 2008).

2.4 ASPIRAÇÃO FOLICULAR E PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

A expressão produção *in vitro* de embriões (PIVE) é usada para designar um conjunto de procedimentos realizados em laboratório, incluindo etapas de maturação, fertilização e cultivo, pelos quais oócitos imaturos são utilizados para a produção de embriões (VIANA et al., 2010).

A PIVE foi desenvolvida como uma alternativa para a produção de embriões *in vivo* por superovulação (SOV, BOUSQUET et al., 1999). Em 1982, Brackett et al. relataram o nascimento do primeiro bezerro por esta técnica e em 1988 Pieterse et al. adaptaram a partir da técnica usada em humanos a aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassonografia que posteriormente foi denominada “Ovum pick-up” (OPU; PIETERSE et al., 1991). Desde então estas técnicas veem sendo utilizadas e atualmente são consideradas técnicas consolidadas. Estima-se que mais de 200.000 bezerros tenham nascido a partir da associação destas duas técnicas em todo o mundo até 2005 e números como 50 bezerros a partir de uma única doadora são obtidos sem extremas dificuldades, embora com uma grande variação entre as doadoras (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, 2006).

Até o final da década de 90, a PIVE no Brasil era uma atividade basicamente restrita a laboratórios de pesquisa e, portanto, sem expressão comercial. Por ser um processo tecnicamente complexo e com elevado custo de implantação, estimava-se que a produção de embriões em laboratório seria utilizada de forma restrita, ocupando apenas nichos específicos de mercado. Entretanto, em um período de apenas cinco anos o país tornou-se o maior produtor mundial e referência no uso de PIVE em bovinos (VIANA et al., 2010).

Historicamente, duas abordagens principais têm sido utilizadas para aperfeiçoar a recuperação do complexo cúmulus-oócito (CCO), objetivando estudar os fatores físico/mecânicos envolvidos e consequentes aprimoramentos nos equipamentos utilizados para aspiração e estudar o controle dos fatores relacionados ao desenvolvimento e maturação intra-ovarianos de folículos e oócitos (BOLS et al., 1997). A primeira abordagem foi a mais explorada e levou ao desenvolvimento ou adaptação de uma gama de opções em sistemas de aspiração folicular. Entretanto, considerando-se os índices atualmente obtidos nas etapas de laboratório, o sucesso da produção *in vitro* de embriões está diretamente relacionado

ao número e qualidade dos CCO que são destinados ao cultivo (VIANA; BOLS, 2005).

A reserva de oócitos é estabelecida durante a vida fetal, sendo gradualmente mobilizada durante a vida reprodutiva (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Parece haver uma relação entre tamanho da reserva de folículos primordiais e a proporção de folículos que iniciam seu desenvolvimento (HIRSHFIELD, 1994). Desta forma, o número de folículos em fase antral observado durante o ciclo estral pode refletir, pelo menos em parte, a reserva de folículos primordiais presente (GÜLEKLI et al., 1999). Variações significativas no número de folículos em desenvolvimento nos ovários são relatadas entre indivíduos e entre raças (BONI et al., 1997), e a reserva ovariana poderia ser a chave para explicar diferenças nos resultados de SOV e PIVE obtidos em determinados grupos genéticos. Entretanto, diferentes fatores podem interferir no número de folículos recrutados, como balanço energético, perfil metabólico, condição corporal e condições ambientais (VIANA; BOLS, 2005).

A quantidade média de folículos recrutados no início da onda folicular em *Bos taurus* é de $22,1 \pm 1,3$ (GIMENES, 2010), esta população folicular está associada às concentrações circulantes de insulina e IGF1 (SARTORI et al., 2010). Segundo Pontes et al. (2010) em um estudo de campo com 1138 aspirações foliculares em animais da raça Holandesa a média de oócitos totais recuperados foi de $11,4 \pm 3,9$ e de oócitos viáveis foi de $8,0 \pm 2,7$. A categoria animal pode influenciar no número de folículos recrutados, oócitos totais recuperados e oócitos viáveis em vacas leiteiras. Resultados observados por Rizos et al. (2005) demonstraram um maior número de folículos visualizados (10,4 vs 7,8), oócitos totais recuperados (4,7 vs 2,8) e oócitos viáveis (3,0 vs 1,8) para novilhas Holandesas quando comparado a vacas no início do pós-parto. Entretanto, Ferreira et al. (2011) não observaram diferenças na quantidade de oócitos totais (12,5 vs 10,9) e oócitos viáveis (8,4 vs 8,0) comparando novilhas Holandesas e vacas no início da lactação durante o período de inverno, mas no período de verão as novilhas apresentaram maior número de oócitos totais (11,8 vs 6,3) e oócitos viáveis (9,4 vs 4,3). Recentemente estudos que aspiraram vacas Holandesas no início da lactação reportaram uma média de 10,4 a 13,8 folículos visualizados, 3,5 a 13,8 oócitos totais recuperados e 1,8 a 6,6 oócitos viáveis (RIZOS et al., 2008; GANDRA, 2012; MATOBA et al., 2012).

A taxa de recuperação de oócitos por OPU pode sofrer grande variação, podendo ser influenciada pela qualidade da visualização dos folículos (BOLS et al.,

2004), pelo tipo e diâmetro da agulha, nível de vácuo da aspiração (BOLS et al., 1996, 1997) e pela experiência do técnico (SCOTT et al., 1994). As taxas de recuperação oscilam entre 32,0% a 96,4% em *Bos taurus* (ROTH et al., 2001; BILBY et al., 2006; FOULADI-NASHTA et al., 2007; RIZOS et al., 2008).

O sucesso da OPU-PIVE está estritamente relacionado à competência dos oócitos para a produção de embriões *in vitro* (GALLI et al., 2001). Desta forma, a competência oocitária pode ser caracterizada por alguns eventos chave, dentre eles: o reinício da meiose, a ativação da clivagem após a fertilização, o desenvolvimento a estágio de blastocisto, a indução de prenhez, a capacidade de leva-la a termo e o desenvolvimento saudável a termo (SIRARD et al., 2006). Porém, o critério frequentemente utilizado pela maioria dos laboratórios é o desenvolvimento a blastocisto, uma vez que oócitos incompetentes são bloqueados na transição materno-zigótica, que ocorre no estágio de 8 células em bovinos, devido à incapacidade de ativar o genoma embrionário (SIRARD et al., 2006).

As taxas de blastocistos podem variar conforme a categoria animal (RIZOS et al., 2005; FERREIRA et al., 2011) e a estação do ano (AL-KATANI; PAULA-LOPES; HANSEN, 2002; FERREIRA et al., 2011). A produção de blastocisto *in vitro* pode variar entre 3,0 a 28,9% em animais *Bos taurus* (BOLS et al., 1998; RIZOS et al., 2005; BILBY et al., 2006; FOULADI-NASHTA et al., 2007; RIZOS et al., 2008; GIMENES, 2010; PONTES et al., 2010; FERREIRA et al., 2011; RATTO et al., 2011; SALES, 2011; GANDRA, 2012; MATOBA et al., 2012).

Com relação ao intervalo de OPUs alguns estudos em bovinos mostram melhores resultados quando os animais são aspirados com menores intervalos (duas vezes por semana) para a quantidade e/ou qualidade dos oócitos (GALLI et al., 2001; MERTON et al., 2003; VIANA et al., 2004). No entanto, alguns estudos não demonstram diferenças na qualidade e quantidade de oócitos quando comparada aspirações uma ou duas vezes por semana (PETIYM et al., 2003; RAMOS et al., 2010).

Em um estudo realizado em búfalos com aspirações realizadas duas vezes por semana, Sà Filho et al. (2009) observaram uma redução no número de folículos visualizados e de oócitos recuperados das cinco primeiras sessões para as últimas cinco sessões de OPU. Estes autores acreditam que o curto intervalo entre as aspirações podem ter causado alterações funcionais e morfológicas nos ovários que prejudicaram as aspirações. Quanto maior o número de folículos visualizados para

aspiração maior o risco de lesão dos ovários podendo reduzir o número de folículos e de oócitos recuperados por aspiração folicular (VIANA et al., 2003).

3 HIPÓTESE

1) Vacas Holandesas com maiores concentrações de ácidos graxos não esterificados (Alto AGNE) apresentam maior concentração sanguínea de BHB, menor concentração sanguínea de glicose, menor número de folículos visualizados, de oócitos totais e de oócitos viáveis recuperados após a aspiração folicular (OPU). Além disso, apresentam comprometimento na qualidade oocitária e na produção *in vitro* de embriões quando comparadas as vacas com Baixo AGNE (Figura 1).

2) Ainda, ocorre diminuição das concentrações sanguíneas de AGNE e BHB e aumento da glicose, bem como melhora da qualidade oocitária e da produção *in vitro* de embriões conforme o aumento dos dias pós-parto em vacas Holandesas.

Figura 1 – Modelo hipotético da influência da concentração de AGNE 44 dias pós-parto, nos parâmetros metabólicos qualidade e competência oocitária em vacas Holandesas no início da lactação (até 90 dias pós-parto)

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente estudo teve como objetivo avaliar a qualidade e competência oocitárias de vacas Holandesas no início da lactação (até 90 dias após o parto) conforme as concentrações de AGNE 44 dias após o parto.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar:

- ✓ As concentrações sanguíneas de AGNE, BHB e glicose,
- ✓ O número de folículos visualizados,
- ✓ O número de oócitos totais e viáveis recuperados por OPU,
- ✓ A qualidade dos oócitos (grau I, II e III),
- ✓ O número de oócitos clivados e de blastocisto/vaca
- ✓ A taxa de clivagem e de blastocistos.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 LOCAL E ANIMAIS DO EXPERIMENTO

O experimento foi realizado de julho a setembro de 2011 na Fazenda Santa Rita (Agrindus/SA), localizada no município de Descalvado - SP. Durante o período experimental o rebanho possuía cerca de 1.400 vacas em lactação com produção diária de 48.000 litros de leite (média diária de 34,3 litros por vaca). No presente estudo foram utilizadas 30 vacas Holandesas, preto e branco (HPB) em lactação (primíparas $n = 9$, secundíparas $n = 10$ e pluríparas $n = 11$). As vacas foram ordenhadas três vezes ao dia em intervalos de 8h e alimentadas com dieta balanceada para atender ou exceder os requisitos mínimos nutricionais para bovinos leiteiros (NRC, 2001). Os animais permaneceram alocados em galpões (free-stall) com água *ad libitum* e camas com areia, às quais possuíam livre acesso. O escore de condição corporal (ECC) foi avaliado no momento das aspirações foliculares em intervalo de 14 dias, utilizando o sistema de 5 pontos: 1 = magra a 5 = obesa (FERGUSON; GALLIGAN; THOMSEN, 1994). Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

5.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

As vacas foram selecionadas conforme a data do parto. Foram utilizados no experimento, 14 animais que pariram durante a semana do dia 20/06 a 26/06/11 e 16 animais que pariram na semana do dia 04/07 a 10/07/11. As aspirações foliculares foram realizadas a cada 14 dias, em momento aleatório do ciclo estral, começando quando os animais apresentavam intervalo de 30 ± 3 dias em lactação. Todas as vacas passaram por cinco sessões de OPU, realizadas nos dias 30 ± 3 ; 44 ± 3 ; 58 ± 3 ; 72 ± 3 e 86 ± 3 após o parto (Figura 2).

Figura 2 – Desenho experimental das aspirações foliculares realizadas nas vacas Holandesas em diferentes momentos pós-parto

Os grupos experimentais foram estabelecidos de acordo com as concentrações plasmáticas de ácidos graxos não esterificados (AGNE) no dia 44 pós-parto, como descrito por Chapinal et al. (2012) e Matoba et al. (2012). Estabeleceram-se os grupos Alto AGNE ($> 0,498$ mmol/L; $n=13$) e Baixo AGNE ($< 0,498$ mmol/L; $n=13$). Quatro animais foram excluídos do experimento por apresentarem problemas de saúde durante o período experimental (1 vaca com endometrite, 1 vaca com aderência do ovário direito e 2 vacas com problemas graves de locomotor).

5.3 ASPIRAÇÃO FOLICULAR GUIADA POR ULTRASSONOGRAFIA

Todas as aspirações foliculares foram realizadas pelo mesmo técnico. No dia da aspiração folicular, as doadoras foram contidas em brete apropriado. Após a contenção, realizou-se a remoção manual de fezes da ampola retal, higienização com água da região posterior dos animais, utilização de álcool 70% na vulva e secagem com papel toalha. Com o animal contido e higienizado, procedeu-se a anestesia epidural, realizada no espaço entre a última vértebra sacral e primeira coccígea, utilizando volume de 3 a 5 mL de lidocaína a 2% sem vasoconstritor (Lidovet®, Bravet). Em seguida, a probe microconvexa com frequência 5,0 MHz (D-

500, Aloka) foi introduzida até o fundo de saco da vagina com o auxílio de uma guia de aspiração folicular (Guia de aspiração folicular, WTA, Brasil). Previamente às aspirações para PIVE, os ovários foram examinados por ultrassonografia para contagem e classificação dos folículos em três categorias: pequenos (2-5 mm), médios (6-10 mm) e grandes (>10 mm).

As punções foliculares foram realizadas por linha de aspiração de teflon de 1,7 mm de diâmetro e 80 cm de comprimento (Linha de aspiração, WTA, Cravinhos, SP, Brasil), acoplada a uma agulha descartável 20 gauge (WTA, Cravinhos, SP, Brasil) e inserido em uma guia de aspiração folicular. Todo o sistema de aspiração foi submetido à pressão negativa entre 10 a 15 mL de água/ minuto (60 a 70 mmHg) produzida por uma bomba de vácuo com aquecedor de tubo de 50 mL (WTA, Cravinhos, SP, Brasil). Todos os folículos visíveis (≥ 2 mm) foram puncionados e seus conteúdos direcionados para tubo plástico de 50 mL (TPP, Trasadingen, Suíça) que previamente continha 10 mL de meio *Dulbecco's Modified Phosphate Buffered Saline* (DMPBS®, Nutricell Nutrientes Celulares, Campinas, SP, Brasil) e 125 UI de heparina sódica/mL (Liquemine®, Roche, São Paulo, SP, Brasil) a temperatura entre 35 e 36°C. O tubo contendo o material aspirado foi conduzido ao laboratório de campo e o seu conteúdo foi vertido em filtro para coleta de oócitos com malha de 80 μ m (WTA, Cravinhos, SP, Brasil). O conteúdo do filtro foi lavado com DMPBS até obtenção de um líquido translúcido com o sedimento contendo os oócitos recuperados. Após a filtração, o conteúdo presente no filtro foi transferido para placas de cultivo celular de 100 x 20 mm (TPP) contendo DMPBS para busca, avaliação e seleção dos complexos cúmulus-oócitos (CCOs) sob estereomicroscópio (Olympus, SZ40, Washington, EUA).

Os critérios considerados para a avaliação dos CCOs foram o aspecto do citoplasma quanto à cor, homogeneidade e integridade, bem como a presença, o número de camadas e o grau de compactação das células do *cumulus* (LEIBFRIED; FIRST, 1979). Os CCOs classificados como grau I, grau II e grau III com três ou mais camadas intactas de células do cumulus foram considerados viáveis, enquanto os demais (desnudo, atresico e degenerado) foram classificados como grau IV. Todos os CCOs obtidos por animal foram quantificados e utilizados para o cálculo das estruturas totais.

Os CCOs selecionados foram colocados em uma gota de meio em placa 35 x 10 mm, classificados e, posteriormente, acondicionados em criotubos plásticos de 2

mL (Corning, Corning, NY, EUA) contendo 400 μ L de meio de maturação *in vitro* (MIV), o qual era composto de *Tissue Culture Medium* 199 (TCM 199) com sais de Earle, L-glutamina e 2,2g/L de bicarbonato de sódio (referência 11.150-059, Invitrogen, Rockville, MD, EUA) acrescido de 10% de soro de vaca em cio (SVC), 20 μ g/mL de FSH (Pluset®, Hertape Calier, Barcelona, Espanha), 49,4 μ g/mL de Piruvato (0,45 mM), 100 UI/mL penicilina e 0,1 mg/mL de estreptomicina cobertos com 200 μ L de óleo mineral (Sigma, St Louis, MO, EUA) e gaseificados com mistura primária de 5% de CO₂, 5% de O₂ e balanço em N₂. A gaseificação foi realizada com pressão ajustada para 5-10 psi para injeção da mistura gasosa por meio de mangueira de silicone acoplada a filtro 0,22 μ m e agulha 21G. Em seguida, os criotubos com os CCOs foram mantidos em temperatura de 38°C durante o transporte em incubadora portátil (MINITUBE®) ao laboratório Bioembryo (Bauru, SP). Em seguida, os criotubos foram colocados com tampa semi-aberta em incubadora (Forma Scientific®, Mod. 3130, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) a 38,5°C com 5% de CO₂ em ar e umidade saturada. Contudo, vale ressaltar que a MIV iniciou-se a partir da alocação dos CCOs nos criotubos.

5.4 PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES

Todos os procedimentos para a produção *in vitro* de embriões foram realizados no laboratório da Bioembryo no município de Bauru – SP. Os complexos *cúmulus*-oócitos foram submetidos à MIV por 22 a 24 horas. Após a maturação, os CCOs selecionados foram fertilizados com espermatozoides sexados (fêmeas) descongelados (palheta de 0,25 mL) de um único touro. Em todas as FIV foram utilizadas palhetas da mesma partida de sêmen (Alta Ross Sex, touro da raça Holandesa, partida 10SEP10). O sêmen foi descongelado em banho-maria a 37°C por 30 segundos e colocado em tubo de 2 mL (Axygen, Union City, CA, EUA) sob camadas de soluções com diferentes gradientes de Percoll (45% e 90%, 400 μ L cada; Nutricell). Para a separação dos espermatozoides viáveis, o tubo foi centrifugado por 5 minutos a 10.000 rpm, removido o sobrenadante e o sedimento ressuspensionado em 400 μ L de meio Fert-TALP e submetido a outra centrifugação por 3 minutos a 10.000 rpm. Após esta última centrifugação, o sedimento foi

ressuspendido em 100 µL de meio Fert-TALP acrescido de heparina (10 UI/mL; Sigma). Antes e após o processamento por gradiente de Percoll, foram realizadas avaliações da motilidade espermática e vigor. A fecundação *in vitro* foi realizada em gotas de 100 µL de meio Fert-TALP acrescido de 10 UI/mL de heparina, cobertas com óleo mineral (Sigma; GORDON, 2004), com concentração espermática ajustada para 2×10^6 espermatozoides/mL por um período aproximado de 18-20 horas.

Os possíveis zigotos foram cocultivados em células do cumulus autólogas (desnudamento parcial por meio de pipetagens) em meio SOFaaci acrescido de 5% de SFB (HOLM et al., 1999) em gotas de 50µL cobertas com óleo mineral (Sigma). A avaliação da taxa de clivagem e a renovação de 50% do meio (*feeding*) foram realizadas 72 horas pós-fecundação (D3). A taxa de produção de blastocistos foi avaliada 168 horas pós-fecundação (D7). Todas as etapas foram realizadas em estufa incubadora, nas mesmas condições da maturação *in vitro*. Foram utilizados grupos de 15 a 30 oócitos por gotas de fecundação e cultivo.

5.5 COLHEITA DE SANGUE E ANALISE METABÓLICA

As colheitas de sangue foram realizadas concomitantes às aspirações foliculares (intervalos de 14 dias; 30, 44, 58, 72 e 86 dias pós-parto) para avaliação metabólica. As amostras de sangue foram colhidas da artéria ou veia coccígea em tubos de vácuo de 10 ml (Vacutainer®), sendo realizadas sempre após a ordenha. Durante as colheitas, o sangue foi mantido em caixa de isopor com gelo e, então, conduzido ao laboratório. O plasma foi separado por centrifugação (3000 rpm, Centrífuga Excelsa Baby®, Fanem, Brasil) durante 15 minutos. O plasma separado foi acondicionado em tubos (Tubos Eppendorf 3810X standard®, Eppendorf, Alemanha) com identificação e em seguida, armazenados em freezer a -20°C até posterior análise.

Na avaliação metabólica, foram analisadas as concentrações de glicose, BHB e AGNE. As análises laboratoriais dos metabólitos plasmáticos foram realizadas por meio de kits comerciais, que utilizam o método enzimático colorimétrico de ponto final (glicose e β-hidroxibutirato) que foram analisados em aparelho automático para bioquímica sanguínea (sistema de bioquímica sanguínea SBA-200, CELM). As

análises de ácidos graxos não esterificados foram realizadas em aparelho leitor de microplacas (ELISA). As análises foram realizadas no LPBL-VNP-FMVZ-USP.

Os resultados de glicose foram expressos em mg/dL e os resultados de β -hidroxibutirato e ácidos graxos não esterificados foram expressos em mmol/L.

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os grupos experimentais foram estabelecidos de acordo com as concentrações plasmáticas de ácidos graxos não esterificados (AGNE) no dia 44 pós-parto. Após a análise bioquímica das amostras de plasma, os valores de AGNE deste momento foram dispostos em ordem crescente, de forma que a mediana servisse para dividir as vacas em dois grupos: Alto AGNE ou Baixo AGNE. Assim, as vacas pertencentes a cada um dos dois grupos no dia 44 pós-parto se mantiveram no mesmo grupo em todos os outros momentos da aspiração folicular (30, 58, 72 e 86 DEL).

A estatística descritiva dos dados, representada pelas médias aritméticas de cada tratamento e os coeficientes de variação (CV), foi obtida pelo procedimento *Means* do programa SAS versão 9.2 (SAS/STAT, SAS Institute Inc., Cary, NC). As variáveis respostas foram avaliadas como medidas repetidas no tempo, referentes aos momentos de aspiração folicular (tempo) de acordo com cada tratamento (NEFA alto e NEFA baixo), utilizando-se o comando *Repeated* gerado pelo procedimento *GLM* do SAS. Quando a premissa de esfericidade não foi respeitada ($P < 0,05$), as probabilidades de tempo (P tempo) e das interações dos tratamentos com o tempo (P trat*tempo) foram corrigidas pelo teste de Greenhouse-Geisse Epsilon.

Os testes de normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias para as variáveis respostas foram realizados por meio do *Guided Data Analysis* do SAS. Os dados que não preencheram os pressupostos para a análise de variância (ANOVA) foram transformados em conformidade. A comparação entre as médias das variáveis contínuas e binomiais dos grupos dentro de cada tempo (trat/tempo) foi realizada por meio do teste de médias *Least Square Means* (LSMeans), por meio do procedimento *Glimmix* do SAS. Foi utilizado o nível de significância de 5% para todos os testes realizados.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 AVALIAÇÃO DOS PARAMETROS METABÓLICOS

As concentrações plasmáticas de AGNE, BHB e glicose conforme o grupo experimental (Alto AGNE ou Baixo AGNE) estão apresentadas nas tabelas 1, 2 e 3 respectivamente. Para a concentração de AGNE no plasma, verificou-se interação entre tratamento e tempo ($P < 0,0001$). A concentração de AGNE aumentou de 30 para 44 dias pós-parto no grupo Alto AGNE. No entanto, no grupo de Baixo AGNE observou-se diminuição na concentração de AGNE do dia 30 para o dia 44 pós-parto (Figura 3). Além disso, observou-se efeito de tratamento ($P = 0,006$; Tabela 1). Porém, não foi observado efeito de tempo ($P=0,12$; Tabela 1).

Tabela 1 - Concentrações plasmáticas de AGNE (mmol/L) em vacas Holandesas no início da lactação. Vacas do grupo Alto AGNE e do grupo Baixo AGNE - Descalvado, SP - 2011

TEMPO (DEL)	TRATAMENTO		MÉDIA	CV (%)	P
	Alto AGNE (n=13)	Baixo AGNE (n=13)			
30±3	0,56	0,65	0,60	44,87	0,77
44±3	1,00	0,30	0,65	70,44	< 0,0001
58±3	0,51	0,46	0,49	63,43	0,52
72±3	0,47	0,43	0,45	37,32	0,64
86±3	0,51	0,43	0,47	56,38	0,47
MÉDIA	0,61	0,46			

Valor de $P_{trat} = 0,006$; $P_{tempo} = 0,12$; $P_{trat*tempo} < 0,0001$

No início da lactação ocorre redução na lipogênese e aumento da lipólise. Com isso, as reservas de gordura corporal são mobilizadas sob a forma de AGNE para suprir as necessidades energéticas (LOMANDER et al., 2012). Sendo assim, as concentrações plasmáticas de AGNE são mais elevadas logo após o parto,

diminuindo conforme aumenta os dias em lactação (MATOBA et al., 2012). A duração média do BEN pós-parto é de 45 dias com um desvio padrão de 21 dias (CHAPINAL et al., 2012).

Os animais do grupo Alto AGNE apresentaram maior concentração média de AGNE durante todo o período experimental, quando comparado ao grupo Baixo AGNE. Animais com BEN, com elevadas concentrações de AGNE no pós-parto, possuem maior risco de doenças no período periparto (OSPINA et al., 2010a), diminuição da produção de leite (OSPINA et al., 2010b) e comprometimento da fertilidade no início da lactação (WALSH et al., 2007; OSPINA et al., 2010b). Esse efeito na fertilidade pode ser decorrente das alterações no eixo hipotalâmico-hipofisário-ovariano (WEBB et al., 2004) ou da ação direta dos metabolitos na competência oocitária (LEROY et al., 2005).

Figura 3 - Concentrações plasmáticas de AGNE conforme os níveis de AGNE 44 dias após o parto (grupo Alto ou Baixo AGNE) em vacas Holandesas

No presente experimento, verificou-se que não houve interação entre tratamento e tempo ($P=0,83$; Figura 4), para as concentrações de β -hidroxibutirato (BHB) no plasma. Verificou-se também que não houve efeito de tempo ($P=0,11$;

Figura 4) e de tratamento ($P=0,20$; Figura 4). Apenas, observou-se tendência de diferença para as concentrações de BHB no dia 72 pós-parto ($P=0,06$; Tabela 2), apresentando maiores concentrações de BHB no grupo de Baixo AGNE. Foi observada também correlação negativa ($P<0,0001$) entre as concentrações de BHB e as concentrações de glicose ($r = -0,35$).

Tabela 2 - Concentrações plasmáticas de BHB (mmol/L) em vacas Holandesas no início da lactação. Vacas do grupo Alto AGNE e do grupo Baixo AGNE - Descalvado, SP – 2011

TEMPO (DEL)	TRATAMENTO		MÉDIA	CV (%)	P
	Alto AGNE (n=13)	Baixo AGNE (n=13)			
30±3	0,49	0,59	0,54	59,96	0,75
44±3	0,42	0,45	0,43	47,35	0,51
58±3	0,41	0,46	0,43	30,48	0,34
72±3	0,45	0,58	0,52	37,74	0,06
86±3	0,50	0,53	0,51	53,40	0,29
MÉDIA	0,45	0,52			

Valor de $P_{trat} = 0,20$; $P_{tempo} = 0,11$; $P_{trat*tempo} = 0,83$

O BHB é o principal corpo cetônico derivado da oxidação parcial do AGNE no fígado (SMITH et al., 1997). Quando a capacidade de oxidação do AGNE no fígado é superada, ocorre aumento do BHB no plasma (DRACKLEY et al., 2005). Nesse caso, esses corpos cetônicos podem ser utilizados como fonte de energia pelo músculo, poupando a glicose para a produção de leite (LOMANDER et al., 2012).

Na análise da concentração plasmática de glicose não se verificou interação entre tratamento e tempo ($P=0,37$; Figura 5). Não houve diferença estatística entre os tratamentos ($P=0,26$; Tabela 3). Porém, o grupo de Baixo AGNE tendeu a apresentar maiores concentrações de glicose no dia 86 pós-parto ($P=0,06$; Tabela 3). Foi observado efeito de tempo ($P=0,03$; Figura 5), ocorrendo aumento das concentrações de glicose conforme aumentou os dias em lactação (DEL). Ainda, houve correlação negativa ($P=0,0009$) entre as concentrações plasmáticas de glicose e o número de partos ($r = -0,29$).

Tabela 3 - Concentrações plasmáticas de glicose (mg/dL) em vacas Holandesas no início da lactação. Vacas do grupo Alto AGNE e do grupo Baixo AGNE - Descalvado, SP - 2011

TEMPO (DEL)	TRATAMENTO		MÉDIA	CV (%)	P
	Alto AGNE (n=13)	Baixo AGNE (n=13)			
30±3	59,1	61,1	60,1	13,68	0,55
44±3	62,6	63,5	63,0	11,24	0,77
58±3	61,8	65,3	63,5	9,6	0,14
72±3	61,5	62,8	62,1	8,12	0,52
86±3	60,5	65,5	63,0	10,61	0,06
MÉDIA	61,1	63,6			

Valor de Ptrat = 0,26; Ptempo = 0,03; Ptrat*tempo = 0,37

As concentrações de glicose, insulina e IGF-1 são inversamente proporcionais às concentrações de AGNE (MATOBA et al., 2012). No entanto, no presente estudo não foram observadas diferenças na concentração de glicose para os grupos Alto e Baixo AGNE. Assim, pode-se supor que possivelmente as concentrações de insulina e IGF-1 também não apresentavam diferenças.

No início da lactação ocorre resistência transitória a insulina, com diminuição da utilização da glicose por tecidos periféricos para assegurar sua disponibilidade para a glândula mamária (BISINOTTO et al., 2012). A glicose produzida pelo fígado no pós-parto inicial é principalmente utilizada para suprir a produção de leite através da síntese de lactose (LEROY et al., 2008a).

Após o parto ocorre diminuição da expressão do receptor de GH (GHR) no fígado. Esta redução provoca um estado refratário ao GH, diminuindo a produção de IGF-1 (BUTLER et al., 2003). A inativação do GHR representa um desacoplamento do eixo somatotrópico, causando elevação da produção de GH na hipófise e estimulando a produção de leite (LUCY, 2007). Dietas ricas em energia podem atenuar a queda nos níveis de insulina e glicose ou diminuir o acúmulo de AGNE durante o período de BEN (VAN KNEGSEL et al., 2007), permitindo maior e mais

precocidade expressão do receptor do GH 1A (GHR1A) no fígado e o re-establishamento do eixo somatotrópico (BUTLER et al., 2003).

A glicose induz a liberação de insulina e, conseqüentemente, o aumento da produção de IGF-1 no fígado, através da ligação do GH ao seu receptor (BUTLER et al., 2003). As concentrações de insulina e IGF-1 modulam a capacidade esteroidogênica do folículo, além de estimular a proliferação das células da teca (SPICER; STEWART, 1996) e da granulosa (SPICER; ALPIZAR; ECHTERNKAMP, 1993). Essas funções são importantes para o desenvolvimento do folículo e do oócito após a formação do antro folicular. Durante o BEN baixas concentrações de glicose, insulina e IGF-1 e altas concentrações de GH são normalmente verificadas. No entanto, conforme aumenta os dias em lactação ocorre incremento nas concentrações de glicose, insulina e IGF-1 e diminuição do GH (WATHES et al., 2007). Esse incremento nas concentrações de glicose conforme aumenta os dias pós-parto foi observado no presente experimento.

As concentrações sanguíneas de metabolitos bioquímicos e hormonais estão diretamente correlacionadas com a composição do fluido folicular (LEROY et al., 2004a; SALES, 2011). O fluido folicular é originado através da pressão osmótica nos capilares das células da teca (RODGERS; IRVING-RODGERS, 2010). A produção de ácido hialurônico e proteoglicanas pelas células da granulosa cria um gradiente osmótico que retira fluido da vascularização tecal através do interstício tecal, a lâmina basal folicular e células da granulosa murais (RODGERS; IRVING-RODGERS, 2010).

Alterações no fornecimento de energia podem influenciar o metabolismo lipídico e alterar a composição do fluido folicular (SALES, 2011). Dietas hiperglicêmicas influenciam a composição do fluido folicular, podendo levar a efeitos negativos em longo prazo sobre os oócitos pela alteração da maturação nuclear (SUTTON-McDOWALLI; GILCHRIST; THOMPSON, 2010). Assim, o líquido folicular pode interferir tanto na função das células da granulosa (esteroidogênese), quanto no desenvolvimento final do oócito (LEROY et al., 2004).

Concentrações de AGNE no fluido folicular são paralelas às do soro, e aumentam próximo ao parto (LEROY et al., 2005). Desta forma, o aumento da lipólise e o incremento das concentrações de AGNE no sangue no início da lactação podem exercer efeito direto sobre a fertilidade de vacas leiteiras.

Figura 4 - Concentrações plasmáticas de BHB conforme os níveis de AGNE 44 dias após o parto (grupo Alto ou Baixo AGNE) em vacas Holandesas

Figura 5 - Concentrações plasmáticas de glicose conforme os níveis de AGNE 44 dias após o parto (grupo Alto ou Baixo AGNE) em vacas Holandesas

6.2 AVALIAÇÃO DA CICLICIDADE E DO ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL

Para avaliar a taxa de ciclicidade das vacas Holandesas, foram consideradas duas avaliações ultrassonográficas em um intervalo de 14 dias. No geral, a taxa de ciclicidade até 44 ± 3 dias pós-parto foi de 88,5% (23/26). Os animais do grupo de Alto AGNE apresentaram taxa de ciclicidade de 84,6% (11/13) e os animais do grupo de Baixo AGNE a taxa de ciclicidade foi de 92,3% (12/13; $P>0,05$).

O número médio de CL por vaca no momento da aspiração folicular não diferiu entre os tratamentos ($P=0,36$; Figura 6). Além disso, não foi observada interação tratamento e tempo ($P=0,28$; Figura 6). Porém, observou-se efeito de tempo ($P<0,0001$; Figura 6) na quantidade de CL.

A retomada da ciclicidade é dependente da pulsatilidade de LH (CROWE, 2008). Estudos evidenciaram que as alterações do metabolismo pós-parto influenciam a pulsatilidade de LH através das baixas concentrações de glicose, insulina e IGF-1 e altas concentrações de AGNE e BHB (BUTLER, 2003). Vacas Holandesas no início da lactação apresentam comprometimento na produção de E2 pelo FD (BEAM; BUTLER, 1997, 1998). As concentrações circulantes de insulina e IGF-1 agem sinergicamente com as gonadotrofinas estimulando a esteroidogênese (BEAM; BUTLER, 1999). Sendo assim, baixas concentrações desses hormônios no pós-parto comprometem a esteroidogênese. Segundo Butler, Pelton e; Butler (2004) a infusão de insulina para manter a glicemia normal no pós-parto recente foi capaz de incrementar a produção de E2 sem alterar a pulsatilidade de LH, possivelmente através do incremento na atividade da aromatase e redução das alterações ocasionadas pelo BEN, com diminuição dos AGNE e aumento do IGF-1 total e livre. Altas concentrações de E2 são importantes para o desenvolvimento do FD e para ocorrência da ovulação (FORDE et al., 2011).

A utilização de dieta insulinogênica incrementou a ciclicidade de vacas Holandesas aos 50 dias pós-parto (GONG et al., 2002a). Entretanto, Garnsworthy et al. (2009) forneceram dietas insulinogênicas ou controle e observaram 87 e 97% respectivamente, de vacas com aumento nas concentrações de progesterona até 50 dias pós-parto, não encontrando diferenças entre os tratamentos. Esses autores sugerem haver uma concentração mínima de insulina necessária para re-estabelecer a ciclicidade pós-parto. A alta taxa de animais ciclando até 50 pós-parto

observadas por Garnsworthy et al. (2009) e por Gong et al. (2002a) nos animais alimentados com dietas insulinogênicas são semelhantes às taxas observadas no presente estudo.

Existe uma relação fisiológica entre a glicose e a insulina (LUCY, 2007). Como não foi observadas diferenças na concentração de glicose entre os grupos Alto AGNE e Baixo AGNE, possivelmente as concentrações de insulina e IGF-1 eram semelhantes não afetando a ciclicidade pós-parto e o número de CL por vaca. No entanto, pode-se observar que o número de CL por vaca aumentou concomitante ao incremento da glicose plasmática.

A quantidade de vacas ciclando (presença de CL) aumenta com o passar dos dias em lactação e maior taxa de dupla ovulação é observada em animais de maior produção leiteira (LOPEZ et al., 2005). No presente estudo a quantidade de CL avaliados por ultrassonografia aumentou conforme o aumento dos dias pós-parto. Entre a 4^o e a 12^o semana (44 a 86 dias pós-parto), observou-se aumento do número de animais com dois ou mais CL. Esse período corresponde ao pico de lactação em vacas leiteiras. A partir do dia 58 pós-parto, 50% das vacas do presente experimento apresentavam 2 ou mais CL, resultados semelhantes aos reportados por Lopez et al. (2005) em vacas com produção superior a 40Kg de leite.

Figura 6 – Número de corpos lúteos por vaca aspirada conforme os níveis de AGNE 44 dias após o parto (grupo Alto ou Baixo AGNE) em vacas Holandesas

Na avaliação do ECC observou-se interação entre tratamento e tempo ($P=0,002$; Figura 7), sendo que as vacas do grupo Alto AGNE perderam ECC do dia 30 ao dia 86 pós-parto e os animais do grupo Baixo AGNE aumentaram o ECC conforme o aumento dos dias pós-parto. No dia 30 após o parto as vacas de Alto AGNE possuíam ECC maior que o grupo de Baixo AGNE ($P=0,03$). Entretanto, no dia 86 pós-parto os grupos possuíam ECC semelhantes. Porém, não se verificou diferenças entre os tratamentos ($P=0,37$; Figura 7) e também não observou efeito de tempo ($P=0,38$; Figura 7) para essa variável.

Figura 7 – Avaliação do escore de condição corporal (ECC) conforme os níveis de AGNE 44 dias após o parto (grupo Alto ou Baixo AGNE)

Mudanças no escore de condição corporal (ECC) estão intimamente ligadas às concentrações de AGNE, que por sua vez é um indicador preciso de mobilização de tecido adiposo (ADEWYUI; GRUYS; VAN EERDENBURG, 2005). Assim, os animais do grupo Alto AGNE apresentaram perda de aproximadamente 0,2 unidades de ECC, enquanto os animais do grupo de Baixo AGNE apresentaram incremento de aproximadamente 0,2 unidades de ECC.

6.3 AVALIAÇÃO OVARIANA E OOCITÁRIA

O número médio de folículos visualizados (> 2 mm) foi de $13,7 \pm 0,6$ para o grupo de Alto AGNE e de $17,7 \pm 1,8$ para o grupo de Baixo AGNE. Não houve interação ($P=0,68$; Figura 8) entre tratamento e tempo para o total de folículos visualizados. Também, não foram verificadas diferenças entre os tratamentos ($P=0,36$; Figura 8) e o tempo ($P=0,87$, Figura 8) para a variável em questão. Os resultados estão apresentados nas tabelas 4 e 5. Ainda, foi observada correlação positiva ($P<0,0001$) entre a quantidade de folículos visualizados e o número de partos de vacas Holandesas ($r = 0,41$).

Figura 8 – Média ($\pm$ EPM) de folículos visualizados no momento da aspiração folicular conforme os níveis de AGNE 44 dias após o parto (grupo Alto ou Baixo AGNE) em vacas Holandesas

Existe variação individual no número de folículos recrutados por onda de crescimento folicular (BURNS et al., 2005). A população folicular pode sofrer influência das concentrações sanguíneas de insulina e IGF 1 (SARTORI et al., 2010). Estudos evidenciaram que a quantidade média de folículos recrutados no início da onda folicular em *Bos taurus* é de $22,1 \pm 1,3$ (GIMENES, 2010). O aumento

da insulina no pós-parto incrementou o número de folículos visualizados (13,3 vs 9,4) em momento aleatório do ciclo estral (GARNSWORTHY et al., 2009) ou em animais que tiveram o ciclo estral sincronizados (GONG et al., 2002b; GARNSWORTHY et al., 2008). No presente estudo não se verificou diferenças na quantidade de folículos visualizados entre os grupos (Alto AGNE e Baixo AGNE), possivelmente por não haver diferenças nas concentrações de insulina e IGF-1 entre os grupos. Animais suplementados com fontes de ácidos graxos ω 3 e ω 6 apresentaram maior quantidade de folículos que animais sem suplementação, a maior quantidade de folículos pode ser explicada pela redução do BEN nos animais suplementados com gordura poli-insaturada (GANDRA, 2012).

Com o avanço dos dias em lactação pode ocorrer aumento gradativo no número de folículos aspirados (KENDRICK et al., 1999; GWAZDAUSKAS et al., 2000). No entanto, este incremento pode ser influenciado pelo número de partos (WALTERS et al., 2002). Durante as sessões de OPU não foi observado efeito de tempo na quantidade de folículos visualizados conforme os dias pós-parto, assim a quantidade de folículos aspirados foi semelhante durante todo o experimento. Porém, em vacas Holandesas múltiparas, Matoba et al. (2012) observaram maior quantidade de folículos aspirados até 42 de DEL (11,42) quando comparado ao período de 42 a 80 dias pós-parto (10,39).

Quanto à quantidade de folículos por classe, não foram observados efeito de interação tratamento e tempo para folículos pequenos (2-5 mm; Figura 9; $P=0,57$), médios (6-10 mm; Figura 10; $P=0,86$) e grandes (>10 mm; Figura 11; $P=0,57$). Também, não se verificou efeito de tratamento para a quantidade de folículos pequenos (Figura 9; $P=0,32$), médios (Figura 10; $P=0,54$) e grandes (Figura 11; $P=0,93$). No entanto, observou-se tendência de tempo para a quantidade de folículos pequenos (Figura 9; $P=0,07$), com diminuição dos folículos visualizados, de acordo com o aumento do período pós-parto. Verificou-se efeito semelhante para folículos médios (Figura 10; $P=0,06$), com aumento no número de folículos com o passar dos dias em lactação. Porém, não houve efeito de tempo (Figura 11, $P=0,14$) para a quantidade de folículos grandes.

Durante o período de emergência até a divergência folicular os folículos recrutados são dependentes de FSH. Após a divergência estes folículos se tornam dependentes da pulsatilidade de LH (WILTBANK et al., 2011). No início da onda folicular ocorre aumento do número de folículos pequenos, mas após 2 a 4 dias

ocorre diminuição da quantidade de folículos pequenos e incremento da quantidade de folículos médios (LUCY et al., 1992). Assim, vacas no início da lactação, com comprometimento nas concentrações de insulina e IGF-1, apresentam diminuição das concentrações de estradiol (BUTLER, 2003) e podem demorar para re-estabelecer a pulsatilidade de LH, comprometendo a duração da dominância folicular e a ciclicidade pós-parto. Em um estudo recente com vacas no início da lactação, Gandra (2012) observou efeito de tempo na quantidade de folículos médios (6-9 mm), assim como o observado no presente estudo.

Vacas suplementadas com ácidos graxos poli-insaturados apresentam aumento do número de folículos grandes, podendo ser ocasionado pelo aumento da pulsatilidade de LH, devido à melhoria do estado energético destes animais (MATTOS; STAPLES; THATCHER, 2000). No entanto, Fouladi-Nashta et al. (2009) não observaram diferenças na quantidade de folículos conforme o tamanho (pequeno, médio e grande) em vacas suplementadas com diferentes fontes de gordura poli-insaturada.

Figura 9 – Média ($\pm$ EPM) da quantidade de folículos pequenos no momento da aspiração folicular conforme os níveis de AGNE 44 dias após o parto (grupo Alto ou Baixo AGNE) em vacas Holandesas.

Figura 10 – Média ($\pm$ EPM) da quantidade de folículos médio no momento da aspiração folicular conforme os níveis de AGNE 44 dias após o parto (grupo Alto ou Baixo AGNE) em vacas Holandesas

Figura 11 – Média ($\pm$ EPM) da quantidade de folículos grandes no momento da aspiração folicular conforme os níveis de AGNE 44 dias após o parto (grupo Alto ou Baixo AGNE) em vacas Holandesas

Para o total de oócitos recuperados e para a taxa de recuperação não se verificou interação ($P>0,05$) entre tratamento e tempo. Também não houve diferença estatística para o número total de oócitos recuperados e para a taxa de recuperação entre os tratamentos (Figura 12; $P=0,28$ e Figura 13; $P=0,70$, respectivamente) e para o tempo ($P=0,42$ e $P=0,91$, respectivamente). Os resultados estão apresentados nas tabelas 4 e 5.

O número de oócitos recuperados para o grupo Alto AGNE ($9,5 \pm 0,6$) e para o grupo Baixo AGNE ($13,2 \pm 1,5$) foram superiores aos reportados em alguns estudos com vacas Holandesas. Nesses estudos foram recuperados em média 3 a 7 oócitos por vaca aspirada (KENDRICK et al., 1999; RIZOS et al., 2005; BILBY et al., 2006; LOPES et al., 2006; RIZOS et al., 2008; FOULADI-NASHTA et al., 2009; RATTO et al., 2011; MATOBA et al., 2012). Entretanto os resultados do presente estudo foram semelhantes aos reportados por Roth; Inbar; Arav, 2008; Pontes et al., 2010; Ferreira et al., 2011; Sales, 2011; e Gandra, 2012, com média de 10 a 16 oócitos recuperados por vaca aspirada.

O número de oócitos recuperados pode ser influenciado pela categoria animal (RIZOS et al., 2005), estação do ano (FERREIRA et al., 2011), dias em lactação (KENDRICK et al., 1999; WALTERS et al., 2002) e número de partos (WALTERS et al., 2002). No presente estudo observou correlação positiva (0,0001) entre número de oócitos recuperados e número de partos ($r = 0,37$).

Segundo Kendrick et al. (1999) e Gwazdauskas et al. (2000) conforme passa os dias pós-parto é observado aumento na quantidade de oócitos recuperados. Esse acréscimo está relacionado ao aumento dos folículos recrutados. O incremento da ingestão de matéria seca e o aumento das concentrações de glicose, insulina e IGF-1 com o passar dos dias pós-parto possivelmente são os responsáveis pelo aumento no número de folículos recrutados (GONG et al., 2002b). No entanto, não foi observado efeito de tempo na recuperação de oócitos no presente estudo.

A taxa de recuperação de oócitos por OPU pode sofrer grande variação, podendo ser influenciada pela qualidade da imagem ultrassonográfica dos folículos (BOLS et al., 2004), tipo e diâmetro da agulha, nível de vácuo da aspiração (BOLS et al., 1996, 1997) e experiência do técnico (SCOTT et al., 1994). As taxas de recuperação oscilam entre 32,0% a 96,4% em *Bos taurus* (ROTH et al., 2001; BILBY et al., 2006; FOULADI-NASHTA et al., 2007; RIZOS et al., 2008). No presente

estudo verificou-se variação entre 68% a 78% para taxa de recuperação de oócitos por folículos aspirados, não apresentando diferenças conforme o tratamento e os dias em lactação.

Figura 12 - Média ($\pm$ EPM) do número total de oócitos recuperados conforme os níveis de AGNE 44 dias após o parto (grupos Alto ou Baixo AGNE) em vacas Holandesas.

Figura 13 - Taxa de recuperação de oócitos (%) conforme os níveis de AGNE 44 dias após o parto (grupo Alto ou Baixo AGNE) em vacas Holandesas.

Tabela 4 - Quantidade e qualidade oocitária (média $\pm$ EPM) conforme os níveis de AGNE 44 dias após o parto (grupo Alto ou Baixo AGNE) em vacas Holandesas - Descalvado, SP - 2011

	TRATAMENTO		P		
	Alto AGNE	Baixo AGNE	Trat	Temp	Trat*Temp
Número de animais	13	13			
Número de OPUs	65	65			
Folículos visualizados	13,7 $\pm$ 0,6	17,7 $\pm$ 1,8	0,36	0,87	0,65
Total de oócitos recuperados	9,5 $\pm$ 0,6	13,2 $\pm$ 1,5	0,28	0,42	0,76
Taxa de recuperação de oócitos (%)	69,4 (617/889)	74,4 (856/1150)	0,70	0,91	0,96
Oócitos viáveis	6,7 $\pm$ 0,5	10,0 $\pm$ 1,3	0,25	0,44	0,75
Taxa de oócitos viáveis (%)	70,8 (437/617)	76,3 (653/856)	0,80	0,96	0,88
Número de oócitos (qualidade):					
- Grau I	0,74 $\pm$ 0,13	1,74 $\pm$ 0,33	0,14	0,05	0,10
- Grau II	0,97 $\pm$ 0,17	1,98 $\pm$ 0,36	0,15	0,39	0,55
- Grau III	5,01 $\pm$ 0,42	6,32 $\pm$ 0,76	0,42	0,07	0,60
- Grau IV	2,77 $\pm$ 0,26	3,12 $\pm$ 0,31	0,58	0,70	0,23

Para a variável número de oócitos viáveis, não foi observado interação entre tratamento e tempo (Figura 14; $P=0,75$). Também, não foram verificadas diferenças entre os tratamentos ($P=0,25$) e o tempo ($P=0,44$). Assim como, a taxa de oócitos viáveis não apresentou interação tratamento e tempo (Figura 15; $P=0,88$) e efeito para tratamento ($P=0,80$) e tempo ($P=0,96$). Os resultados estão apresentados nas tabelas 4 e 5.

A quantidade de oócitos viáveis pode ser influenciada pela categoria animal (RIZOS et al., 2005), estação do ano (FERREIRA et al., 2011) e dias em lactação (GANDRA, 2012). A quantidade média de oócitos viáveis variou entre 6,7 a 10,0 oócitos por vaca aspirada, sendo superior a quantidade reportada em alguns estudos, que variaram entre 1 a 6 oócitos por vaca aspirada no início da lactação (WALTERS et al., 2002; GANDRA, 2012; MATOBA et al., 2012) e semelhantes as relatadas por em vacas no pico de lactação durante o inverno (FERREIRA et al., 2011).

Tabela 5 - Quantidade e qualidade oocitária (média $\pm$ EPM) conforme os dias em lactação(DEL) em vacas Holandesas - Descalvado, SP – 2011

	TEMPO (DEL)					P		
	30 $\pm$ 3	44 $\pm$ 3	58 $\pm$ 3	72 $\pm$ 3	86 $\pm$ 3	Trat	Tem	Trat*Temp
Nº de animais	26	26	26	26	26			
Folículos visualizados	17,1 $\pm$ 3,4	14,8 $\pm$ 1,8	14,1 $\pm$ 1,4	15,6 $\pm$ 1,9	16,7 $\pm$ 2,0	0,36	0,87	0,68
Total de oócitos recuperados	11,8 $\pm$ 2,2	10,3 $\pm$ 1,1	10,2 $\pm$ 1,7	12,0 $\pm$ 2,2	12,3 $\pm$ 2,1	0,28	0,42	0,76
Taxa de recuperação de oócitos (%)	68,8 (306/445)	69,7 (269/386)	72,3 (266/368)	77,1 (313/406)	73,5 (319/434)	0,70	0,91	0,96
Oócitos viáveis	8,8 $\pm$ 2,0	7,8 $\pm$ 0,9	7,2 $\pm$ 1,4	8,8 $\pm$ 1,8	9,3 $\pm$ 1,8	0,25	0,44	0,75
Taxa de oócitos viáveis (%)	74,8 (229/306)	75,5 (203/269)	70,3 (187/266)	73,2 (229/313)	75,9 (242/319)	0,80	0,96	0,88
Número de oócitos (qualidade):								
- Grau I	1,8 $\pm$ 0,48	1,4 $\pm$ 0,37	1,1 $\pm$ 0,41	0,6 $\pm$ 0,24	1,3 $\pm$ 0,50	0,14	0,05	0,10
- Grau II	2,0 $\pm$ 0,70	1,6 $\pm$ 0,29	1,1 $\pm$ 0,44	1,3 $\pm$ 0,38	1,4 $\pm$ 0,35	0,15	0,39	0,55
- Grau III	5,0 $\pm$ 1,03	4,8 $\pm$ 0,59	5,0 $\pm$ 0,63	6,9 $\pm$ 1,30	6,6 $\pm$ 1,11	0,42	0,07	0,60
- Grau IV	3,0 $\pm$ 0,49	2,5 $\pm$ 0,37	3,0 $\pm$ 0,52	3,2 $\pm$ 0,53	3,0 $\pm$ 0,36	0,58	0,70	0,23

Não houve efeito de tratamento e de tempo para a quantidade de oócitos viáveis. Resultados semelhantes foram observados por Matoba et al. (2012), que não verificaram efeito dos dias em lactação na quantidade de oócitos viáveis e na quantidade de oócitos degenerados. No entanto, aspirando vacas no início da lactação suplementadas com diferentes fontes de gordura, Gandra (2012) observou maior quantidade de oócitos viáveis e menor quantidade de oócitos degenerados com o aumento dos dias pós-parto.

As mudanças nas concentrações endócrinas e metabólicas associadas ao BEN podem refletir nas concentrações do fluido folicular, alterando o crescimento e à maturação dos oócito, efeito este comprovado por modelos *in vitro* que mostraram toxicidade destas alterações na qualidade do oócito (LEROY et al., 2005). Assim como, a inadequada produção de hormônios esteroides no início da lactação, pode prejudicar a qualidade do oócito, exposto a baixas concentrações de IGF-1 e glicose (BUTLER, 2003; LEROY et al., 2008b).

Figura 14 - Média ($\pm$ EPM) do número de oócitos viáveis conforme os níveis de AGNE 44 dias após o parto (grupo Alto ou Baixo AGNE) em vacas Holandesas.

Figura 15 - Taxa de oócitos viáveis (%) conforme os níveis de AGNE 44 dias após o parto (grupo Alto ou Baixo AGNE) em vacas Holandesas.

Não houve interação entre tratamento e tempo para a quantidade de oócitos grau I (Figura 16; $P=0,10$), grau II (Figura 17; $P=0,55$), grau III (Figura 18; $P=0,60$) e grau IV (Figura 19; $P=0,23$). Assim como, não se verificou efeito de tratamento para oócitos grau I ($P=0,14$), grau II ($P=0,15$), grau III ($P=0,42$) e grau IV ($P=0,23$) em vacas Holandesas no início da lactação (Tabela 4). Entretanto, foi observado efeito de tempo na quantidade de oócitos grau I (Figura 16; $P=0,05$) e tendência de tempo para quantidade de oócitos grau III (Figura 18; $P=0,07$). Para os oócitos grau II (Figura 17; $P=0,39$) e grau IV (Figura 19; $P=0,70$) o período pós-parto não influenciou suas quantidades. O efeito dos dias pós-parto na quantidade de oócitos conforme a classificação morfológica pode ser observada na tabela 5.

No presente estudo a quantidade de oócitos grau I reduziu com o aumento dos dias em lactação. No entanto, os oócitos grau III tenderam a aumentar com o avanço dos dias pós-parto. Esses resultados colaboram para equilibrar a quantidade de oócitos viáveis nos diferentes momentos pós-parto.

Apesar dos oócitos não usarem glicose diretamente como fonte de energia, a glicose precisa estar prontamente disponível para as células do cumulus para fornecer piruvato e lactato, substratos de preferência do oócito para a produção ATP (CETICA et al., 2002). Portanto, é possível que a hipoglicemia no início da lactação comprometa a competência do oócito em vacas leiteiras. Como não se observou diferenças na concentração de glicose entre os grupos do presente estudo, a competência oocitária pode não ter sido alterada.

Apesar do folículo ser capaz de controlar flutuações na disponibilidade de glicose, que geralmente apresenta concentrações maiores no fluido folicular que no sangue, as concentrações de glicose intrafoliculares também diminuem próximo ao parto (LEROY et al., 2004).

A glicose é crítica para a maturação adequada do oócito, afetando a expansão do cumulus, a maturação nuclear e subsequente desenvolvimento de blastocisto (BISINOTTO et al., 2012). De fato, concentrações de glicose compatíveis com as observadas em vacas que sofrem de cetose clínica, reduzem a clivagem e a proporção de embriões que se desenvolvem até blastocistos (LEROY et al., 2006).

Figura 16 - Média ($\pm$ EPM) do número de oócitos grau I (GI) conforme os níveis de AGNE 44 dias após o parto (grupo Alto ou Baixo AGNE) em vacas Holandesas

Figura 17 - Média ($\pm$ EPM) do número de oócitos grau II (GII) conforme os níveis de AGNE 44 dias após o parto (grupo Alto ou Baixo AGNE) em vacas Holandesas.

Figura 18 - Média ($\pm$ EPM) do número de oócitos grau III (GIII) conforme os níveis de AGNE 44 dias após o parto (grupo Alto ou Baixo AGNE) em vacas Holandesas.

Figura 19 - Média ($\pm$ EPM) do número de oócitos grau III (GIII) conforme os níveis de AGNE 44 dias após o parto (grupo Alto ou Baixo AGNE) em vacas Holandesas.

6.4 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

No presente estudo, não houve efeito de interação tratamento e tempo para a quantidade de oócitos clivados por vaca aspirada ($P=0,65$; Figura 20). Resultados semelhantes foram verificados para a taxa de clivagem ($P=0,92$; Figura 21). As concentrações de AGNE (Alto ou Baixo) durante todo o período experimental também não influenciaram a quantidade de oócitos clivados por vaca aspirada ($3,7 \pm 0,4$ vs. $5,7 \pm 1,1$, $P=0,45$; Tabela 6) e a taxa de clivagem ($55,1\%$ vs. $57,3\%$, $P=0,95$; Tabela 6), respectivamente. Assim como, não se verificou efeito de tempo para essas variáveis (Tabela 7).

As taxas de clivagem encontradas no presente estudo foram semelhantes às reportadas pela literatura, variando entre 50 a 70% (RIZOS et al., 2005; BILBY et al., 2006; FOULAD-NASHTA et al., 2007; ROTH; INBAR, ARAV, 2008; FOULAD-NASHTA et al., 2009; GANDRA, 2012). Porém, em outro estudo realizado em doadoras Holandesas no pico de lactação, os autores encontraram taxas de clivagem inferiores ao presente estudo (FERREIRA et al., 2011). Com relação ao período pós-parto, Matoba et al. (2012), comparando vacas aspiradas até 42 dias pós-parto ou entre 42 e 80 dias pós-parto, não observou diferenças na taxa de clivagem ($50,7\%$ vs. $42,5\%$, respectivamente). Estes resultados corroboram com os dados observados por Gandra (2012) e com os resultados deste estudo, que não observaram diferenças de tempo pós-parto para a taxa de clivagem.

Os resultados da PIVE, tanto para o número de blastocisto por vaca aspirada como para a taxa de blastocisto, não apresentam interação entre tratamento e tempo ($P=0,52$; Figura 22 e $P=0,46$; Figura 23, respectivamente). Também, não houve diferença para tratamento no número de blastocisto por vaca aspirada ($P=0,37$; Tabela 6) e na taxa de blastocisto ($P=0,51$; Tabela 6). Assim como, os dias pós-parto não influenciaram o número de blastocisto por vaca aspirada ($P=0,39$; Figura 22) e a taxa de blastocisto ($P=0,41$; Figura 23).

Tabela 6 - Efeito da concentração de ácidos graxos não-esterificados (AGNE) no dia 44 após o parto (grupo Alto ou Baixo AGNE) na produção *in vitro* de embriões em vacas Holandesas. Descalvado, SP - 2011

	TRATAMENTO		P		
	Alto AGNE	Baixo AGNE	Trat	Temp	Trat*Temp
Número de OPU	65	65			
Número de estruturas clivadas	3,7 ± 0,4	5,7 ± 1,1	0,45	0,31	0,65
Taxa de clivagem (%)	55,1 (241/437)	57,3 (374/653)	0,95	0,80	0,92
Número de blastocistos no D8	0,4 ± 0,1	1,2 ± 0,4	0,37	0,39	0,52
Taxa de blastocistos (%)	6,2 (27/437)	11,6 (76/653)	0,51	0,41	0,46

A taxa de blastocisto no presente estudo foi de 9,4% (103/1090), independentemente do tratamento ou do período pós-parto. A produção de blastocisto variou entre 4,8% a 12,8% durante o período experimental. A reduzida taxa de blastocisto foi semelhante à observada por Sales (2011) e Bilby et al. (2006) com vacas Holandesas secas e vacas em lactação, respectivamente. Esses autores descrevem diferenças na produção de embriões entre animais da raça Holandesa e Gir ou vacas de corte, respectivamente. No entanto, a redução do desenvolvimento embrionário não está unicamente relacionada ao efeito de raça, mas também a outros fatores como a lactação e as alterações metabólicas e hormonais (BILBY et al., 2006). Essas alterações refletem na qualidade dos oócitos enviados para PIVE, comprometendo o desenvolvimento embrionário (GWAZDAUSKAS et al., 2000).

As alterações metabólicas associadas ao BEN pós-parto podem afetar o oócito (MATOBA et al., 2012). Uma alta correlação entre as concentrações de metabolitos no sangue e no fluido folicular são relatadas em outras investigações (SALES, 2011). Sendo assim, concentrações elevadas de AGNE e BHB no fluido folicular no período pós-parto podem afetar negativamente a qualidade do oócito (LEROY et al., 2004). Ainda, a alta concentração de AGNE tem sido citada na

diminuição da esteroidogênese e da proliferação das células da teca no folículo (VANHOLDER et al., 2005).

Figura 20 - Média ($\pm$ EPM) do número de oócitos clivados por vaca aspirada conforme níveis de AGNE no dia 44 após o parto (grupo Alto ou Baixo AGNE) em vacas Holandesas

Figura 21 - Taxa de clivagem (%) de oócitos aspirados conforme os níveis de AGNE 44 dias após o parto (grupo Alto ou Baixo AGNE) em vacas Holandesas

A qualidade morfológica oocitária apresenta-se comprometida no pós-parto recente, demonstrando que condições relacionadas ao início da lactação interferem negativamente na qualidade do oócito ovulado até 90 dias pós-parto (KENDRICK et al., 1999; GWAZDAUSKAS et al., 2000; WALTERS et al., 2002).

Vacas Holandesas no pós-parto apresentam altas concentrações de ácidos graxos saturados (palmítico e esteárico) no fluido folicular (BENDER et al., 2010). Esses ácidos graxos são reportados por causar efeito negativo na maturação, fertilização, clivagem e na produção de blastocisto (LEROY et al., 2005), além de aumentar o número de células do cúmulus apoptóticas nos CCOs em processo de maturação (LEROY et al., 2005).

A utilização de dietas com alta energia (1,78 Mcal/kg de MS), em vacas Holandesas de alta produção, produziu oócitos de melhor qualidade em função da maior concentração de IGF-1 no líquido folicular (KENDRICK et al., 1999). No entanto, novilhas submetidas à dieta de alta energia (1,6 vezes a energia de manutenção) apresentaram comprometimento na qualidade do oócito, com redução significativa na concentração de mRNA para receptores de insulina e IGFBP-2 e -4 em folículos antrais pequenos e, conseqüentemente, aumento da concentração de IGFs livres (ARMSTRONG et al., 2001). Além disso, o excesso de energia pode alterar a expressão de genes ligados ao metabolismo da glicose e do estresse oxidativo (superóxido dismutase) e ambos podem interferir na viabilidade do oócito (WRENZYCKI et al., 2000). Segundo Armstrong et al. (2002), altas concentrações de IGF-1 biodisponível podem apresentar efeito negativo sobre a competência oocitária e, conseqüentemente, diminui o desenvolvimento embrionário *in vitro*. Entretanto, estes efeitos são dependentes de distintos fatores, tais como a condição corporal e fisiológica do animal.

O estado nutricional durante o período pós-parto, avaliado pelas concentrações sanguíneas de glicose e AGNE pode afetar a fertilidade, independente do intervalo para a primeira ovulação em vacas Holandesas (GARVERICK et al., 2013). Segundo Garverick et al. (2013) as vacas que engravidaram na primeira inseminação artificial (IA) apresentaram maiores concentrações de glicose e menores concentrações de AGNE do que as vacas que não conceberam.

Tabela 7 - Efeito dos dias em lactação (DEL) sobre a produção *in vitro* de embriões em vacas Holandesas - Descalvado, SP - 2011

	TEMPO (DEL)					P		
	30±3	44±3	58±3	72±3	86±3	Trat	Temp	Trat*Temp
Número de OPU	26	26	26	26	26			
Número de estruturas clivadas	4,8 ± 1,3	4,0 ± 0,8	3,8 ± 1,1	5,2 ± 1,7	5,8 ± 1,6	0,45	0,31	0,65
Taxa de clivagem (%)	54,1 (124/229)	51,2 (104/203)	53,5 (100/187)	58,9 (135/229)	62,8 (152/242)	0,95	0,80	0,92
Número de blastocistos no D8	0,4 ± 0,2	0,7±0,3	0,8 ± 0,3	0,9 ± 0,7	1,2 ± 0,7	0,37	0,39	0,52
Taxa de blastocistos (%)	4,8 (11/229)	8,9 (18/203)	10,7 (20/187)	10,0 (23/229)	12,8 (31/242)	0,51	0,41	0,46

Também, usando a concentração plasmática de AGNE como indicador do status energético de vacas leiteiras em pastagem nas primeiras 2 semanas pós-parto, Ribeiro et al. (2011) relataram que vacas sob BEN (AGNE $\geq 0,7$ mM) tinham menos chance de reiniciar a ciclicidade ovariana antes de 50 dias pós-parto e de ficarem prenhes na primeira IA da estação de monta.

Outros estudos relataram resultados similares em rebanhos leiteiros em confinamento (WALSH et al., 2007; SANTOS et al., 2010; OSPINA et al., 2010b). A taxa de prenhez nos primeiros 70 dias da estação foi 16% inferior para vacas com AGNE $\geq 0,7$ mM que aquelas com concentrações abaixo deste limite no início da lactação (OSPINA et al., 2010b).

O desequilíbrio energético mais severo (nadir) ocorre entre a primeira e segunda semana de lactação (BUTLER, 2003). Visto que as amostras para análise dos metabólitos foram realizadas a partir do dia 30 pós-parto, no presente estudo não foi possível avaliar o efeito da severidade do BEN na competência oocitária e na produção *in vitro* de embriões ate 90 dias pós-parto.

Figura 22 - Média ($\pm$ EPM) do número de blastocisto por vaca aspirada conforme os níveis de AGNE 44 dias após o parto (grupo Alto ou Baixo AGNE) em vacas Holandesas

Figura 23 - Taxa de blastocisto (%) conforme os níveis de AGNE 44 dias após o parto (grupo Alto ou Baixo AGNE) em vacas Holandesas

7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos conclui-se que:

A primeira hipótese do presente experimento não foi aceita. As concentrações sanguíneas de ácidos graxos não esterificados (AGNE) 44 dias após o parto não influenciaram as concentrações de BHB e glicose, a quantidade de folículos visualizados, de oócitos totais, viáveis, a qualidade oocitária e a produção *in vitro* de embriões em vacas Holandesas no início da lactação (até 90 dias após o parto). Assim como, o período pós-parto não alterou as concentrações de AGNE e BHB, a quantidade de folículos visualizados, de oócitos totais, viáveis e a produção *in vitro* de embriões, rejeitando a segunda hipótese desse estudo. No entanto, verificou-se incremento da concentração de glicose com o aumento dos dias pós-parto.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, G. P.; JAISWAL, R.; SINGH, J.; MALHI, P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. **Theriogenology**, v. 69, p. 72-80, 2008.
- ADEWYUI, A. A.; GRUYS, E.; VAN EEDENBURG, F. J. Non esterified fatty acids (NEFA) in dairy cattle. A review. **Veterinary Quarterly**, v. 27, p. 117-126, 2005.
- AL-KATANANI, Y. M.; PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 390-396, 2002.
- ANUÁRIO DA PECUÁRIA BRASILEIRA (ANUALPEC). **Pecuária de Leite**. São Paulo, ANUALPEC, 2012.
- ARMSTRONG, D. G.; BAXTER, G.; HOGG, C. O.; WOAD, K. J. Insulin-like growth factor (IGF) system in the oocyte and somatic cells of bovine preantral follicles. **Reproduction**, v. 123, p. 789-797, 2002.
- ARMSTRONG, D. G.; GONG, J. G.; WEBB, R. Interactions between nutrition and ovarian activity in cattle: physiological, cellular, and molecular mechanisms. **Reproduction Domestic Ruminants**, v. 61, p. 403-414, 2003.
- ARMSTRONG, D. G.; MCEVOY, T. G.; BAXTER, G.; ROBINSON, J. J.; HOGG, C. O.; WOAD, K. J.; WEBB, R.; SINCLAIR, K. D. Effect of Dietary Energy and Protein on Bovine Follicular Dynamics and Embryo Production In Vitro: Associations with the Ovarian Insulin-Like Growth Factor System. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1624-1632, 2001.
- BARUSELLI, P. S.; GIMENES, L. U.; SALES, J. N. S. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 2, p. 205-211, 2007.
- BASTOS, M. R.; MATTOS, M. C. C.; MESCHIATTI, M. A. P.; SURJUS, R. S.; GUARDIEIRO, M. M.; MOURÃO, G. B.; PIRES, A. V.; PEDROSO, A. M.; SANTOS, F. A. P.; SARTORI, R. Ovarian function and circulating hormones in nonlactating Nelore versus Holstein cows. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, p. 776, 2010 (*Resumo*).
- BAZER, F. W.; SPENCER, T. E.; OTT, T. L. Interferon tau: a novel pregnancy recognition signal. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 37, p. 412-420, 1997.
- BEAM, S. W.; BUTLER, W. R. Energy balance and ovarian follicle development prior to the first ovulation postpartum in dairy cows receiving three levels of dietary fat. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 133-142, 1997.
- BEAM, S. W.; BUTLER, W. R. Energy balance, metabolic hormones and early postpartum follicle development in dairy cows fed prilled lipid. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 121-131, 1998.

BENDER, K.; WALSH, S.; EVANS, A. C. O.; FAIR, T.; BRENNAN, L. Metabolite concentrations in follicular fluid may explain differences in fertility between heifers and lactating cows. **Reproduction**, v. 139, p. 1047-1055, 2010.

BEG, M. A.; BERGFELT, D. R.; KOT, K.; WILTBANK, M. C.; GINTHER, O. J. Follicular fluid factors and granulosa cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 432-441, 2001.

BERISHA, B.; SCHAMS, D. Ovarian function in ruminants. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, p. 305-317, 2005.

BERISHA, B.; SCHAMS, D.; KOSMANN, M.; AMSELGRUBER, W.; EINSPANIER, R. Expression and tissue concentration of vascular endothelial growth factor, its receptors, and localization in the bovine corpus luteum during estrous cycle and pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 1106-1114, 2000.

BERTAN, C. M.; BINELLI, M.; MADUREIRA, E.H.; TRALDI A.S. Mecanismos endócrinos e moleculares envolvidos na formação de corpo lúteo e na luteólise – revisão de literatura. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, p. 824-840, 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.

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

BISINOTTO, R. S.; GRECO, L. F.; RIBEIRO, E. S.; MARTINEZ, N.; LIMA, F. S.; STAPLES, C. R.; THATCHER, W. W.; SANTOS, J. E. P. Influences of nutrition and metabolism on fertility of dairy cows. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 3, p. 260-272, 2012.

BOLS, P. E. J.; LEROY, J. L. M. R.; VANHOLDER, T.; VAN SOOM, A. A comparison of a mechanical sector and a linear array transducer for ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval (OPU) in the cow. **Theriogenology**, v. 62, p. 906-914, 2004.

BOLS, P. E. J.; VAN SOOM, A.; YSEBAERT, M. T.; VANDENHEEDE, J. M. M.; DE KRUIF, A. Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocytes complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 45, p. 1001-1014, 1996.

BOLS, P. E.; YSEBAERT, M. T.; LEIN, A.; CORYN, M.; VAN SOOM, A.; DE KRUIF, A. Effects of long-term treatment with bovine somatotropin on follicular dynamics and subsequent oocyte and blastocyst yield in an OPU-FIV program. **Theriogenology**, v. 49, p. 983-995, 1998.

BOLS, P. E. J.; YSEBAERT, M. T.; VAN SOOM, A.; DE KRUIF, A. Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity of bovine compact cumulus oocyte complexes. **Theriogenology**, v. 47, p. 1221-1236, 1997.

BONI, R.; ROELOFSEN, M. W. M.; PIETERSEN, M. C.; KOGUT, J.; KRUIP, T. A. Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. **Theriogenology**, v. 48, p. 277-289, 1997.

BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUNGU, H.; MORIN, N.; BRISSON, C.; CARBONEAU, G.; DUROCHER, J. In vitro embryo production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach. **Theriogenology**, v. 51, p. 59-70, 1999.

BRACKETT, B. G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M. L.; DONAWICK, W. J.; EVANS, J. F.; DRESSEL, M. A. Normal development following in vitro fertilization in the cow. **Biology of Reproduction**, v. 27, p. 147-158, 1982.

BRASIL. MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR. Balança comercial brasileira. Brasília, 2012.

BROCKMAN, R. P.; LAARVELD, B. Hormonal regulation of metabolism in ruminants: a review. **Livestock Production Science**, v. 14, p. 313-334, 1986.

BURNS, D. S.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J. L. H.; KNIGHT, P. G.; IRELAND, J. J. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. **Biology of Reproduction**, v. 73, p. 54-62, 2005.

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

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

BUTLER, W. R. Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. **Livestock Production Science**, v. 83, p. 211-218, 2003.

BUTLER, W. R. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 449-457, 2000.

BUTLER, W. R.; SMITH, R. D. Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 3, p. 767-783, 1989.

CETICA, P.; PINTOS, L.; DALVIT, G.; BECONI, M. Activity of key enzymes involved in glucose and triglyceride catabolism during bovine oocyte maturation *in vitro*. **Reproduction**, v. 124, p. 675-681, 2002.

CHAPINAL, N.; CARSON, M. E.; LEBLANC, S. J.; LESLIE, K. E.; GODDEN, S.; CAPEL, M.; SANTOS, J. E. P.; OVERTON, M. W.; DUFFIELD, T. F. The association of serum metabolites in the transition period with milk production and early-lactation reproductive performance. *Journal of Dairy Science*, v. 95, p. 1301-1309, 2012.

CHENAULT, J. R.; THATCHER, W. W.; KALRA, P. S.; ABRAMS, R. M.; WILCOX, C. J. Transitory changes in plasma progestins, estradiol, and luteinizing hormone approaching ovulation in the bovine. **Journal of Dairy Science**, v. 58, p. 709-717, 1974.

CHILLIARD, Y.; BOCQUIER, F.; DOREAU, M. Digestive and metabolic adaptations of ruminants to undernutrition, and consequences on reproduction. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 38, p. 131-152, 1998.

CROWE, M. A. Resumption of ovarian cyclicity in post-partum beef and dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 20-28, 2008.

DIAZ, F. J.; ANDERSON, L. E.; WU, Y. L.; RABOT, A.; TSAI, S. J.; WILTBANK, M. C. Regulation of progesterone and prostaglandin F2 α production in the CL. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 191, p. 65-80, 2002.

DISKIN, M. G.; MURPHY, J. J.; SREENAN, J. M. Embryo survival in dairy cows managed under pastoral conditions. **Animal Reproduction Science**, v. 96, p. 297-311, 2006.

DRACKLEY, J. K. Biology of dairy cows during the transition period: The final frontier? **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 2259-2273, 1999.

DRACKLEY, J. K.; DANN, H. M.; DOUGLAS, G. N.; GURETZKY, N. A. J.; LITHERLAND, N. B.; UNDERWOOD, J. P.; LOOR, J. J. Physiological and pathological adaptations in dairy cows that may increase susceptibility to periparturient diseases and disorders. *Italian Journal of Animal Science*, v. 4, p. 323-344, 2005.

DURAS, M.; MLYNARCZUK, J.; KOTWICA, J. Non-genomic effect of steroids on ocitocin-stimulated intracellular mobilization of calcium and on prostaglandin F2 α and E2 secretion from bovine endometrium cells. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 76, p. 105-116, 2005.

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

EMBRAPA EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Produção, Industrialização e Comercialização**. Brasília: EMBRAPA, 2011.

ETHERTON, T. D.; BAUMAN, D. E. Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. **Physiology Review**, v. 78, p. 745-761, 1998.

FARIN, C. E.; MOELLER, C. L.; SAWYER, H. R.; GAMBONI, F.; NISWENDER, G. D. Morphometric analysis of cell types in the ovine corpus luteum throughout the estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v. 35, p. 1299-1308, 1986.

FERGUSON, J. D.; GALLIGAN, D. T.; THOMSEN, N. Principal descriptors of body condition score in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 2695-2703, 1994.

FERREIRA, R. M.; AYRES, H.; CHIARATTI, M. R.; FERRAZ, M. L.; ARAÚJO, A. B.; RODRIGUES C. A.; WATANABE, Y. F.; VIREQUE, A. A.; JOAQUIM, D. C.; SMITH, L. C.; MEIRELLES, F. V.; BARUSELLI, P. S. The low fertility of repeat-breeder cows during summer heat stress is related to a low oocyte competence to develop into blastocysts. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 2383-2392, 2011.

FORDE, N.; BELTMAN, M. E.; LONERGAM, P.; DISKIN, M.; ROCHE, J. F.; CROWE, M.A. Oestro cycle in *Bos taurus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 124, p. 163-169. 2011.

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

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

GALLI, C.; CROTTI, G.; NOTARI, C.; TURINI, P.; DUCHI, R.; LAZZARI, G. Embryo production by ovum pick up from live donors. **Theriogenology**, v. 55, p. 1341-1357, 2001.

GANDRA, J. R. **Fontes de ácidos graxos ω 3 e ω 6 em dietas de vacas leiteiras no período de transição e início de lactação**. 2012. 170 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

GARNSWORTHY, P. C.; FOULADI-NASHT, A. A.; MANN, G. E.; SINCLAIR, K. D.; WEBB, R. Effect of dietary-induced changes in plasma insulin concentrations during the early post partum period on pregnancy rate in dairy cows. **Reproduction**, v. 137, p. 759-768, 2009.

GARNSWORTHY, P. C.; LOCK, A.; MANN, G. E.; SINCLAIR, K. D.; WEBB, R. Nutrition, metabolism and fertility in dairy cows: 1. Dietary energy source and ovarian function. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 3814–3823, 2008.

GARVERICK, H. A.; HARRIS, M. N.; VOGEL-BLUEL, R.; SAMPSON, J. D.; BADER, J.; LAMBERSON, W. R.; SPAIN, J. N.; LUCY, M. C.; YOUNGQUIST, R. S. Concentrations of nonesterified fatty acids and glucose in blood of periparturient dairy cows are indicative of pregnancy success at first insemination. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 181-188, 2013.

GIMENES, L. U. **Taxa de recuperação *in vivo* e competência *in vitro* de oócitos bubalinos, zebuínos e taurinos aspirados em diferentes fases da onda de crescimento folicular**. 2010. 122 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

GIMENES, L. U.; SÁ FILHO, M. F.; CARVALHO, N. A. T.; TORRES-JUNIOR, J. R. S.; SOUZA, A. H.; MADUREIRA, E. H. TRINCA, L. A.; SARTORELLI, E. S.; BARROS, C. M.; CARVALHO, J. B. P.; MAPLETOFT, R. J.; BARUSELLI, P. S. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**, v. 69, p. 852-858, 2008.

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

GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; DONADEU, F. X.; BERGFELT, D. R. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 239-257, 2003.

GINTHER, O. J.; KOT, K.; KULICK, L. J.; MARTIN, S.; WILTBANK, M. C. Relationships between FSH and ovarian follicular waves during the last six months of pregnancy in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 108, p. 271–279, 1996a.

GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C.; FRIKE, P. M.; GIBBONS, J. R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 1187-1194, 1996b.

GINTHER, O. J.; SHREATHA, H. K.; BEG, M.A. Circulating hormone concentration within a pulse of a metabolite of prostaglandin F₂ α during preludeolysis and early luteolysis in heifers. **Animal of Reproduction Science**, v. 122, p. 253-258, 2010.

GINTHER, O. J.; SHRESTHA, H. K.; FUENZALIDA, M. J.; shahiduzzaman, A. K. M.; BEG, M. A. Characteristics of Pulses of 13,14-Dihydro-15-Keto-Prostaglandin F₂ α Before, During, and after Spontaneous Luteolysis and Temporal Intrapulse Relationships with Progesterone Concentrations in Cattle. **Biology of Reproduction**, v. 82, p. 1049-1056, 2010.

GINTHER, O. J.; SILVA, L. A.; ARAUJO, R. R.; BEG, M. A. Temporal associations among pulses of 13, 14-Dihydro-15-keto-PGF₂ α , luteal blood flow, and luteolysis in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 76, p. 506-513, 2007.

GIOMETTI, I. C.; CASTILHO, A. C. S.; SÁ FILHO, O. G.; PAPA, P. C.; BURATINI JR, J. Controle local e endócrino do desenvolvimento e da regressão do corpo lúteo bovino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, n. 1, p. 34-52, 2009.

GOEDE, V.; SCHMIDT, T.; KIMMINA, S.; KOZIAN, D.; AUGUSTIN, H. G. Analysis of blood vessel maturation processes during cyclic ovarian angiogenesis. **Laboratory Investigation**, v.78, p.1385-1394, 1998.

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

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

GÜLEKLI, B.; BULBUL, Y.; ONVURAL, A.; YORUKOGLU, K.; POSACI, C.; DEMIR, N.; ERTEN, O. Accuracy of ovarian reserve tests. **Human Reproduction**, v. 14, p. 2822-2826, 1999.

GUTIERREZ, C. G.; CAMPBELL, B. K.; WEBB, R. Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol

production, response to follicle stimulating hormone and morphological characteristics. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 608–616, 1997.

GWAZDAUSKAS, F. C.; KENDRICK, K. W.; PRYOR, A. W.; BAILEY, T. L. Impact of follicular aspiration on folliculogenesis as influenced by dietary energy and stage of lactation. *Journal of Dairy Science*, v. 83, p. 1625–1634, 2000.

HANSEL, W.; DOWD, J. P. Hammond Memorial Lecture. New concepts in the control of corpus luteum function. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 78, p. 755-768, 1986.

HAYIRLI, A. The role of exogenous insulin in the complex of hepatic lipidosis and ketosis associated with insulin resistance phenomenon in postpartum dairy cattle. **Veterinary Research Communications**, v. 30, p. 749-774, 2006.

HESS, B. W.; LAKE, S. L.; SCHOLLJEGERDES, E. J.; WESTON, T. R.; NAYIGIHUGU, V.; MOLLE, J. D. C.; MOSS, G. E. Nutritional controls of beef cow reproduction. **Journal Animal Science**, v. 83, p. E90-E106, 2005.

HIRSHFIELD, A. N. Relationship between the supply of primordial follicles and the onset of follicular growth in rats. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 421-428, 1994.

HOLM, P.; BOOTH, P. J.; SCHMIDT, M. H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using sofaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology*, v. 52, p. 683-700, 1999.

HOUSEKNECHT, K. L.; BAUMAN, D. E. Regulation of lipolysis by somatotropin: functional alteration of adrenergic and adenosine signaling in bovine adipose tissue. **Journal Endocrinology**, v. 152, p. 465-475, 1997.

JONES, J. I.; CLEMMONS, D. R. Insuline-like growth factors and their binding proteins: biological actions. **Endocrine Reviews**, v. 16, p. 3-34, 1995.

KALUZ, S.; FISHER, P. A.; KALUZOVA, M.; SHELDRIK, E.L.; FLINT, A. P. F. Structure of an ovine interferon receptor and its expression in endometrium. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 17, p. 207-215, 1996.

KAMADA, D.; MATSUI, M.; SHIBANUMA, T.; YAMAMOTO, D.; SCHAMS, D.; MIYAMOTO, A. Suppression of corpus luteum development at early stage of formation by antibody against vascular endothelial growth factor in the cow. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 451, 2004. Supplement.

KENDRICK, K. W.; BAILEY, T. L.; GARST, A. S.; PRYOR, A. W.; AHMADZDEH, A.; AKERS, R. M. Effects of energy balance on hormones, ovarian activity, and recovered oocytes in lactating Holstein cows using transvaginal follicular aspiration. **Journal Dairy Science**, v. 82, p.1731–1740, 1999.

KIRBY, C. J.; ARMSTRONG, J. D.; HUFF, B. G.; STANKO, R. L.; HARVEY, R. W.; HEIMER, E. P.; CAMPBELL, R. M. Changes in serum somatotropin, somatotropin mRNA, and serum and follicular insulin-like growth factor-I in response to feed restriction in cows actively immunized against growth hormone-releasing factor. **Journal of Animal Science**, v. 71, p. 3033-3042, 1993.

- KNAPP, J. R.; FREETLY, H. C.; REIS, B. L.; CALVERT, C. C.; BALDWIN, R. L. Effects of somatotropin and substrates on patterns of liver metabolism in lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 1025-1035, 1992.
- KOBAYASHI, Y.; BOYD, C. K.; MCCORMACK, B. L.; LUCY, M. C. Reduced insulin-like growth factor-I after acute feed restriction in lactating dairy cows is independent. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 748–754, 2002.
- KOMAR, C. M.; BERNDTSON, A. K.; EVANS, A. C. O.; FORTUNE, J. E. Decline in circulating estradiol during the periovulatory period is correlated with decreases in estradiol and androgen, and in messenger RNA for P450 aromatase and P450 17 α -hydroxylase, in bovine preovulatory follicles. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1797-1805, 2001.
- LANNA, D. P.; BAUMAN, D. E. Effect of somatotropin , insulin, and glucocorticoid on lipolysis in chronic cultures of adipose tissue from lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 60-68, 1999.
- LAWRENCE, M. C.; MCKERN, N. M.; WARD, C. W. Insulin receptor structure and its implications for the IGF-1 receptor. **Current Opinion Structure Biology**, v. 17, p. 699-705, 2007.
- LE ROITH, D.; BONDY, C.; YAKAR, S.; LIU, J. L.; BUTLER, A. The somatomedin hypothesis: 2001. **Endocrine Reviews**, v. 22, p. 53-74, 2001.
- LEIBFRIED, L.; FIRST, N. L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. **Journal of Animal Science**, v. 48, p. 76-86, 1979.
- LEON, H. V.; HERNANDEZ-CERON, J.; KEISLER, D. H.; GUTIERREZ, C. G.; Plasma concentrations of leptin, IGF-I, and insulin in relation to changes in body condition score in heifers. **Journal Animal Science**, v. 82, p. 445-451, 2004.
- LEROY, J. L. M. R.; OPSOMER, G.; VAN SOOM, A.; GOOVAERTS, I. G. F.; BOLS, P. E. J. Reduced fertility in high-yielding dairy cows: Are the oocyte and embryo in danger? Part I the importance of negative energy balance and altered corpus luteum function to the reduction of oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows. **Reproduction Domestic Animal**, v. 43, p. 612-622, 2008b.
- LEROY, J. L. M. R.; VANHOLDER, T.; DELANGHE, J. R.; OPSOMER, G.; VAN SOOM, G.; BOLS, P. E. J.; DEWULFA, J.; KRUIF, A. Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum. **Animal Reproduction Science**, v. 80, p. 201–211, 2004.
- LEROY, J. L. M. R.; VANHOLDER, T.; MATEUSEN, B.; CHRISTOPHE, A.; OPSOMER, G.; DE KRUIF, A.; GENICOT, G.; VAN SOOM, A. Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on development capacity of bovine oocytes in vitro. **Reproduction**, v. 130, p. 485–495, 2005
- LEROY, J. L. M. R.; VANHOLDER, T.; OPSOMER, G.; VAN SOOM, A.; DE KRUIF, A. The in vitro development of bovine oocytes after maturation in glucose and b-hydroxybutyrate concentrations associated with negative energy balance in dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v, 41, p. 119-123, 2006.

LEROY, J. L. M. R.; VANHOLDER, T.; VAN KNEGSEL, A. T. M.; GARCIA-ISPIERTO, I.; BOLS, P. E. J. Nutrient prioritization in dairy cows early postpartum: Mismatch between metabolism and fertility? **Reproduction Domestic Animal**, v. 43, p. 96-103, 2008a.

LEROY, J. L. M. R.; VAN SOOM, G.; 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 Domestic Animal**, v. 43, p. 623-632, 2008c.

LINDSEY, B. R.; MACLELLAN, L. J.; WHITE, T. R.; KINDER, J. E.; D'OCCHIO, M. J. Differential requirement for pulsatile LH during follicular phase and exposure to the preovulatory LH surge for oocyte fertilization and embryo development in cattle. *Theriogenology*, v. 58, p. 1651-1662, 2002.

LLEWELLYN, S.; FITZPATRICK, R.; MURPHY, J. J.; SCARAMUZZI, R. J.; WATHES, D.C. Effect of negative energy balance on the insulin-like growth factor system in pre-recruitment ovarian follicles of post partum dairy cows. **Reproduction**, v. 133, p. 627-639, 2007.

LOMANDER, H.; FRÖSSLING, J.; INGVARTSEN, K. L.; GUSTAFSSON, H.; SVENSSON, C. Supplemental feeding with glycerol or propylene glycol of dairy cows in early lactation – Effects on metabolic status, body condition, and milk yield. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 2397-2408, 2012.

LOPES, A. S.; MARTINUSSEN, T.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Effect of days post-partum, breed and ovum pick-up scheme on bovine oocyte recovery and embryo development. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, p. 196–203, 2006.

LOPEZ, H.; CARAVIELLO, D. Z.; SATTER, L. D.; FRICKE, P. M.; WILTBANK, M. C. Relationship between level of milk production and multiple ovulations in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 2783-2793, 2005.

LUCY, M. C. Fertility in high-producing dairy cows: reasons for decline and corrective strategies for sustainable improvement. **Society of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 64, p. 237-254, 2007.

LUCY, M. C. Functional differences in the growth hormone and insulin-like growth factor axis in cattle and pigs: implications for pos-partum nutrition and reproduction. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 31-39, 2008.

LUCY, M. C. Reproductive loss in high-producing dairy cattle; where will it end? **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 1277-1293, 2001.

LUCY, M. C. Regulation of ovarian follicular growth by somatotropins and insulin-like growth factors in cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 1635-1647, 2000.

LUCY, M. C.; SAVIO, J. D.; BADINGA, L.; LA SOTA, R. L.; THATCHER, W. W. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 3615-3626, 1992.

LUCY, M. C.; VERKERK, G. A.; WHITE, B. E.; MACDONALD, K. A.; BURTON, L.; CURSONS, R. T.; ROCHE, J. R.; HOLMES, C. W. Somatotrophic axis components and nutrient partitioning in genetically diverse dairy cows managed under different feed allowances in a pasture system. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 526-539, 2009.

MATOKA, S.; O'HARA, L.; CARTER, F.; KELLY, A. K.; FAIR, T.; RIZOS, D.; LONERGAN, P. The association between metabolic parameters and oocyte quality early and late postpartum in Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 1257-1266, 2012.

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

McCRACKEN, J. A.; CUSTER, E. E.; LAMSA, J. C. Luteolysis: A neuroendocrine-mediated event. **Physiology Revision**, v. 45, p. 263-323, 1999.

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

MIYAMOTO, A.; SHIRASUMA, K.; WIJAYAGUNAWARDANE, M. P. B.; WATANABE, S.; HAYASHI, M.; YAMAMOTO, D.; MATSUI, M.; ACOSTA, T. J. Blood flow: a key regulatory component of corpus luteum function in cow. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, p. 329-339, 2005.

NISWENDER, G. D.; JUENGEL, J. L.; SILVA, P. J.; ROLLYSON, M. K.; MCINTOSH, E. W. 2000. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiological Reviews**, v. 80, p. 1-29, 2000.

NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7th rev. ed. Washington, DC.: National Academic Press, 2001.

OPSOMER, G.; GROHN, Y. T.; HERTL, J.; CORYN, M.; DELUYKER, H.; DE KRUIF, A. Risk factors for post partum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: a field study. **Theriogenology**, v. 53, p. 841-857, 2000.

OSPINA, P. A.; NYDAM, D. V.; STOKOL, T.; OVERTON, T. R. Evaluation of nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: Critical thresholds for prediction of clinical diseases. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 546-554. 2010a.

OSPINA, P. A.; NYDAM, D. V.; STOKOL, T.; OVERTON, T. R. Associations of elevated nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate concentrations with early lactation reproductive performance and milk production in transition dairy cattle in the northeastern United States. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 1596-1603, 2010b.

OVERTON, T. R.; DRACKLEY, J. K.; OTTEMANN-ABBAMONTE, C. J. Substrate utilization for hepatic gluconeogenesis is altered by increased glucose demand in ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 1940-1951, 1999.

PETER, A. T.; LEVINE, H.; DROST, M.; BERGFELT, D. R. Compilation of classical and contemporary terminology used to describe morphological aspects of ovarian dynamics in cattle. **Theriogenology**, v. 71, p. 1343-1357, 2009.

PETIYM, S.; BAGE, R.; HALLAP, T.; BERGGVIST, A. S.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; LARSSON, B. Two different schemes of twice-weekly ovum pick-up in dairy heifers: effect on oocyte recovery and ovarian function. **Theriogenology**, v. 60, p. 175-188, 2003.

PIETERSE, M. C.; KAPPEN, K. A.; KRUIP, T. A. M. TAVERNE, M. A. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. **Theriogenology**, v. 30, p. 751-762, 1988.

PIETERSE, M. C.; VOS, P. L. A. M.; KRUIP, T. A. M.; WURTH, Y. A.; BENEDEN, T. H. H.; WILLEMSE, A. H.; TAVERNE, M. A. M. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 35, p. 19-24, 1991.

PONTES, J. H. F.; SILVA, K. C. F.; BASSO, A. C.; RIGO, A. G.; FERREIRA, C. R.; SANTOS, G. M. G.; SANCHES, B. V.; PORCIONATO, J. P. F.; VIEIRA, P. H. S.; FAIFER, F. S.; STERZA, F. A. M.; SCHENK, J. L.; SENEDA, M. M. Large-scale *in vitro* embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. **Theriogenology**, v. 74, p. 1349-1355, 2010.

RAMOS, A. F.; RUMPF, R.; CÂMARA, J. U.; MOLLO, M. R.; PIVATO, I.; MARUQUES JR, A. P.; SARTORI, R. Effect of follicular wave synchronization on in vitro embryo production in heifers. **Animal Reproduction Science**, 117, p. 201-207, 2010.

RATTO, M. H.; PERALTA, O. A.; MOGOLLON, G.; STROBEL, P.; CORREA, J. Transvaginal ultrasound-guided cumulus oocyte complexes aspiration and in vitro embryo production in suckled beef and lactating dairy cattle on pasture-based management conditions. **Animal Reproduction Science**, v. 129, p. 1-6, 2011.

REKAWIECKI, R.; NOWIK, M.; KOTWICA, J. Relationship between concentrations of progesterone, oxytocin, noradrenaline, gene expression and protein level for their receptors in corpus luteum during estrous cycle in the cow. **Prostaglandins and Other Lipids Mediators**, v. 92, p. 13-18, 2010.

RIBEIRO, E. S.; LIMA, F. S.; AYRES, H.; GRECO, L. F.; BISINOTTO, R. S.; FAVORETO, M.; MARSOLA, R. S.; MONTEIRO, A. P. A.; THATCHER, W. W.; SANTOS, J. E. P. Effect of postpartum diseases on reproduction of grazing dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. E-63, 2011. (Abstract).

RIZOS, D.; BURKE, L.; DUFFY, P.; WADE, M.; MEE, J. F.; O'FARRELL, K. J.; MACSIURTAİN, M.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Comparisons between nulliparous heifers and cows as oocyte donors for embryo production in vitro. **Theriogenology**, v. 63, p. 939-949, 2005.

RIZOS, D.; KENNY, D. A.; GRIFFIN, W.; QUINN, K. M.; DUFFY, P.; MULLIGAN, F. J.; ROCHE, J. F.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. The effect of feeding propylene glycol to dairy cows during the early postpartum period on follicular dynamics and on metabolic parameters related to fertility. **Theriogenology**, v. 69, p. 688-699, 2008.

ROBINSON, R. S.; MANN, G. E.; LAMMING, G. E.; WATHES, D. C. Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. *Reproduction*, v. 122, p. 965-979, 2001.

ROBINSON, R. S.; NICKLIN, L. T.; HAMMOND, A. J.; SCHAMS, D.; HUNTER, M. G.; MANN, G. E. Fibroblast growth factor 2 is more dynamic than vascular endothelial growth factor A during the follicle-luteal transition in the cow. **Biology of Reproduction**, v. 77, p. 28-36, 2007.

RODGERS, R. J.; IRVING-RODGERS, H. F. Formation of the ovarian follicular antrum and follicular fluid. **Biology of Reproduction**, v. 82, p. 1021-1029, 2010.

ROTH, Z.; ARAV, A.; BOR, A.; ZERON, Y.; BRAW-TAL, R.; WOLFENSON, D. Improvement of quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of impaired follicles from previously heat-stressed cows. **Reproduction**, v. 122, 737-744, 2001.

ROTH, Z.; INBAR, G.; ARAV, A. Comparison of oocyte developmental competence and follicular steroid content of nulliparous heifers and cows at different stages of lactation. **Theriogenology**, v. 69, p. 932-939, 2008.

SÁ FILHO, M. F.; CARVALHO, N. A. T.; GIMENES, L. U.; TORRES-JUNIOR, J. R.; NASSER, L. F. T.; TONHATI, H.; GARCIA, J. M.; GASPARRINI, B.; ZICARELLI, L.; BARUSELLI, P. S. Effect of recombinant bovine somatotropin (bST) on follicular population and on in vitro buffalo embryo production. *Animal Reproduction Science*, v. 113, p. 51-59, 2009.

SALES, J. N. S. **Efeito da dieta com alta energia nos parâmetros metabólicos, endócrinos e reprodutivos de vacas *Bos indicus* e *Bos taurus***. . 2011. 162 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

SALES, J. N. S.; JUNQUEIRA, R. M.; MAIO, J. R. G.; CARNEIRO, S. S.; BERTOLINI, L. C. T.; SOUZA, E. D. F.; BARUSELLI, P. S.; NOGUEIRA, G. P. Eficácia luteolítica do cloprostenol sódico (Sincrocio®) em novilhas Nelore (*Bos indicus*) tratadas em diferentes fases do ciclo estral. **A Hora Veterinária**, n. 157, p. 31-34, 2007.

SANTOS, J. E. P.; BISINOTTO, R. S.; RIBEIRO, E. S.; LIMA, F. S.; GRECO, L. F.; STAPLES, C. R.; THATCHER, W. W. Applying nutrition and physiology to improve reproduction in dairy cattle. **Society for Reproduction and Fertility Supplement**, v. 67, p. 387-403, 2010.

SANTOS, J. E. P.; RUTIGLIANO, H. M.; SÁ FILHO, M. F. Risk factors for resumption of postpartum estrous cycles and embryonic survival in lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 110, p. 207-221, 2009.

SARTORI, R.; BASTOS, M. R.; BARUSELLI, P. S.; GIMENES, L. U.; ERENO, R. L.; BARROS, C. M. Physiological differences and implications to reproductive management of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle in a tropical environment. **Society of Reproduction and Fertility**, v. 67, p. 357-375, 2010.

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

SARTORI, R.; SARTOR-BERGFELT, R.; MERTENS, S. A.; GUENTHER, J. N.; PARRISH, J. J.; WILTBANK, M. C. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. **Journal Dairy Science**, v. 85, p. 2803-2812, 2002.

SAVIO, J. D.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F. Development of dominant follicles and length of ovarian cycles in post-partum dairy cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, p. 581-591, 1990.

SCHAMS, D.; AMSELGRUBER, W.; EINSPANIER, R.; SINOWATZ, F.; GOSPODAROWICZ, D. Localization and tissue concentration of basic fibroblast growth factor in the bovine corpus luteum. **Endocrine**, v. 2, p. 907-912, 1994.

SCHAMS, D.; BERISHA, B. Regulation of corpus luteum function in cattle – an overview. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 39, p. 241-251, 2004.

SCOTT, C. A.; ROBERTSON, L.; DE MOURA, R. T.; PATERSON, C.; BOYD, J. S. Technical aspects of transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration in cows. **Veterinary Record**, v. 134, p. 440-443, 1994.

SHIBAYA, M.; MATSUDA, A.; HOJO, T.; ACOSTA, T. J.; OKUDA, K. Expression of estrogen receptor in the bovine corpus luteum: Cyclic changes and effects of prostaglandins F2 α and Cytokines. **Journal of Reproduction and Development**, v. 53, p. 1059-1068, 2007.

SHIRASUNA, K.; SHIMIZU, T.; HAYASHI, K.; NAGAI, K.; MATSUI, M.; MIYAMOTO, A. Positive association, in local release, of luteal oxytocin with endothelin 1 and prostaglandin F2 α during spontaneous luteolysis in the cow: A possible intermediary role for luteolytic cascade within the corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v. 76, p. 965-970, 2007.

SMITH, T. R.; HIPPEN, A. R.; BEITZ, D. C.; YOUNG, J. W. Metabolic characteristics of induced ketosis in normal and obese dairy cows. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 1569-1581, 1997.

SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v. 65, p. 126-136, 2006.

SOUZA, A.H.; CUNHA, A. P.; SILVA, E.P.; GÜMEN, A., AYRES, H., GHENTHER, J. N., WILTBANK, M. C. Comparison of gonadorelin productis in lactating dairy cows: efficacy based on induction of ovulation of an accessory follicle and circulating luteinizing hormone profiles. **Theriogenology**, v. 72, p. 271-279, 2009.

SPENCER, T. E.; JOHNSON, G. A.; BURGHARDT, R. C.; BAZER, F. W. Progesterone and placental hormone actions on the uterus: insights from domestic animals. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 2-10, 2004.

SPENCER, T. E.; OTT, T. L.; BAZER, F. W. Expression of interferon regulatory factors one and two in the ovine endometrium: effects of pregnancy and ovine interferon tau. **Biology of Reproduction**, v. 58, p. 1154-1162, 1998.

SPICER, L. J.; ALPIZAR, E.; ECHTERNKAMP, S. E. Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and (or) insulin-like growth factor I production in vitro. **Journal of Animal Science**, v. 71, p. 1232-1241, 1993.

SPICER, L. J.; CHAMBERLAIN, C. S.; MACIEL, S. M. Influence of gonadotropins on insulin and insulinlike growth factor-I (IGF-I)-induced steroid production by bovine granulosa cells. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 22, p. 237-54, 2002.

SPICER, L. J.; STEWART, R. E. Interaction among bovine somatotropin, insulin, and gonadotropins on steroid production by bovine granulosa and thecal cells. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 813-821, 1996.

STOCK, A. E.; FORTUNE, J. E. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. **Endocrinology**, v. 132, n. 2, p. 1108-1114, 1993.

STRANG, B. D.; BERTICS, S. J.; GRUMMER, R. R. Effect of long-chain fatty acids on triglycerides accumulation, gluconeogenesis, and ureagenesis in bovine hepatocytes. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 728-739, 1998.

SUTTON-McDOWALL, M.; GILCHRIST, R.; THOMPSON, J. The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. **Reproduction**, v. 139, p. 685-695, 2010.

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

TANIKAWA, M.; ACOSTA, T. J.; FUKUI T.; MURAKAMI, S.; KORZEKWA, A.; SHARZYNSHI, D. J.; PIOTROWSKA, K. K.; PARCK, C. K.; OKUDA, K. Regulation of prostaglandin synthesis by interleukin - 1 α in bovine endometrium during estrous cycle. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 78, p. 279-290, 2005.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, p. 1717-1751, 2005.

VAN KNEGSEL, A. T. M.; VAN DEN BRAND, H.; DIJKSTRA, J.; VAN STRAALLEN, W. M.; JORRITSMA, R.; TAMMINGA, S.; KEMP, B. Effect of glucogenic vs. lipogenic diets on energy balance, blood metabolites, and reproduction in primiparous and multiparous dairy cows in early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 3397-3409, 2007.

VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A. M. Ovum pick up and in vitro production in the bovine after use in several generations: A 2005 status. **Theriogenology**, v. 65, p. 914-925, 2006.

VAN WEZEL, I. L.; UMAPATHYSIVAM, K.; TILLEY, W. D.; RODGERS, R. J. Immunohistochemical localization of basic fibroblastic growth factor in bovine ovarian follicles. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 115, p. 133-140, 1995.

VANHOLDER, T.; LEROY, J. L. M. R.; VAN SOOM, A.; OPSOMER, G.; MAES, D.; CORYN, M.; DE KRUIF, A. Effect of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cell steroidogenesis and proliferation in vitro. **Animal Reproduction Science**, v. 87, p. 33-44, 2005.

VASCONCELOS, J. L.; SARTORI, R.; OLIVEIRA, H. N.; GUENTHER, J. G.; WILTBANK, M. C. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. **Theriogenology**, v. 56, p. 307-314, 2001.

VIANA, J. H. M.; BOLS, P. E. J. Variáveis biológicas associadas a recuperação de complexos cumulus-oócito por aspiração folicular. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 1-4, 2005.

VIANA, J. H. M.; CAMARGO, L. S. A.; FERREIRA, A. M.; SÁ, W. F.; FERNANDES, C. A. C.; MARQUES JR., A. P. Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 84, p. 1-12, 2004.

VIANA, J. H. M.; NASCIMENTO, A. A.; PINHEIRO, N. L.; CAMARGO, L. S. A.; FERREIRA, A. M.; SÁ, W. F.; MARQUES JÚNIOR, A. P. Caracterização de sequelas subsequentes à punção folicular em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, n. 3, p. 119-124, 2003.

VIANA, J. H. M.; SIQUEIRA, L. G. B.; PALHÃO, M. P.; CAMARGO, L. S. A. Evolução no uso das técnicas de fertilização *in vitro* na última década e impacto na indústria de embriões bovinos e produção animal no Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, p. 325-334, 2010.

VOSS, A. K.; FORTUNE, J. E. Levels of messenger ribonucleic acid for cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase and P450 aromatase in preovulatory bovine follicles decrease after the luteinizing hormone surge. **Endocrinology**, v. 132, p. 2239-2245, 1993a.

VOSS, A. K.; FORTUNE, J. E. Levels of messenger ribonucleic acid for cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450 and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in bovine preovulatory follicles decrease after the luteinizing hormone surge. **Endocrinology**, v. 132, p. 888-894, 1993b.

WALSH, R. B.; WALTON, J. S.; KELTON, D. F.; LEBLANC, S. J.; LESLIE, K. E.; DUFFIELD, T. F. The effect of subclinical ketosis in early lactation on reproductive performance of postpartum dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 2788-2796, 2007.

WALSH, S. W.; WILLIAMS, E. J.; EVANS, A. C. A review of the causes of poor fertility in high producing dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 123, p. 127-138, 2011.

WALTERS, A. H.; BAILEY, T. L.; PEARSON, R. E.; GWAZDAUSKAS, F. C. Parity-related changes in bovine follicle and oocyte populations, oocyte quality, and hormones to 90 days postpartum. **Journal Dairy Science**, v. 85, p. 824-832, 2002.

WATHES, D. C.; FENWICK, M.; CHENG, Z.; BOURNE, N.; LLEWELLYN, S.; MORRIS, D. C.; KENNY, D.; MURPHY, J.; FITZPATRICK, R. Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow. **Theriogenology**, v. 68, p. 232-241, 2007.

WASHBURN, S. P.; SILVIA, W. J.; BROWN, C. H.; MCDANIEL, B. T.; MCALLISTER, A. J. Trends in reproductive performance in southeastern Holstein and Jersey DHI herds. **Journal Dairy Science**, v. 85, p. 244-251, 2002.

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

WEEMS, Y. S.; NETT, T. M.; RISPOLI, L. A.; DAVIS, T. L.; JOHNSON, D. L.; UCHIMA, T.; RANEY, A.; LENNON, E.; PANG, J.; HARBERT, T.; BOWERS, G.; GOTO, K.; ONG, A.; TSUTAHARA, N.; RANSEL, R. D.; WEEMS, C. W. Prostaglandin E1 (PGE1), but not prostaglandin E2 (PGE2), alters luteal and endometrial luteinizing hormone (LH) occupied and unoccupied LH receptors and mRNA for LH receptors in ovine luteal tissue to prevent luteolysis. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, v. 91, p. 42-50, 2010.

WILTBANK, M. C.; GÜMEN, A.; SARTORI, R. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. **Theriogenology**, v. 57, p. 21-52, 2002.

WILTBANK, M. C.; LOPEZ, H.; SARTORI, R.; SANGSRITAVONG, S.; GÜMEN, A. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 17-29, 2006.

WILTBANK, M. C.; SARTORI, R.; HERLIHY, M. M.; VASCONCELOS, J. L. M.; NASCIMENTO, A. B.; SOUZA, A. H.; AYRES, H.; CUNHA, A. P.; KESKIN, A.; GUENTHER, J. N.; GÜMEN, A. Managing the dominant follicle in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 76, p. 1568-1582, 2011.

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

YAMASHITA, H.; KAMADA, D.; SHIRASUMA, K.; MATSUI, M.; SHIMIZU, T.; KIDA, K.; BERISHA, B.; SCHAMS, D.; MIYAMOTO, A. Effect of local neutralization of basic fibroblast growth factor or vascular endothelial growth factor by a specific antibody on the development of the corpus luteum in the cow. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, p. 1449-1459, 2008.

YANCOPOULOS, G. D.; DAVIS, S.; GALE, N. W.; RUDGE, J. S.; WIEGAND, S. J.; HOLASH, J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. **Nature**, v. 407, p. 242-248, 2000.