JOSÉ NÉLIO DE SOUSA SALES

**Efeito da dieta com alta energia nos parâmetros metabólicos,
endócrinos e reprodutivos de vacas *Bos indicus* e *Bos taurus***

**São Paulo
2011**

JOSÉ NÉLIO DE SOUSA SALES

**Efeito da dieta com alta energia nos parâmetros
metabólicos, endócrinos e reprodutivos de vacas
Bos indicus e *Bos taurus***

Tese 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 Doutor em Ciências

Departamento:
Reprodução Animal

Área de concentração:
Reprodução Animal

Orientador:
Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli

São Paulo
2011

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

2425
FMVZ

Sales, José Nélío de Sousa

Efeito da dieta com alta energia nos parâmetros metabólicos, endócrinos e reprodutivos de vacas *Bos indicus* e *Bos taurus* / José Nélío de Sousa Sales. -- 2011.
161 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2011.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli.

1. Energia. 2. Nutrição. 3. *Bos indicus*. 4. *Bos taurus*. 5. Oócitos.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Produção in vitro de embriões de doadoras *Bos indicus* e *Bos taurus* suplementadas com diferentes níveis de energia na dieta", protocolado sob o nº1239/2007, utilizando 24 (vinte e quatro) bovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 21/11/07.

We certify that the Research "In vitro embryos yield in *Bos indicus* and *Bos taurus* supplemented with different level of energy in diet", protocol number 1239/2007, utilizing 24 (twenty for) bovines, under the responsibility Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 11/21/07.

São Paulo, 22 de novembro de 2007

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SALES, José Nélio de Sousa

Título: Efeito da dieta com alta energia nos parâmetros metabólicos, endócrinos e reprodutivos de vacas *Bos indicus* e *Bos taurus*

Tese 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 Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

À Deus, por ter me ajudado nos
momentos mais difíceis de minha
caminhada durante o doutorado.

Aos meus pais José Maria e Maura, que
sempre me apoiaram e se dedicaram
para atender minhas expectativas,
mesmo eu achando que não seriam
possíveis.

DEDICO

Aos meus irmãos Christian, Sabrina e
Felipe e sobrinha Natália que muito me
ajudaram e torceram para a conclusão
de mais este objetivo.

À minha querida esposa Fabíola por me
oferecer o maior presente de minha vida, a
Júlia. Também por compreender a
ausência constante e por ser cúmplice e
atuante direto dessa obra.

À minha amável princesa Júlia por me
oferecer os melhores momentos de
minha vida.

OFEREÇO

O Senhor é meu pastor nada me faltará.
(Salmo 23)

AGRADECIMENTOS

O agradecimento!!! Parte mais importante da tese. Se estou aqui escrevendo essa obra é porque várias pessoas e animais dedicaram boa parte de sua vida para que tudo ocorresse da melhor forma possível. E agradecer, me deixa feliz, pois durante essa caminhada pude contar com o apoio de várias pessoas, e acredito que me auxiliaram por gostarem verdadeiramente de mim. Assim eu agradeço...

À Deus por ter me criado e acompanhado por todos estes anos, trazendo para mim pessoas de bom caráter e uma família muito especial.

Ao professor Pietro Sampaio Baruselli, pela sua incrível simplicidade e competência, por seu tratamento incondicional, por ser um exemplo de trabalho e companheirismo. Por ensinar me como ser um bom profissional e pesquisador. Além de ser um grande amigo que me confiou grande parte de seus trabalhos e vida. Muito obrigado mesmo Pietrão.

À toda a minha família que de uma forma ou de outra fizeram parte da minha vida ajudando a formar meu caráter.

Aos professores e amigos Roberto Sartori (grande apoio durante a idealização do projeto), José Camisão de Souza (conselheiro e amigo de todas as horas), João Henrique Moreira Viana (grande pesquisador que abriu as portas da EMBRAPA, me ensinou aspiração folicular e ajudou diretamente na condução do experimento a campo) e Fabiola Paula Lopes (contribuiu na elaboração da parte laboratorial de meu trabalho) pela ajuda durante meu doutorado, por ter aceito prontamente o convite para fazer parte da banca de defesa e pelas contribuições na elaboração final desta tese.

Aos professores do Departamento de Reprodução Animal que me acolheram e não mediram esforços para fornecer seus conhecimentos. Em especial à Profa. Camila Infantsi Vannucchi que ajudou na elaboração da minha tese e tornou-se uma grande amiga, obrigado *Teacher*. Ao casal mais adorado do VRA, Prof. Renato Campanarut Barnabé e Profa. Valquíria Hyppolito Barnabé (lembranças adoráveis da Hungria), ao diretor e companheiro de churrasco Prof. José Antônio Visintin, ao incansável e que sempre perdeu no futebol Prof. Rubens Paes de Arruda, à Profa. Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção, quem me apresentou ao Prof. Pietro e desencadeou todo esse processo, ao Prof. Guilherme de Paula Nogueira por toda cordialidade e auxílio nas análises laboratoriais, aos Prof. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães, Prof. Cláudio Alvarenga de Oliveira, Prof. Mário Binelli, Prof. Ed Hoffmann Madureira, Profa. Cláudia Barbosa Fernandes, Profa. Eneiva Carla Carvalho Celeghini, Profa. Annelise de Souza Traldi, Prof. Francisco de Pádua Rennó e aos professores estrangeiros Gabriel Bó (Argentina) e Michael D'oochio (Austrália).

Aos amigos do VRA que foram importantes para que eu conseguisse lutar e completar de forma agradável essa árdua caminhada até a defesa. Em especial, agradeço a dois grandes amigos que fiz na pós: Gabriel Crepaldi e Marcílio Nichi. Gabriel, meu fiel escudeiro, momentos super agradáveis e cumplicidade em todos os experimentos. Discussões e concordatas sempre estiveram em nossos trabalhos de campos, ele sempre disposto a fazer tudo e eu era obrigado a ficar na ficha. Esse cara vai longe, inteligente, amigo e de bom coração. O único defeito dele é ser muito ruim no futebol. Gabriel, obrigado por ser meu verdadeiro amigo. Do Japonês é difícil de falar, sempre, mas sempre disposto a ajudar a todos independente de ter algum retorno. Japonês, obrigado por momentos especiais em que passamos juntos no Brasil e na Europa. Tive uma grande amiga também, a Alessandra Teixeira, sempre feliz e sorridente e atuante em alguns experimentos. Obrigado Alessandra, por sempre alegrar o ambiente com suas risadas. Aos colegas orientados pelo chefe: Nersão (gente boa ao extremo), Cabeção (Everton, futuro diretor da Intervet), Torres Júnior (vai ser engraçado assim lá no Maranhão), Jacomini (achei um cara mais tranquilo que eu e de bom coração), Júlia (vamos vencer a corrida), Lindsay (fica tranquila, não chora), Henderson Ayres (gente boa, mas são poucos os que o entendem), Americano (pensa num cara ruim de futebol, agora multiplica por 1000), Claudiney (mineiro bão), Márcio Leão (cara campeão, aspira até de olho fechado), Ana Paula (diferenciada), Robertinha (quem vê o tamanho, não acredita no que ela é capaz de fazer), Mané (a risada inconfundível), Kedson (o locutor do Pará), Laís (olha a abelha) e Rodrigo Sala (pede mais uma torre). Minhas duas crias que deixo no VRA, Lili (querida e eterna amiga) e Everton (PM, sangue bom que gosta de se misturar com álcool), continuem mantendo o nome de nossa universidade (UFLA) no patamar mais elevado. E aos outros colegas da família VRA, Renata Simões, Rafinha, Paulo, Nani, Eduardo, Rodrigo, Rodrigo (Peixe Boi), Paola, Fábio (Maravira), Andressa, José Rodrigo, Carol, Marcela, Alessandra, Thais, Camilla, Mariana Giassetti, Mariana Groke, Paulo, Zeca, Flávia, Robinson, Adriano, Weber, Cris, Fernanda, Gisele, Liege, Marina, Priscila.

Às minhas queridas amigas Harumi Shiraishi e Thais Soto por sanar minhas enormes dúvidas com relação à burocracia dos papéis, por vários favores cedidos e por almoçar comigo em várias ocasiões. Além delas, agradeço aos outros funcionários, Maria Alice, Anderson Avansi pelos favores prestados e à querida Dona Sílvia que sempre me tratou com muito carinho e organizou nossa bagunça. E também ao Miguel, Maria Amélia, Iraílton, Luís e Belau por manter o departamento funcionando e os animais vivos.

À pesquisadora e amiga Lilian Iguma e aos amigos Ríbrio e Carol que dispensaram seus tempos a cada 14 dias para conduzir a parte laboratorial do meu experimento através de árduas viagens de Juiz de Fora até Santa Mônica. Aos pesquisadores Luís Sérgio (organizou toda a parte laboratorial em Juiz de Fora e sempre disposto a ajudar), Marco

Antônio Gama (gente fina, responsável pela elaboração das dietas experimentais), Humberto Brandão (um grande amigo e outrora colega de VRA (doutorado) e Lavras (mestrado), que me abriu a possibilidade de vir para a USP e deu conselhos para a minha vida profissional), Jonh Furlong (pelo carinho, serenidade e por dar conselhos que foram extremamente importantes para manter as holandesas longe da babesiose) e Rui Verneque (por ceder os animais de seu experimento).

Aos pós graduandos Raquel Serapião, Bruno (hoje pesquisador da EMBRAPA), Michele (responsável pela expressão gênica), Paulo (responsável pela contagem de lipídeos por Nile Red em confocal) e aos funcionários Miro e Joel pelo auxílio laboratorial em Juiz de Fora.

Ao Gilmar Alvim e André pelo auxílio durante a fase de aprendizagem do processo de aspiração folicular no Campo Experimental de Coronel Pacheco e ao Marquinhos por atuar na busca incansável das doadoras holandesas de meu experimento.

Ao João por ser um grande amigo e companheiro nos momentos de desânimo e por permitir que eu estivesse mais próximo de minha filha durante o experimento, além de conseguir tornar minha estadia em Santa Mônica muito mais confortável. Ao Dr. Célio de Freitas por atender todos os meus pedidos e compartilhar minhas dificuldades durante o período experimental e por abrir a sua casa para momentos de descontração. Aos novos amigos do Campo Experimental Santa Mônica, Dr. Marcos, Dr. Wilson, Landeiro, Patrícia, Heronildo, Mourão, Valdir, Reginaldo (dois), Tia Nelly (minha mãe do Rio de Janeiro), Ruizinho, Paulinho, Chicão, Jabutirica, Cristiano (Dadá), Joaquim, Perigoso, Galo, Augustinho, Paulo, Cuca, Zenilson e Sebastião. Em especial ao pessoal da Farmácia, Sidney (meu amigo e braço direito no campo), Betinho, Assis (até que enfim conseguiu aposentar), Marcelo (Chin) e Adilson por tornar os momentos difíceis e de desânimo, um pouco mais alegres. Sem a ajuda de todos, eu não conseguiria nem começar o experimento.

À todos os estagiários que se dedicaram arduamente para que os experimentos fossem executados da melhor forma possível. Em especial, a minha equipe da EMBRAPA, Bia, Alberto (frango), Silvia, Jordano, Breno, Daniel, Breno (carioca), Vitão e Ralf que sentiram as dificuldades de manter um experimento de nutrição durante 6 meses. Além de proporcionar momentos de descontração e felicidade.

Aos amigos Renato Giroto, Márcio Oliveira, Marinho e Rubinho com quem compartilhei momentos de alegria em vários experimentos e IATFs. Também à todas as fazendas, as quais permitiram desenvolver nossas ideias e fornecer toda a infraestrutura e animais.

À todas as empresas e seus respectivos funcionários por financiarem vários de meus experimentos, em especial a Ouro Fino, na pessoa José Ricardo, um grande amigo com quem compartilhei momentos de alegria e por proporcionar várias oportunidades

profissionais, demonstrando total confiança no meu trabalho. A WTA, na pessoa de Osnir, pelo patrocínio de parte dos materiais de meu experimento e por momentos de descontração em várias SBTE. E a Sexing Technologies, na pessoa de Nil, por me confiar trabalhos nos EUA.

À Clara, Devani, Priscila e Rafael (grande anfitrião e amigo de Araçatuba) pelo auxílio incondicional nas análises bioquímica e hormonal das amostras de soro e de fluido folicular.

À bibliotecária Elza Faquim, por me atender com o maior bom humor do mundo e deixar minha tese padronizada e dentro das normais. Às secretárias de pós-graduação Cláudia, Daura, Marli e Deyse por me ajudarem e serem cordiais durante o processo de depósito de minha tese.

À Universidade de São Paulo por me acolher e fornecer esta opção na minha vida, os órgãos de fomento (CAPES e FAPESP) pelo incentivo financeiro concedido durante o período de meu doutorado e a EMBRAPA por ceder seu corpo técnico, infraestrutura, funcionários e animais.

Aos meus verdadeiros e velhos amigos de Lavras Quirino, Diovanni e Pereira (*in memorium*) por momentos de muita felicidade em que passamos juntos.

À todas as vacas que permitiram fazer meus experimentos. Principalmente minhas queridas 28 filhas no qual convivi diariamente por 6 meses, a quem devo total gratidão e respeito.

E à todos os meus amigos que conquistei nesta vida.

RESUMO

SALES, J. N. S. **Efeito da dieta com alta energia nos parâmetros metabólicos, endócrinos e reprodutivos de vacas *Bos indicus* e *Bos taurus*.** [Effect of high energy diet on metabolic, endocrine and reproductive parameters on *Bos indicus* and *Bos taurus* cows]. 2010. 161 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Avaliou-se o efeito da dieta com diferentes níveis de energia [manutenção (M) e alta energia (1,7M)] nos parâmetros metabólicos, endócrinos e reprodutivos de vacas não lactantes *Bos indicus* (14 Gir) e *Bos taurus* (14 HPB) submetidas aspiração folicular (OPU) seguida de produção *in vitro* de embriões. Os animais foram distribuídos aleatoriamente de acordo com a raça e a dieta. As doadoras foram mantidas em sistema *Tie stall* e as dietas foram fornecidas duas vezes ao dia (8:00 e 16:00 h). Os animais receberam dieta M por um período de adaptação de 21 dias. Após esse período, os grupos experimentais foram submetidos a nove punções foliculares com intervalos de 14 dias. Para realização da OPU, no D0 as doadoras foram sincronizadas com 2 mg de benzoato de estradiol e um implante auricular de norgestomet. No D5, as OPUs foram realizadas. Não houve interação entre as espécies e níveis de energia na dieta para as variáveis estudadas. Não foram observadas diferenças quali-quantitativa dos oócitos entre as dietas. Porém, houve diferença na quantidade e qualidade oocitária entre as espécies estudadas. Vacas *Bos indicus* apresentaram maior quantidade de estruturas recuperadas e melhor qualidade oocitária que as doadoras *Bos taurus*. Semelhantemente aos resultados da qualidade e quantidade oocitária, a produção *in vitro* de embriões também não diferiu entre as dietas e verificou-se maior produção *in vitro* de embriões em vacas *Bos indicus*. No entanto, foi observado que o excesso de energia reduziu a produção *in vitro* de embriões após 60 dias de fornecimento da dieta somente em vacas *Bos indicus*. Verificou-se menor abundância de transcritos para os genes IGF2R e HSP70.1 em oócitos de vacas alimentadas com alta energia na dieta. Além disso, observou-se que vacas da raça Gir apresentaram maior abundância de transcritos para os genes GLUT1 e IGF1R. Vacas alimentadas com excesso de energia na dieta apresentaram maiores concentrações séricas e no fluido folicular de glicose e colesterol e maiores níveis de AGNE no líquido folicular. Porém, a concentração de nitrogênio ureico no soro e no fluido folicular foi maior nas vacas que receberam

dieta de manutenção. Quanto ao grupo genético, observou-se que vacas *Bos indicus* apresentavam maiores concentrações de glicose, colesterol, AGNE e nitrogênio ureico, tanto no líquido folicular quanto no soro. Além disso, as concentrações de insulina e IGF1 no líquido folicular foram maiores nas vacas do Grupo alta energia *Bos indicus*. Por fim, observou-se quadro de hiperinsulinemia (Gir [insulina] > 51,9 µUI/ml e HPB [insulina] >17,2 µUI/ml) em 60% das vacas *Bos indicus* que receberam alta energia na dieta. Conclui-se que o aumento de energia na dieta não interferiu na quantidade e qualidade (avaliada visualmente) de oócitos. No entanto, o excesso de energia reduziu a produção *in vitro* de embriões em vacas *Bos indicus* após 60 dias de fornecimento da dieta. Além disso, vacas *Bos indicus* apresentaram melhor qualidade e maior quantidade de oócitos viáveis e produção *in vitro* de embriões que as doadoras *Bos taurus*.

Palavras-chave: Energia. Nutrição. *Bos indicus*. *Bos taurus*. Oócitos

ABSTRACT

SALES, J. N. S. **Effect of high energy diet on metabolic, endocrine and reproductive parameters on *Bos indicus* and *Bos taurus* cows.** [Efeito da dieta com alta energia nos parâmetros metabólicos, endócrinos e reprodutivos de vacas *Bos indicus* e *Bos taurus*]. 2011. 161 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The effect of different energy levels in diet [maintenance (M) and high energy (1.7M)] was evaluated on metabolic, endocrine and reproductive parameters of non lactating *Bos indicus* (n=14) and *Bos taurus* (n=14) cows submitted to ultrasound guided ovum pick up (OPU) followed by *in vitro* embryo production. Cows were randomly assigned, according to their breed and diet. The oocyte donors were housed in Tie Stall System and the diets were given twice daily (8:00 AM e 4:00 PM). During 21 days prior to the beginning of experiment, animals were fed with the maintenance diet for their adaptation. After this period, the experimental groups were submitted to nine OPU procedures, fourteen days apart each. To synchronize the donors, cows received 2mg of estradiol benzoate on day 0 (D0) and one norgestomet auricular implant. The OPU were performed on D5. There were no interaction between breeds and energy level in diet for the evaluated variables. No qualitative or quantitative differences were in oocytes between the two diets. However, there was difference in oocyte number and quality between breeds. *Bos indicus* cows showed higher number of recovered structures and better oocyte quality when compared to *Bos taurus* donors. Similar to what was found in oocyte quality and number, the *in vitro* embryo production also did not differ between diets and it was observed that *Bos indicus* cows had higher production of embryos. However, we verified that the energy surplus reduced *in vitro* embryo production in *Bos indicus* cows after 60 days of high energy diet. It was also possible to observe lower oocytes transcripts abundance for IGF2R and HSP70.1 genes of cows fed with high energy diet. Moreover, Gir cows showed higher transcript abundance for GLUT1 and IGF1R genes. Cows fed with excess of energy in diet presented higher serum and follicular fluid concentrations of glucose and cholesterol and increased NEFA levels in follicular fluid. However, the ureic nitrogen concentration was higher in cows which received maintenance diet. When comparing the two genetic groups, it was observed that *Bos indicus* cows presented higher concentrations of glucose, cholesterol, NEFA and ureic nitrogen both in follicular fluid

and in blood. Furthermore, cows that presented decreased blastocyst rate (high energy - *Bos indicus*) exhibited high follicular fluid concentrations of insulin and IGF1. Finally, it was observed that 60% of *Bos indicus* cows fed with high energy diet presented hyperinsulinemia (Gir [insulin] > 51.9 µUI/ml and HPB [insulin] >17.2 µUI/ml). In conclusion, increasing energy in diet did not interfere in oocyte number and quality (visual evaluation). However, the energy surplus reduced the in vitro embryo production in *Bos indicus* cows after 60 days of diet. Moreover, *Bos indicus* cows showed better oocyte quality, higher number of viable oocytes and increased *in vitro* embryo production than *Bos taurus* donors.

Keywords: Energy. Nutrition. *Bos indicus*. *Bos taurus*. Oocytes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama esquemático das diferentes fases do estudo e OPU destinadas à produção in vitro de embriões	53
Figura 2 - Animais do experimento em sistema tie-stall	56
Figura 3 - Sincronização da onda de crescimento folicular para realização da aspiração dos oócitos (D5) e do líquido folicular (D11). No D0 - administração de 2 mg de benzoato de estradiol e um implante auricular de norgestomet. No D5 - aspiração folicular para PIV. No D11 - aspiração do folículo dominante (FD) para coleta fluido folicular e retirada do implante.....	57
Figura 4 - Medidas de EGS na região do Bíceps femuris (EGSP8) e intercostal (EGSD) em doadoras Gir e Holandesas.....	61
Figura 5 - Diagrama esquemático das aspirações do FD durante o período experimental	63
Figura 6 - Modelo matemático utilizado para quantificação relativa dos genes	70
Figura 7 - Evolução do peso corporal de vacas Bos indicus e Bos taurus que receberam diferentes níveis de energia na dieta durante o período experimental. (A) Avaliação conforme a dieta (Alta energia - 170% da manutenção e Manutenção - 100% da manutenção). (B) Avaliação conforme a raça (Gir e HPB). Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB.....	74
Figura 8 - Evolução do peso corporal de vacas Bos indicus (A) e Bos taurus (B) que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental.....	76
Figura 9 - Evolução do ECC de vacas Bos indicus e Bos taurus que receberam diferentes níveis de energia na dieta durante o período experimental. (A) Avaliação conforme a raça (Gir e HPB). (B) Avaliação conforme a dieta (Alta energia - 170% da manutenção e Manutenção - 100% da de manutenção). Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB.....	77
Figura 10 - Evolução do ECC de vacas Bos indicus (A) e Bos taurus (B) que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental	78

- Figura 11 - Evolução da espessura de gordura subcutânea na região do Bíceps femuris (EGSP8; A) e intercostal (EGSD; B) de vacas que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB..... 80
- Figura 12 - Evolução da espessura de gordura subcutânea na região do Bíceps femuris (EGSP8, A) e intercostal (EGSD, B) de vacas Bos indicus (Gir) e Bos taurus (HPB) que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB..... 81
- Figura 13 - Média ($\pm$ EPM) de folículos visualizados no momento da aspiração folicular de vacas que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB..... 83
- Figura 14 - Média ($\pm$ EPM) de folículos visualizados no momento da aspiração folicular de vacas Bos indicus e Bos taurus durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB..... 83
- Figura 15 - Média ($\pm$ EPM) do número total de oócitos recuperados de vacas que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB 87
- Figura 16 - Taxa de recuperação de oócitos (%) de vacas que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB..... 87
- Figura 17 - Média ($\pm$ EPM) do número total de oócitos recuperados de vacas Bos indicus e Bos taurus durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB 89
- Figura 18 - Taxa de recuperação de oócitos (%) de vacas Bos indicus e Bos taurus durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB..... 89
- Figura 19 - Taxa de recuperação de oócitos de 9 OPU's sucessivas com intervalo de 14 dias realizadas em doadoras Bos indicus e Bos taurus 90

Figura 20 - Média ($\pm$ EPM) do total de oócitos viáveis de vacas que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB.....	91
Figura 21 - Média ($\pm$ EPM) do total de oócitos viáveis de vacas <i>Bos indicus</i> e <i>Bos taurus</i> durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB.....	91
Figura 22 - Média ($\pm$ EPM) do diâmetro do folículo dominante de doadoras de oócitos que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB.....	93
Figura 23 - Média ($\pm$ EPM) do diâmetro do folículo dominante de vacas <i>Bos indicus</i> e <i>Bos taurus</i> durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB	94
Figura 24 - Produção in vitro de embriões de vacas que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB.....	96
Figura 25 - Produção in vitro de embriões de vacas <i>Bos indicus</i> e <i>Bos taurus</i> durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB.....	98
Figura 26 - Produção in vitro de embriões de doadoras <i>Bos indicus</i> (Gir; n=14) e <i>Bos taurus</i> (HPB; n=14) que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental. Período 1 - PIV realizadas antes do 60º dia do período experimental e Período 2 - PIV realizadas depois do 60º dia do período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB.....	100
Figura 27 - Curvas de dissociação do gene GAPDH, β -ACTINA, HSP70.1, PRDX1, GLUT1, GLUT5, IGF1R e IGF2R obtidas após amplificação por PCR em tempo real de oócitos de vacas <i>Bos indicus</i> (Gir) e <i>Bos taurus</i> (HPB) que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental	103

- Figura 28 - Abundância relativa de transcritos (médias $\pm$ EPM) relacionados ao estresse (PRDX1, HSP70.1) e metabolismo celular (GLUT1, IGF1R e IGF2R) obtidas após amplificação por PCR em tempo real de oócitos de vacas que receberam dietas com alta energia (n=180; 170% da manutenção) ou energia de manutenção (n=180; 100% da manutenção). Foi utilizado como calibrador o Grupo dieta de manutenção 104
- Figura 29 - Abundância relativa de transcritos (médias $\pm$ EPM) relacionados ao estresse (PRDX1, HSP70.1) e metabolismo celular (GLUT1, IGF1R e IGF2R) obtidas após amplificação por PCR em tempo real de oócitos de vacas Bos indicus (Gir; n=180) e Bos taurus (HPB; n=180) submetidas à diferentes níveis de energia na dieta. Foi utilizado como calibrador o Grupo de vacas Bos taurus105
- Figura 30 - Abundância relativa de transcritos (médias $\pm$ EPM) relacionados ao estresse (PRDX1, HSP70.1) e metabolismo celular (GLUT1, IGF1R e IGF2R) obtida após amplificação por PCR em tempo real de oócitos de vacas Bos indicus que receberam dietas com alta energia (n=90; 170% da manutenção) ou energia de manutenção (n=90; 100% da manutenção). Foi utilizado como calibrador o grupo de vacas Gir que receberam dieta de manutenção 106
- Figura 31 - Abundância relativa de transcritos (médias $\pm$ EPM) relacionados ao estresse (PRDX1, HSP70.1) e metabolismo celular (GLUT1, GLUT5, IGF1R e IGF2R) obtida após amplificação por PCR em tempo real de oócitos de vacas Bos taurus (HPB) que receberam dietas com alta energia (n=90; 170% da manutenção) ou energia de manutenção (n=90; 100% da manutenção). Foi utilizado como calibrador o grupo de vacas HPB que receberam dieta de manutenção.. 107
- Figura 32 - Concentração sérica de glicose e no fluido folicular em vacas que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB 110
- Figura 33 - Concentração sérica de glicose e no fluido folicular de vacas Bos indicus e Bos taurus durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB 110
- Figura 34 - Concentração sérica de colesterol de vacas que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB..... 112

Figura 35 - Concentração sérica de colesterol de vacas Bos indicus e Bos taurus durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB.....	112
Figura 36 - Concentração sérica de colesterol de vacas Bos indicus (Gir; n=14) e Bos taurus (HPB; n=14) que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB	113
Figura 37 - Concentração de colesterol no fluido folicular de vacas Bos indicus e Bos taurus durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB.....	114
Figura 38 - Concentração de colesterol no fluido folicular de vacas que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB	114
Figura 39 - Concentração sérica de nitrogênio ureico de vacas que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB.....	116
Figura 40 - Concentração sérica de nitrogênio ureico de vacas Bos indicus e Bos taurus durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB.....	116
Figura 41 - Concentração de nitrogênio ureico no fluido folicular de vacas Bos indicus e Bos taurus durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB	117
Figura 42 - Concentração de nitrogênio ureico no fluido folicular de vacas que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB	117
Figura 43 - Concentração sérica de AGNE de vacas que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB.....	118

Figura 44 - Concentração sérica de AGNE de vacas Bos indicus e Bos taurus durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB.....	118
Figura 45 - Concentração de AGNE no fluido folicular de vacas que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB.....	119
Figura 46 - Concentração de AGNE no líquido folicular de vacas Bos indicus e Bos taurus durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB.....	119
Figura 47 - Concentração sérica de BHB de vacas Bos indicus e Bos taurus durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB.....	120
Figura 48 - Concentração sérica de BHB de vacas que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB.....	121
Figura 49 - Concentração de BHB no fluido folicular de vacas que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB.....	121
Figura 50 - Concentração de BHB no líquido folicular de vacas Bos indicus e Bos taurus durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB.....	122
Figura 51 - Correlação entre as concentrações metabólicas no soro e no fluido folicular de vacas Bos indicus (Gir) e Bos taurus (HPB) submetidas à dietas com diferentes níveis de energia.....	124
Figura 52 - Concentração sérica de insulina de vacas Bos indicus e Bos taurus durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB.....	127
Figura 53 - Concentração sérica de insulina de vacas que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB.....	128

- Figura 54 - Concentração de insulina no fluido folicular de vacas que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB..... 128
- Figura 55 - Concentração de insulina no líquido folicular de vacas *Bos indicus* e *Bos taurus* durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB..... 129
- Figura 56 - Correlação entre as concentrações de insulina no soro e no fluido folicular de vacas *Bos indicus* (Gir) e *Bos taurus* (HPB) submetidas à dietas com diferentes níveis de energia 129
- Figura 57 - Concentração de glicose no plasma após a infusão intravenosa de glicose (0,3 g/Kg de peso corporal) de vacas *Bos indicus* (Gir; n=14) e *Bos taurus* (HPB; n=14) que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental..... 130
- Figura 58 - Concentração de insulina no plasma após a infusão intravenosa de glicose (0,3 g/Kg de peso corporal) em vacas *Bos indicus* (Gir; n=14) e *Bos taurus* (HPB; n=14) que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental..... 132

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos animais nos diferentes grupos experimentais de acordo com o ECC, peso corporal, idade e população folicular ao início do período experimental - Valença, RJ - 2009.....	52
Tabela 2 - Proporção dos ingredientes e composição química das dietas experimentais - Valença, RJ - 2009	55
Tabela 3 - Coeficiente de correlação entre as variáveis Peso, ECC, EGSP8 e EGSD calculado pelo procedimento CORR do SAS - Valença, RJ - 2009.....	79
Tabela 4 - Quantidade e qualidade oocitária (média $\pm$ EPM) em vacas suplementadas com dietas de alta energia (1,7M) e manutenção (M) submetidas a 9 aspirações foliculares a cada 14 dias - Valença, RJ - 2009	84
Tabela 5 - Quantidade e qualidade oocitária (média $\pm$ EPM) em vacas secas <i>Bos indicus</i> e <i>Bos taurus</i> submetidas a 9 aspirações foliculares a cada 14 dias - Valença, RJ - 2009	85
Tabela 6 - Efeito de nível de energia na dieta sobre a produção de embriões <i>in vitro</i> de doadoras <i>Bos indicus</i> (Gir; n=14) e <i>Bos taurus</i> (HPB; n=14) submetidas a diferentes níveis de energia na dieta. Alta energia - 170% da manutenção e Manutenção - 100% da manutenção - Valença, RJ - 2009.....	95
Tabela 7 - Efeito de grupo genético (<i>Bos indicus</i> - Gir e <i>Bos taurus</i> - HPB) sobre a produção de embriões <i>in vitro</i> de embriões - Valença, RJ - 2009.....	98
Tabela 8 - Eficiência da reação para cada gene nas condições padronizadas da PCR em tempo real	102
Tabela 9 - Efeito de nível de energia na dieta sobre parâmetros bioquímicos séricos e no fluido folicular de doadoras <i>Bos indicus</i> (Gir; n=14) e <i>Bos taurus</i> (HPB; n=14) que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental - Valença, RJ - 2009. ...	109
Tabela 10 - Efeito de grupo genético (<i>Bos indicus</i> e <i>Bos taurus</i>) sobre parâmetros bioquímicos séricos e no fluido folicular de vacas secas doadoras de oócitos - Valença, RJ - 2009	111

Tabela 11- Concentração de glicose e insulina no plasma após a infusão intravenosa de glicose (0,3 g/Kg de peso corporal) em vacas <i>Bos indicus</i> (Gir; n=14) e <i>Bos taurus</i> (HPB; n=14) submetidas a diferentes níveis de energia na dieta. Alta energia - 170% da manutenção e Manutenção - 100% da manutenção - Valença, RJ - 2009	131
Tabela 12- Diferença entre vacas <i>Bos indicus</i> e <i>Bos taurus</i> submetidas à dieta de 170% da manutenção com concentração plasmática de insulina normal ou >3x o desvio padrão da concentração média de vacas alimentadas com dieta de manutenção - Valença, RJ - 2009	135

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 - Concentração sanguínea e no fluido folicular dos principais metabólicos e hormônios ligados à relação nutrição e reprodução. 1 AGNE - Ácidos graxos não esterificados. 2 BHB - β -hidroxibutirato. 3 IGF-1 - Fator de crescimento semelhante à insulina 1. 42
- Quadro 2 - Sequência dos primers específicos, temperaturas de pareamento, tamanho dos produtos e fonte de acesso às sequências no *GenBank* ou referências..... 67

LISTA DE SIGLAS

°C	graus Celsius
β-ME	β-Mercaptoetanol
μmol	micromol
μUI	micro unidade internacional
AGNE	ácidos graxos não esterificados
BEN	balanço energético negativo
BHB	beta-hidroxibutirato
CCO	complexos cúmulus-oócito
cDNA	DNA complementar
CESM	Campo Experimental Santa Mônica
CL	corpo lúteo
CNPGL	Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Leite
CO ₂	dióxido de carbono
D	dia
DMPBS	<i>Dulbecco's Modified Phosphate Buffered Saline</i>
DNA	ácido desoxirribonucléico
ECC	escore de condição corporal
EE	extrato etéreo
EGS	espessura da gordura subcutânea
EL _m	energia líquida para manutenção
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPM	erro padrão da média
FD	folículo dominante
FDA	fibra em detergente ácido
FDN	fibra em detergente neutro
FSH	hormônio folículo estimulante
g	grama
GAPDH	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GLUT	proteína transportadora de glicose
GnRH	hormônio liberador de gonadotrofinas

h	Horas
HPB	holandesa preta e branca
HSP70.1	proteína do choque térmico
IGF	hormônio do crescimento semelhante à insulina
IGFBP	proteína de ligação do IGF
IGFR	receptor para hormônio do crescimento semelhante à insulina
IQO	índice qualidade oocitária
k	taxa de metabolismo
Kg	kilograma
L	litro
LH	hormônio luteinizante
m	metro
M	manutenção
mg	miligrama
min	minuto
MIV	maturação <i>in vitro</i>
ml	mililitro
mm	milímetro
MS	matéria seca
n	número de unidades experimentais
N ₂	nitrogênio
NDT	nutrientes digestíveis totais
ng	nanograma
NPY	neuropeptídeo Y
NRC	Nutrient requirements of dairy cattle
NUS	nitrogênio ureico sérico
O ₂	oxigênio
OPU	aspiração folicular
P	probabilidade
PB	proteína bruta
PBS	tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PIV	produção <i>in vitro</i>

PRDX	peroxiredoxina
PVA	álcool polivinil
PVP	polivinil pirrolidona
r	coeficiente de correlação
R ²	coeficiente de determinação
RIA	radioimunoensaio
RNA	Ácido Ribonucléico
SAS	<i>Statistical Analysis System</i>
SFB	soro fetal bovino
SVC	soro de vaca em cio
$T^{1/2}$	meia vida
TCM 199	<i>Tissue Culture Medium 199</i>
TE	transferência de embriões
TTG	teste de tolerância à glicose
β-ME	β-Mercaptoetanol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	30
2 HIPÓTESE	32
3 OBJETIVOS.....	33
3.1 OBJETIVO GERAL	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4 REVISÃO DE LITERATURA	34
4.1 RELAÇÃO ENTRE A NUTRIÇÃO E A REPRODUÇÃO.....	34
4.2 DINÂMICA FOLICULAR E ENERGIA NA DIETA.....	34
4.3 SÍNTESE HORMONAL E ENERGIA NA DIETA	36
4.3.1 Gonadotrofinas.....	37
4.3.2 Hormônios Esteróides	38
4.4 QUALIDADE DE OÓCITOS E ENERGIA NA DIETA	39
4.5 METABÓLICOS NUTRICIONAIS E HORMÔNIOS LIGADOS À RELAÇÃO NUTRIÇÃO E REPRODUÇÃO	41
4.6 EXPRESSÃO GÊNICA EM OÓCITOS BOVINOS	45
4.7 PARTICULARIDADES DA FISIOLOGIA REPRODUTIVA DE <i>BOS INDICUS</i> E <i>BOS TAURUS</i>	47
4.7.1 Características do estro comportamental.....	47
4.7.2 Dinâmica folicular	48
5 MATERIAL E MÉTODOS	51
5.1 LOCAL E ANIMAIS DO EXPERIMENTO	51
5.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	51
5.3 ANÁLISE BROMATOLÓGICA DAS DIETAS DO EXPERIMENTO	54

5.4 SINCRONIZAÇÃO DA EMERGÊNCIA DA ONDA FOLICULAR E ASPIRAÇÃO FOLICULAR GUIADA POR ULTRASSONOGRAFIA	57
5.5 PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES	59
5.6 AVALIAÇÃO DO GANHO DE PESO, ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL E ESPESSURA DA GORDURA SUBCUTÂNEA (EGS).....	60
5.7 COLETAS DE SANGUE, FLUIDO FOLICULAR E ANÁLISE METABÓLICA E HORMONAL	62
5.8 TESTE DE TOLERÂNCIA A GLICOSE.....	65
5.9 QUANTIFICAÇÃO DE TRANSCRITOS EM OÓCITOS.....	66
5.9.1 Quantificação dos transcritos	66
5.9.2 Extração de RNA e síntese de DNA complementar (cDNA)	67
5.9.3 PCR em tempo real	68
5.10 AVALIAÇÃO DE FRAGMENTAÇÃO DO DNA PELO ENSAIO DE <i>TUNEL</i>	70
5.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	71
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
6.1 GANHO DE PESO, ECC E EGS	73
6.2 AVALIAÇÃO OVARIANA E OOCITÁRIA.....	82
6.3 AVALIAÇÃO DO DIÂMETRO DO FOLÍCULO DOMINANTE	92
6.4 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES	94
6.5 QUANTIFICAÇÃO DOS TRANSCRITOS.....	101
6.6 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA DO SORO E DO FLUIDO FOLICULAR.....	108
6.7 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE IGF1 NO SORO E NO FLUIDO FOLICULAR.....	125
6.8 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INSULINA NO SORO E NO FLUIDO FOLICULAR E TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE.....	126
7 DISCUSSÃO GERAL	136
8 CONCLUSÕES	138

9 IMPLICAÇÕES	139
REFERÊNCIAS.....	140

1 INTRODUÇÃO

O padrão atual estabelecido para avaliar bovinos de alto mérito genético e zootécnico estimula os criadores a promover excesso de peso nesses animais, prevalecendo aqueles melhor alimentados. Alguns trabalhos relatam que animais submetidos à dieta acima das exigências de manutenção, produção e crescimento apresentam problemas reprodutivos e menor performance nas biotecnologias da reprodução (O'CALLAGHAN et al., 2000; ARMSTRONG; GONG; WEBB, 2003; MOLLO et al., 2007; SANTOS et al., 2008; BASTOS et al., 2009). Dentre tais biotécnicas, podemos citar a redução no número de oócitos recuperados e no índice de blastocistos durante a produção *in vitro* (PIV) de embriões (ADAMIAK et al., 2005).

A relação entre a nutrição e a reprodução é complexa. Os fatores nutricionais podem agir em vários níveis do eixo hipotálamo-hipófise-ovários, o que reflete diretamente no desempenho reprodutivo (LEROY et al., 2008a). As mudanças agudas ou crônicas no plano nutricional e na condição corporal podem alterar a liberação e síntese de hormônios, a qualidade dos oócitos e o crescimento folicular (ARMSTRONG; GONG; WEBB, 2003). Em ruminantes, tais mudanças eventualmente não influenciam de forma significativa a liberação e concentração sanguínea de gonadotrofinas, entretanto, podem promover desequilíbrio nas concentrações circulantes de vários metabólicos e hormônios ligados ao metabolismo animal (insulina, IGF-1 e leptina). O desequilíbrio metabólico ocasiona alterações sistêmicas que podem interferir no sucesso das biotecnologias reprodutivas, tais como a PIV que, por sua vez, depende da qualidade inicial dos oócitos (WEBB et al., 2004).

Apesar dos avanços da PIV em bovinos nos últimos anos, esta ainda apresenta baixa eficiência na produção de embriões (GARCIA; SALAHEDDINE, 1998; MERTON et al., 2003). O baixo desempenho da PIV está relacionado a fatores técnicos e biológicos (BOLS et al., 2004). Por exemplo, a quantidade de matéria seca ingerida pelas doadoras de oócitos é um dos fatores biológicos que pode interferir nessa biotecnologia. Segundo Greer, Staigmiller e Parrish (1992), a alta variabilidade nas taxas de desenvolvimento *in vitro* de embriões pode ser influenciada pela dieta fornecida antes da aspiração folicular. Ainda, animais

alimentados com dieta acima da necessidade de manutenção apresentam menor taxa de desenvolvimento e viabilidade *in vitro* de embriões colhidos 2 dias após a fecundação (LOZANO et al., 2003). É importante ressaltar que a maioria dos trabalhos científicos correlatos ao assunto foi desenvolvida em animais cruzados (*Bos taurus* x *Bos indicus*), sendo necessário, concomitantemente, verificar os efeitos do excesso de energia em animais da espécie *Bos indicus* e *Bos taurus*. Além disso, a maioria dos trabalhos científicos avalia o efeito agudo do aumento energético da dieta sobre a fertilidade (LEROY et al., 2008a), sendo necessários estudos para os quais o objetivo seja avaliar o efeito crônico do excesso de energia na reprodução.

Particularidades reprodutivas podem ser observadas entre as espécies *Bos indicus* e *Bos taurus*. Em *Bos indicus*, o diâmetro do folículo dominante (FD) é menor em comparação ao *Bos taurus* (BASTOS et al., 2010). Além disso, o FD adquire capacidade ovulatória com diâmetro inferior aos taurinos (SARTORI et al., 2001; GIMENES et al., 2008). Outra diferença entre os dois grupos genéticos, com relevância para as biotecnologias (TE e PIV), é a ocorrência, no *Bos indicus*, de um número maior de folículos recrutados por onda de crescimento (CARVALHO et al., 2008). Além das diferenças reprodutivas, Silva et al. (2002) observaram que a exigência energética de manutenção para zebuínos é menor que taurinos, provavelmente em função do tamanho diferenciado dos órgãos. Segundo o NRC (2001), os bovinos da espécie taurina apresentam exigência energética de manutenção 10% superior aos zebuínos. Por outro lado, Freitas (2004) verificou não haver diferença para as exigências de energia e proteína líquidas entre diferentes grupos genéticos (*Bos indicus*, *Bos taurus* e cruzamento *Bos indicus* X *Bos taurus*).

Diante dos referidos efeitos da nutrição na reprodução e das diferenças reprodutivas apontadas entre *Bos indicus* e *Bos taurus*, torna-se importante a realização de estudos para verificar o perfil bioquímico e hormonal de vacas não lactantes doadoras de oócitos (*Bos indicus* e *Bos taurus*) submetidas a diferentes condições nutricionais (manutenção e alta energia). Dessa forma, será possível confrontar a relação nutrição e reprodução e analisar, simultaneamente nas duas espécies os efeitos de diferentes níveis de energia na dieta sobre a qualidade oocitária e a produção *in vitro* de embriões.

2 HIPÓTESE

Vacas *Bos indicus* e *Bos taurus* submetidas à dieta com alto nível de energia por período prolongado apresentam comprometimento na qualidade oocitária e na produção *in vitro* de embriões. Além disso, doadoras *Bos indicus* apresentaram melhor qualidade oocitária e maior produção *in vitro* de embriões do que doadoras *Bos taurus*. Ainda, os perfis metabólico e hormonal no soro e no fluido folicular são diferentes entre as dietas e os grupos genéticos. Por fim, a expressão dos genes das proteínas do choque térmico (*heat shock protein* 70.1 - HSP70.1), da peroxidase (PRDX1), do transporte de glicose (GLUT-1 e GLUT-5) e dos receptores do hormônio do crescimento semelhante à insulina (IGF1R e IGF2R) serão aumentadas em oócitos coletados de vacas submetidas a dieta com alto nível de energia em ambos os grupos genéticos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da dieta com diferentes níveis de energia no perfil metabólico e hormonal, na qualidade oocitária e na produção *in vitro* de embriões de vacas não lactantes *Bos indicus* e *Bos taurus* submetidas aspiração folicular guiada por ultrassonografia.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito da dieta com diferentes níveis de energia para vacas não lactantes *Bos indicus* e *Bos taurus* sobre:

1) A qualidade de oócito refletida pela:

- avaliação morfológica;
- fragmentação de DNA (*TUNEL*);
- expressão gênica (HSP70.1, PRDX1, GLUT-1, GLUT-5, IGF1R e IGF2R);
- produção *in vitro* de embriões.

2) A quantidade de folículos visualizados e oócitos recuperados;

3) Alterações de peso, escore de condição corporal e tecido adiposo subcutâneo;

4) Perfil bioquímico (glicose, colesterol, nitrogênio ureico, ácidos graxos não esterificados, betahidroxibutirato) no sangue e no fluido folicular e suas correlações;

5) Perfil hormonal (insulina e IGF-1) no sangue e no fluido folicular e suas correlações.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 RELAÇÃO ENTRE A NUTRIÇÃO E A REPRODUÇÃO

O efeito da nutrição na reprodução é um tópico amplamente discutido entre os pesquisadores. Vários estudos demonstram que a nutrição apresenta um papel importante na reprodução de ruminantes, pois alterações nutricionais podem influenciar diretamente o desempenho reprodutivo (BUTLER, 1998; BEAM; BUTLER, 1998; WEBB et al., 1999; LUCY, 2000, 2003; ARMSTRONG et al., 2003; WEBB et al., 2004; SANTOS et al., 2008). De fato, o estado nutricional e metabólico pode alterar os padrões de crescimento folicular, parâmetros endócrinos, concentrações circulantes de esteróides e atividade secretória do útero de bovinos (ROBINSON et al., 2006; LEROY et al., 2008a). Dessa forma, a ingestão apropriada de nutrientes é fundamental para o adequado desempenho reprodutivo em bovinos. Porém, essa relação é complexa e as respostas são frequentemente inconsistentes e variáveis (BOLAND et al., 2001).

4.2 DINÂMICA FOLICULAR E ENERGIA NA DIETA

Em bovinos, o crescimento do folículo primordial, uma vez iniciado, persiste até que ocorra a ovulação ou atresia. Os mecanismos que desencadeiam o início e número de folículos primordiais recrutados para o crescimento ainda não são totalmente conhecidos. Há evidências que o período necessário para o folículo primordial alcançar o estágio pré ovulatório é de aproximadamente 90 dias (CAMPBELL; SCARAMUZZI; WEBB, 1995). Durante o desenvolvimento inicial, os folículos primordiais crescem sob a influência de fatores de crescimento, secretados pelas células que circundam o oócito, e a partir da formação do antro folicular passam a ser dependentes de gonadotrofinas (WEBB et al., 2004). Durante tal período de desenvolvimento, além dos fatores de crescimento locais e de gonadotrofinas, os folículos podem ser influenciados por fatores externos, como a

nutrição (LEROY et al., 2008a). O conhecimento dos efeitos da nutrição no desenvolvimento inicial dos folículos ainda é escasso, principalmente por não haver informações aprofundadas dos fatores que desencadeiam o crescimento dos folículos primordiais. Porém, no desenvolvimento final do folículo (da emergência da onda folicular à ovulação), há vários estudos conduzidos para avaliar os efeitos da nutrição (STAGG et al., 1995; SCARAMUZZI et al., 2006).

O crescimento folicular final pode ser influenciado tanto pela escassez quanto pelo excesso de nutrientes disponíveis para a ingestão. Um dos principais fatores nutricionais que influencia os processos reprodutivos ligados à dinâmica folicular é a quantidade de energia fornecida (ARMSTRONG; GONG; WEBB, 2003). Alguns autores observaram que o excesso de energia na dieta aumenta o número de folículos recrutados (GUTIERREZ et al., 1997b; GONG et al., 2002a). Por outro lado, em revisão recente de Sartori et al. (2007), a alta ingestão de matéria seca pode reduzir o número de folículos recrutados. Além dos referidos efeitos no recrutamento folicular, a disponibilidade de energia na dieta pode interferir no desenvolvimento final do folículo. De fato, vacas alimentadas com dietas abaixo dos níveis de manutenção apresentaram comprometimento no crescimento folicular (MURPHY et al., 1991). Além disso, o diâmetro do folículo pré ovulatório correlaciona-se negativamente com a perda de peso durante o período pós parto em *Bos indicus* (RHODES et al., 1995) e durante o período de balanço energético negativo em vacas de leite (BEAM; BUTLER, 1999). Ainda, a restrição alimentar reduz o tamanho e a persistência do folículo dominante (MURPHY et al., 1991). A restrição nutricional aguda (40% da energia de manutenção) por 12 dias, além de diminuir a taxa de crescimento, reduz o diâmetro máximo do folículo dominante, resultando em falhas na ovulação (MACKEY et al., 1999). Resultados semelhantes foram observados por Bossis et al. (1999), para os quais houve redução na taxa de crescimento, no diâmetro do folículo ovulatório e na concentração de LH em novilhas de corte submetidas à restrição alimentar. A inadequada ingestão de energia está associada a efeitos inibitórios no hipotálamo e hipófise que resultam em redução na síntese e liberação de LH e, conseqüentemente, menor crescimento folicular (DISKIN et al., 2003). O excesso de energia interfere de forma diferente no crescimento final do folículo. Estudos demonstram que o excesso de ingestão de matéria seca aumenta a taxa de crescimento final do folículo tanto em ovelhas (DOWNING et al., 1995), quanto em novilhas (ARMSTRONG et al., 2001; MOLLO et al., 2007).

Em ruminantes, existe forte correlação entre o balanço energético negativo no início da lactação e a primeira ovulação pós-parto (CANTFIELD; BUTLER, 1990). Em animais sob dietas abaixo da energia de manutenção, frequentemente não se observa ovulação do folículo dominante, apesar de haver crescimento folicular. Tal fenômeno fisiológico é observado especialmente em vacas de corte com baixo escore de condição corporal (STAGG et al., 1995). Porém, nessa circunstância, além da baixa ingestão de energia, outros nutrientes essenciais também são ingeridos em quantidade abaixo da requerida para a manutenção.

Outro fator nutricional, relativo à disponibilidade energética, que pode interferir na reprodução são os lipídeos. Há evidências de que a suplementação da dieta com gordura aumenta o tamanho do folículo pré ovulatório (BEAM; BUTLER, 1997; MOALLEM et al., 2007). Segundo Mattos, Staples e Thatcher (2000), a suplementação com gordura altera o padrão de crescimento do folículo, independente da ingestão de energia. Os efeitos dos lipídeos no crescimento folicular estão relacionados à síntese de hormônios esteróides (STAPLES; BURKE; THATCHER, 1998), provavelmente pela maior concentração de colesterol, proveniente de ácidos graxos da dieta. Além disso, a suplementação com gordura na dieta pode melhorar o balanço energético no período pós parto, reduzindo as concentrações de ácidos graxos não esterificados (AGNE) e betahidroxibutirato (BHB) e aumentando as concentrações de glicose e insulina (MCNAMARA et al., 2003; MOALLEM et al., 2007).

4.3 SÍNTESE HORMONAL E ENERGIA NA DIETA

O período de crescimento final do folículo em bovinos (da emergência da onda à ovulação) é mantido por distintos hormônios do eixo hipotálamo-hipófise-ovários, os quais, em conjunto, promovem uma sequência de eventos que culmina com a ovulação (WEBB et al., 2004). Após a ovulação, inicia-se uma nova onda de crescimento folicular, caracterizada pelo recrutamento de um grupo de folículos que cresce sob dependência da ação de gonadotrofinas (CAMPBELL; SCARAMUZZI; WEBB, 1995). Durante o crescimento inicial, os folículos sintetizam hormônios (inibina e estradiol) que reduzem a secreção de FSH pela hipófise (GIBBONS;

WILTBANK; GINTHER, 1997; WEBB et al., 1999). Dos folículos recrutados, geralmente, apenas um continua seu desenvolvimento (folículo dominante; FD), enquanto o restante (folículos subordinados) entra em atresia (LUCY et al., 1992). Tal processo é conhecido como divergência ou desvio folicular. Após o desvio, o FD continua crescendo na dependência da ação do LH, até atingir o diâmetro suficiente para que ocorra a ovulação. Porém, em concentrações de progesterona acima de 1 ng/ml, o folículo pré ovulatório entra em atresia, por haver baixa frequência na pulsatilidade de LH (GINTHER et al., 2003). Após a atresia do FD, uma nova onda folicular inicia-se (WEBB et al., 1999). O FD somente irá ovular quando a concentração de progesterona for baixa, em função da luteólise (FORTUNE; RIVERA; YANG, 2004). O FD, após a ovulação, passa por um processo de luteinização, formando o corpo lúteo que secreta progesterona.

4.3.1 Gonadotrofinas

A nutrição pode influenciar a síntese e liberação dos hormônios reprodutivos necessários para o desenvolvimento folicular e subsequente ovulação. A interação entre a liberação de gonadotrofinas e fatores intrafoliculares que interferem no desenvolvimento folicular, estão diretamente ligados ao estado nutricional (WEBB et al., 2004). A restrição alimentar reduz a liberação de gonadotrofinas, principalmente no período pós parto inicial, por aumentar a liberação de opióides endógenos (AHMADZADEH; BARNES; PEARSON, 1998). Tais substâncias atuam no hipotálamo como neuromoduladores, diminuindo a síntese e liberação de GnRH (MC SHANE et al., 1993), efeito semelhante ao observado durante o período de amamentação (WILLIAMS, 1990; WILLIAMS et al., 1996). A ação no hipotálamo parece ser mediada pelo neuropeptídeo Y (NPY), o qual inibe indiretamente a secreção de LH e estimula a ingestão de alimentos (MC SHANE et al., 1993). O efeito inibitório dos opióides endógenos e do NPY sobre a secreção de GnRH parece estar seletivamente direcionado à liberação de LH pela hipófise, tendo pouca ou nenhuma ação na secreção de FSH. Provavelmente, tal diferença de atuação deve-se aos distintos mecanismos de síntese e liberação entre o LH e o FSH. A mudança no plano nutricional ao curto prazo não altera a secreção de FSH

(O'CALLAGHAN; BOLAND, 1999; ARMSTRONG et al., 2001; DISKIN et al., 2003). Porém, a restrição de alimentos durante um período prolongado induz anestro em vacas *Bos indicus* (RHODES et al., 1995), por interferir na síntese e liberação de LH (RHODES; ENTWISTLE; KINDER, 1996). Assim, os efeitos agudos da baixa ingestão de alimentos na produção e secreção de gonadotrofinas são relativamente menores, contrariamente à restrição alimentar por um longo período.

4.3.2 Hormônios Esteróides

Os principais hormônios esteróides ligados à reprodução de fêmeas são o estradiol e a progesterona. Em bovinos, o estradiol é sintetizado principalmente nos folículos ovarianos por uma cascata de enzimas que transformam o colesterol em andrógenos e, finalmente, em estradiol. Esse último é responsável pela manifestação do estro e modulação da síntese e liberação de GnRH/LH. A progesterona é sintetizada a partir da pregnenolona, por ação da enzima 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase (NISWENDER, 2002). A principal função da progesterona é preparar o útero para o desenvolvimento do embrião e subsequente manutenção da gestação.

A concentração de esteróides no sangue correlaciona-se positivamente com o tamanho do folículo dominante (VASCONCELOS et al., 2001). O diâmetro do folículo dominante e do corpo lúteo são maiores em vacas de leite de alta produção, em comparação às novilhas, porém, as vacas apresentam menores concentrações de progesterona (SARTORI et al., 2004) e estradiol (LOPEZ; SATTER; WILTBANK, 2004). Tais informações contraditórias podem ser explicadas pela redução na capacidade esteroideogênica do folículo e do corpo lúteo ou pela maior metabolização hepática dos hormônios esteróides devido a maior produção de leite. A segunda justificativa é mais plausível. Em vacas de alta produção, a ingestão de grande quantidade de matéria seca aumenta a circulação hepática e favorece a metabolização dos hormônios esteróides (SANGSRITAVONG et al., 2002; WILTBANK et al., 2006), reduzindo as concentrações circulantes de progesterona (VASCONCELOS et al., 2003; LOPEZ et al., 2005) e estradiol (LOPEZ; SATTER; WILTBANK, 2004). Entretanto, as novilhas apresentam respostas variáveis à

alimentação *ad libitum*, podendo aumentar (MCCANN; HANSEL, 1986), manter (SPITZER et al., 1978) ou diminuir as concentrações circulantes de progesterona (VILLA-GODOY et al., 1990). A baixa concentração de progesterona devido ao maior metabolismo hepático pode ser uma das causas da redução da fertilidade em vacas de alta produção (WILTBANK et al., 2006).

A baixa ingestão de alimentos pode influenciar a síntese de esteróides (SPICER; TUCKER; ADAMS, 1990). Vacas com perda de peso corporal por restrição alimentar apresentam menor concentração de progesterona e estradiol, provavelmente, pela redução na capacidade esteroidogênica do folículo e do corpo lúteo (LEROY et al., 2008a). A redução na síntese da progesterona aumenta a frequência de pulsos de LH e, indiretamente, altera a secreção de outros hormônios ovarianos (DOMINGUEZ, 1995). Ainda, a redução da progesterona pode interferir na nutrição do embrião, reduzindo as taxas de prenhez (MANN; LAMMING, 2001). A baixa ingestão de energia em novilhas cíclicas está associada a baixa concentração de progesterona no fluido de folículos médios e pequenos e, conforme referido anteriormente, ao menor diâmetro do folículo ovulatório (SPICER et al., 1990). Em outro estudo a restrição aguda da dieta reduziu o crescimento folicular, a concentração de estradiol em folículos ativos e a relação estradiol/progesterona (COMIN et al., 2002). Essas alterações podem ser sinal de luteinização prematura do folículo dominante, o que explica as possíveis falhas na ovulação observadas em animais em restrição alimentar.

4.4 QUALIDADE DE OÓCITOS E ENERGIA NA DIETA

Em bovinos, fatores extra ovarianos e locais atuam durante todo o período de crescimento do folículo (primordial a ovulatório), com duração média de 90 dias (WEBB et al., 2004). Os fatores de crescimento locais, tais como os IGFs, são responsáveis pelo desenvolvimento inicial dos folículos (ARMSTRONG et al., 2003), enquanto as gonadotrofinas (FSH e LH) são importantes no crescimento final (WEBB et al., 2004). Durante o longo período de crescimento folicular, o oócito passa por alterações e reinicia a divisão meiótica, induzida por fatores sintetizados pelas células da granulosa e da teca (MIYANO, 2003; CECCONI et al., 2004). Dessa

forma, a qualidade do oócito pode ser influenciada por fatores externos capazes de modificar o ambiente folicular, tal como a nutrição.

O oócito após a fecundação, além de contribuir com o material genético, fornece todos os componentes necessários para desenvolvimento inicial do zigoto. No citoplasma do oócito, proteínas e organelas são fundamentais para o crescimento embrionário inicial (SCHULTZ, 2002). Assim, o gameta feminino é importante não apenas para a formação do genoma, mas também no fornecimento de ferramentas necessárias para replicação celular. Diante de tais considerações, quaisquer alterações citoplasmáticas no oócito podem influenciar o crescimento subsequente do embrião (SCHULTZ, 2002).

Há evidências de que o prejuízo do excesso de energia na dieta sobre o desenvolvimento embrionário inicial esteja relacionado a alterações no crescimento folicular e na divisão meiótica final do oócito (LEROY et al., 2008a). Porém, ainda não foram estabelecidas com acurácia quais alterações do fluido folicular que eventualmente possam modificar o conteúdo do citoplasma do oócito, reduzindo sua viabilidade. Os hormônios metabólicos extra ovarianos (insulina e leptina) e fatores de crescimento locais estão envolvidos nos mecanismos pelos quais a dieta poderia interferir na qualidade dos oócitos (WEBB et al., 2004). Concentrações adequadas de insulina e IGF-1 são importantes para o crescimento folicular e maturação oocitária (LANDAU et al., 2000; ARMSTRONG et al., 2002a). No entanto, dietas que reduzem a concentração de IGFBP e, conseqüentemente, aumentam a disponibilidade de IGF-1 livre intrafolicular podem influenciar diretamente a qualidade do oócito (ARMSTRONG et al., 2001). Porém, o excesso de IGF-1 biodisponível pode apresentar efeito negativo sobre a competência oocitária (ARMSTRONG et al., 2002a).

Estudos realizados *in vivo* indicam haver relação entre o consumo de energia e a viabilidade do oócito (O'CALLAGHAN; BOLAND, 1999; BOLAND et al., 2001). Além disso, pesquisas *in vitro* demonstraram que fatores metabólicos agem diretamente nas células da granulosa e da teca (WEBB et al., 1999; LUCY, 2000; SPICER et al., 2002; ARMSTRONG; GONG; WEBB, 2003). McEvoy et al. (1995) observaram que a restrição alimentar em ovinos aumentou a quantidade de oócitos viáveis recuperados. Em vacas, a restrição alimentar prévia ao abate aumentou o desenvolvimento *in vitro* de embriões (MCEVOY et al., 1997). Já, em novilhas, a ingestão de dietas com alta energia diminui a qualidade dos oócitos e,

conseqüentemente, a produção de embriões *in vitro* (NOLAN et al., 1998; ADAMIAK et al., 2005). Em estudo realizado por Nolan et al. (1998), o fornecimento de dieta acima da manutenção aumentou o número de folículos aspirados, mas reduziu as taxas de clivagem e produção de blastocistos. De acordo com Lozano et al. (2000), não há diferença no número de oócitos colhidos e na taxa de clivagem entre as doadoras que receberam diariamente 3,5 Kg e 6,5 Kg de concentrado na dieta. Porém, nos animais alimentados com menor quantidade de concentrado, houve maior produção *in vitro* de embriões. Embora tais resultados não esclareçam o mecanismo de interação entre a nutrição e a qualidade do oócito, há comprovação de que o consumo de energia pode influenciar a qualidade dos oócitos.

4.5 METABÓLICOS NUTRICIONAIS E HORMÔNIOS LIGADOS À RELAÇÃO NUTRIÇÃO E REPRODUÇÃO

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 compilação de dados da literatura sugere que os distintos metabólicos e hormônios relacionados à nutrição servem como mensageiros para os processos reprodutivos. No quadro 1 estão apresentados as concentrações sanguíneas e no fluido folicular de alguns hormônios e metabólicos relacionados à nutrição e reprodução.

A glicose é o substrato metabólico mais importante para o adequado funcionamento dos processos reprodutivos em bovinos (SHORT; ADAMS, 1988), sendo a principal fonte de energia para o sistema nervoso central. A sua inadequada disponibilidade reduz a liberação hipotalâmica de GnRH (KEISLER; LUCY, 1996; WETTEMAN et al., 2003). Em vacas de corte, há grande variação na concentração de glicose, no entanto, alguns pesquisadores sugerem que o papel da glicose como mediador nutricional do controle reprodutivo não seja um fator decisivo, apenas um indicador de tolerância (KEISLER; LUCY, 1996).

	Sangue	Fluido Folicular	Raça/Categoria	Referências
Glicose	4,77 mM	2,85 mM	Holandesa/Vaca	Leroy et al. (2004a)
Colesterol	147,9 mg/dL	55,9 mg/dL	Holandesa/Vaca	Leroy et al. (2004a)
Uréia	20 mg/dl	17 mg/dL	Holandesa/Vaca	Hammon et al. (2005)
		16 mg/dL	Cruzadas/Vaca	Iwata et al. (2006)
AGNE ¹	0,58 mM	0,47 mM	Holandesa/Vaca	Leroy et al. (2004a)
BHB ²	0,33 mM	0,29 mM	Holandesa/Vaca	Leroy et al. (2004a)
Insulina	18,0 µUI/ml	...	Cruzadas/Novilha	Adamiak et al. (2005)
IGF-1 ³	297 ng/ml	243 ng/mL	Simental e Charolês/Vaca	Echtemkamp et al. (1990)
	176 ng/ml	68 ng/mL	Angus, Charolês, Simental e Hereford/Vaca	Kirby et al. (1993)

Quadro 1 - Concentração sanguínea e no fluido folicular dos principais metabólicos e hormônios ligados à relação nutrição e reprodução. ¹ AGNE - Ácidos graxos não esterificados. ² BHB - β-hidroxibutirato. ³ IGF-1 - Fator de crescimento semelhante à insulina 1.

Logo após o parto, durante o período de balanço energético negativo (BEN), ocorre grande mobilização das reservas corporais de tecido adiposo e formação de ácidos graxos não esterificados (AGNE) no fígado (CHILLIARD; BOCQUIER; DOREAU, 1998). No entanto, quando a produção de AGNE supera a capacidade hepática de oxidá-los, ocorre a formação de corpos cetônicos, dentre os quais se destaca o BHB (SMITH et al., 1997). 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. (2004a) verificaram que a constituição do fluido folicular de vacas de alta produção está diretamente associada à 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). Diante de tais dados, conclui-se que 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).

Para sustentar a produção de leite de vacas de alto mérito genético, são utilizados níveis elevados de proteína bruta nas dietas, principalmente aquelas rapidamente degradadas no rúmen pelas bactérias e protozoários (BUTLER, 1998). A rápida degradação ruminal de proteína leva ao acúmulo excessivo de amônia (SINCLAIR et al., 2000). A amônia absorvida pela parede ruminal é convertida em uréia no fígado e depois liberada na corrente sanguínea (BUTLER, 1998). Altas concentrações sistêmicas de uréia estão associadas à redução do pH uterino (7,1 para 6,8) e a alterações na composição do fluido uterino que podem criar um ambiente inapropriado para o desenvolvimento do embrião (ELROD; BUTLER, 1993; LAVEN et al., 2004). Ainda, estudos demonstraram os efeitos adversos da alta concentração de uréia na qualidade do oócito (HAMMON; WANG; HOLYOAK, 2000; SINCLAIR et al., 2000), do embrião (PAPADOPOULOS et al., 2001) e na taxa de prenhez (RHOADS et al., 2006).

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). Conforme anteriormente referido, os metabólicos AGNE e BHB estão correlacionados a baixas taxas reprodutivas.

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. Porém, se por um lado, as concentrações maiores de insulina podem estimular a retomada dos ciclos estrais, por outro, seu excesso pode diminuir a qualidade do oócito (GONG et al., 2002b). A quantidade de amido na dieta está diretamente relacionada à síntese de insulina. Vacas alimentadas com dietas ricas em amido apresentam alta concentração plasmática de insulina. Essa elevada concentração de insulina não interferiu na taxa de prenhez de vacas em lactação produtoras de leite (GARNSWORTHY et al., 2009). Porém, Fouladi-Nashta et al. (2007) evidenciaram que a adição de gordura nas dietas ricas em amido reduz as concentrações plasmáticas de insulina e melhora a competência de desenvolvimento dos oócitos. Tais estudos demonstraram que dietas que induzem altas concentrações de insulina podem afetar negativamente a qualidade do oócito. 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, 1997a; 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., 2002a). Porém, pouco é conhecido sobre os efeitos do sistema IGF durante o desenvolvimento pré antral dos folículos. No entanto, estudos demonstram que tanto o crescimento quanto a estrutura dos folículos pré antrais são regulados pelos IGFs (GUTIERREZ et al., 2000; MCCAFFERY et al., 2000). 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 redução da 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). Os efeitos da variação da concentração de IGFs, induzidas pela dieta estão diretamente relacionados às alterações reprodutivas promovidas pela insulina.

4.6 EXPRESSÃO GÊNICA EM OÓCITOS BOVINOS

A expressão de genes em embriões e oócitos é hoje uma importante ferramenta para compreender os processos fisiológicos, bem como avaliar os efeitos dos procedimentos realizados *in vitro* sobre gameta feminino e o subsequente desenvolvimento *in vitro* (BADR et al., 2007). Essa avaliação permite verificar o grau de interferência de biotecnologias que utilizam processo *in vitro* e com esse conhecimento, criar medidas para melhorar os resultados da produção *in vitro* de embriões. A capacidade de desenvolvimento do oócito pode estar relacionada com a presença ou quantidade de genes específicos expressos durante o desenvolvimento inicial do oócito (BILODEAU-GOELSELS, 2003). Assim, a qualidade do oócito pode correlacionar-se com a prevalência ou não de genes transcritos, bem como a presença de proteínas maternas transcritas nos embriões (SCHULTZ, 1993). Os principais genes estudados em oócitos estão associados com os estresses térmico e oxidativo, com o processo de apoptose, com fatores de crescimento e mais recentemente, com genes ligados à fatores nutricionais.

A HSP70 é uma “heat shock protein” com massa molecular de 70 kDa expresso em células expostas ao estresse térmico (KIANG; TSOKOS, 1998). Essas proteínas protegem as células de danos promovidos pelo calor, prevenindo a desnaturação de proteínas (KREGEL, 2002). Dessa forma, a HSP70 pode ser um indicador de estresse em oócitos bovinos (WRENZYCKI et al., 2001). Em estudo recente, Camargo et al. (2007) verificaram maior expressão de mRNA para HSP70.1 em oócitos imaturos provenientes de vacas *Bos taurus* (Holandesas), sugerindo que os oócitos de vaca Holandesa estava sobre maior efeito do estresse térmico e possivelmente, maior resistência das vacas *Bos indicus* a alta temperatura.

Outro fator que pode interferir na qualidade oocitária é o estresse oxidativo. A influência do estresse oxidativo na maturação do oócito e no desenvolvimento embrionário tem sido investigada pela expressão do gene peroxiredoxina (PRDX). As PRDXs constituem uma família de peroxidases envolvidas na proteção antioxidante das células (FERREIRA et al., 2009). Em bovinos, as PRDXs são identificadas no oócito antes e depois da maturação *in vitro* (LEYENS; KNOOPS; DONNAY, 2004) e os transcritos PRDX1 e PRDX2 são identificados como marcadores de maturação do oócito (THELIE et al., 2009). Apesar da importância desse gene para a maturação oocitária, em geral, parece não haver correlação entre a expressão de PRDX1 e o potencial de desenvolvimento do oócito (ROMAR et al., 2010).

Os fatores de crescimento semelhante à insulina (IGFs) regulam o crescimento folicular e potencializam a ação das gonadotrofinas nos ovários (WEBB; ARMSTRONG, 1998). Alguns autores observaram que a adição de IGF-1 exógena em meio de cultivo *in vitro*, melhorou a maturação de oócitos bovinos e o desenvolvimento embrionário inicial (PALMA et al., 1997; PAWSHE et al., 1998). Além disso, a alta concentração de IGF-2 no fluido folicular, no momento em que os oócitos são recuperados por OPU, sugere melhor maturação oocitária e desenvolvimento inicial do embrião (WANG et al., 2006). Em estudo recente, Wang et al. (2009) verificaram a existência em oócitos imaturos e maturados de receptores IGF-1 e IGF-2 e também em todos os estágios de desenvolvimento pré implantação do embrião. Assim, a expressão desses receptores é importante para adequada maturação do oócito e subsequente desenvolvimento do embrião.

A qualidade do oócito também é dependente da disponibilidade de glicose para os processos de maturação, fertilização e desenvolvimento inicial do embrião. A glicose é carregada para dentro da célula por proteínas de membrana conhecidas como transportadoras de glicose (GLUTs). A direção do transporte de glicose é regulada e dependente do tipo e status metabólico da célula (KAKUDA; MACLEOD, 1994). A expressão de GLUT1, GLUT3 e GLUT8 foram identificadas tanto em oócitos quanto em embrião em desenvolvimento inicial. Porém, transcritos para GLUT2 e GLUT4 só foram detectados em estágio de blastocistos alongados (D14 e D16) e blastocisto inicial, respectivamente (AUGUSTIN et al., 2001). Dessa forma, o padrão de expressão dos transportadores de glicose durante o desenvolvimento do embrião bovino é distinto entre as isoformas.

4.7 PARTICULARIDADES DA FISIOLOGIA REPRODUTIVA DE *BOS INDICUS* E *BOS TAURUS*

Nos últimos anos, o conhecimento da sincronização do desenvolvimento folicular e da ovulação, bem como a manipulação do ciclo estral em bovinos progrediram de forma rápida e sólida. Os novos conceitos em fisiologia reprodutiva facilitaram o emprego de biotecnologias como a inseminação artificial, transferência de embriões e aspiração folicular guiada por ultra-som seguida da produção *in vitro* de embriões (OPU-PIV). Tal avanço colaborou com a rápida difusão de material genético melhorador, ligado à produção de carne ou de leite. Assim, compreender as principais características do crescimento folicular e da ovulação é fundamental para aperfeiçoar as biotécnicas da reprodução e, conseqüentemente, melhorar a eficiência reprodutiva dos rebanhos.

Os aspectos da fisiologia reprodutiva de fêmeas bovinas, tais como comportamento estral, concentração de hormônios esteróides, características do desenvolvimento folicular e reprodutivas do pós-parto apresentam particularidades entre zebuínos e taurinos (SARTORI et al., 2010). Dessa forma, o conhecimento de diferenças na fisiologia reprodutiva entre *Bos indicus* e *Bos taurus* é fundamental para a obtenção de resultados satisfatórios em biotecnologias da reprodução, tais como inseminação artificial, superovulação, transferência de embriões e OPU-PIV.

4.7.1 Características do estro comportamental

Em fêmeas bovinas, a manifestação de estro é expressa por alterações comportamentais, caracterizadas por imobilização durante a monta, descarga de muco vaginal, vocalização freqüente, intensa movimentação, aumento na freqüência de micção e comportamento homossexual (ROELOFS et al., 2010). As características do estro são influenciadas pela idade (SILVA et al., 1981), raça (RAE et al., 1999), produção de leite (LOPEZ; SATTER; WILTBANK, 2004), condições ambientais (WHITE et al., 2002) e fatores sociais, como hierarquia (HERNÁNDEZ et al., 2004).

A duração do estro geralmente é menor em fêmeas *Bos indicus*, em média 10 horas (BÓ; BARUSELLI; MARTINEZ, 2003). Além disso, mais da metade das vacas *Bos indicus* iniciam a manifestação de cio no período noturno (MEMBRIVE, 2000), sendo 15% compreendido entre 18:00 e 6:00 h, ou seja, somente durante o período noturno (PINHEIRO et al., 1998). Mizuta (2003) avaliou o comportamento reprodutivo de vacas *Bos indicus* e *Bos taurus*, mantidas nas mesmas condições de manejo, com auxílio de radiotelemetria (Heat-Watch). A duração do estro em *Bos indicus* ($12,9 \pm 2,9$ horas) foi menor que em *Bos taurus* ($16,3 \pm 4,8$ horas). Apesar disso, o intervalo entre o estro e a ovulação não diferiu entre as espécies (*Bos indicus* - $27,1 \pm 3,3$ h e *Bos taurus* - $26,1 \pm 6,3$ h). No entanto, Lopez, Satter e Wiltbank (2004) verificaram que vacas holandesas de alta produção (*Bos taurus*) apresentam estro de curta duração, na dependência da produção de leite. A redução do período de estro deve-se provavelmente à diminuição das concentrações circulantes de estradiol, decorrente do maior metabolismo desse esteróide (WILTBANK et al., 2006). Efeitos semelhantes do metabolismo no comportamento de estro foram verificados em vacas *Bos indicus* (MOLLO et al., 2007). Embora existam diferenças entre *Bos indicus* e *Bos taurus* na duração e intensidade do estro, outros fatores como ingestão de matéria seca, peso corporal e metabolismo de esteróides podem alterar o comportamento de estro (SARTORI et al., 2010).

4.7.2 Dinâmica folicular

O ciclo estral em bovinos tem como padrão a formação de ondas de crescimento folicular (EVANS; ADAMS; RAWLINGS, 1994). Cada onda é caracterizada pelo rápido crescimento de um grupo de pequenos folículos, conhecido como emergência folicular (ADAMS; PIERSON, 1995). Em vacas *Bos taurus*, predominam ciclos estrais com duas ondas de crescimento folicular, podendo ocorrer até quatro em novilhas (SARTORI et al., 2004; WOLFENSON et al., 2004). Já em *Bos indicus*, predominam 3 ondas de crescimento folicular (ZEITOUN; RODRIGUEZ; RANDER, 1996; VIANA et al., 2000; MOLLO et al., 2007). Porém, em recente revisão, Sartori et al. (2010) relataram que vacas *Bos taurus* e *Bos indicus* apresentam número de ondas foliculares e amplitude do ciclo estral semelhantes.

Independente do número de ondas foliculares, as fêmeas *Bos indicus* apresentam maior número de folículos por onda de crescimento folicular do que as *Bos taurus* (CARVALHO et al., 2008; GIMENES et al., 2009; BASTOS et al., 2010). Essa característica tem impacto direto na eficiência das biotecnologias, como transferência de embriões e OPU-PIV. Acredita-se que essa característica diferencial entre as espécies esteja relacionada ao sistema IGF. As fêmeas *Bos indicus* apresentam maiores concentrações plasmáticas de IGF-1 e insulina (ALVAREZ et al., 2000; BÓ; BARUSELLI; MARTINEZ, 2003; BASTOS et al., 2010) e menores de FSH quando comparadas às vacas *Bos taurus* (ALVAREZ et al., 2000). Tal diferença pode justificar a maior sensibilidade das doadoras *Bos indicus* ao tratamento superovulatório (BARROS; NOGUEIRA, 2001).

Após a emergência, os folículos crescem por dois ou três dias (GINTHER et al., 2003). A partir desse momento, um folículo pré selecionado continua seu crescimento (folículo dominante - FD), enquanto os demais se tornam atrésicos e entram em regressão (folículos subordinados; LUCY et al., 1992). Esse processo fisiológico é conhecido como divergência ou desvio folicular. Nas vacas *Bos taurus*, a divergência folicular ocorre 2,8 dias após a emergência da onda folicular, momento no qual o FD atinge 8,3 a 9,0 mm de diâmetro (SARTORI et al., 2001; 2004; BASTOS et al., 2010). De forma semelhante, nas fêmeas *Bos indicus*, a divergência folicular ocorre entre 2,5 a 2,7 dias após a ovulação, porém isso ocorre quando o maior folículo atinge 5 a 7 mm de diâmetro (CASTILHO et al., 2007; GIMENES et al., 2008; BASTOS et al., 2010). Apesar da divergência folicular ocorrer em momentos semelhantes entre as espécies (em média 2,3 dias após a emergência; BASTOS et al., 2010), o diâmetro do folículo dominante no desvio folicular é maior em vacas *Bos taurus*, como relatado anteriormente. O exato mecanismo de seleção e dominância ainda é pouco conhecido. Ginther et al. (2001) relataram que os receptores de LH são expressos nas células da granulosa do futuro folículo dominante 8 horas antes do início da divergência folicular. A presença de tais receptores permite o crescimento folicular mesmo em baixas concentrações de FSH.

Apesar da expressão de receptores de LH no FD antes da divergência folicular (GINTHER et al., 2001), há estudos que demonstram a necessidade do FD apresentar crescimento adicional para adquirir capacidade ovulatória em ambas as espécies. Em vacas *Bos taurus* (diâmetro do FD no desvio de 8,3 a 9,0 mm), Sartori et al. (2001) verificaram que a capacidade ovulatória ocorre somente após os

folículos alcançarem 10 mm de diâmetro. Nas fêmeas *Bos indicus* (diâmetro do FD no desvio de 5 a 7 mm), Gimenes et al. (2008) observaram que após a administração de 25 mg de LH em novilhas com diferentes tamanhos de FD (7,0 a 8,4 mm; 8,5 a 10,0 mm e >10,0 mm), 33% dos FDs com diâmetros entre 7,0 e 8,4 mm ovulavam e que a resposta ao LH aumentava quando os FD atingiam diâmetros entre 8,5 e 10,0 mm (80%) e superiores a 10,0 mm (90%). Assim, a capacidade ovulatória em novilhas *Bos indicus* ocorre com diâmetros inferiores aos observados em *Bos taurus*.

As particularidades entre as fêmeas *Bos indicus* e *Bos taurus* também são observadas para o diâmetro do FD após a divergência folicular. Em *Bos taurus*, Ginther et al. (1989) relataram que o diâmetro máximo do FD durante a primeira e segunda onda foram de 17,1 e 16,5 mm, respectivamente. Porém, em fêmeas *Bos indicus*, Figueiredo et al. (1997) observaram diâmetros do FD inferiores em ambas ondas de crescimento folicular (11,3 mm para a primeira onda e 12,1 mm para a segunda). Essa diferença também foi observada em animais com três ondas de crescimento folicular (16,0; 12,9 e 13,9 mm para *Bos taurus*; GINTHER et al., 1989 e 10,4; 9,4 e 11,6 mm para *Bos indicus*; FIGUEIREDO et al., 1997). Resultados semelhantes foram encontrados por Bastos et al. (2010), para os quais as fêmeas *Bos taurus* apresentam maior diâmetro do folículo ovulatório ($15,7 \pm 0,3$ mm vs $13,4 \pm 0,3$ mm) e volume do corpo lúteo (CL - $7610,5 \pm 512,0$ mm³ vs $4916,6 \pm 548,1$ mm³) do que *Bos indicus*. Como o diâmetro do CL está diretamente relacionado ao tamanho do folículo ovulatório (VASCONCELOS et al., 2001), podemos inferir que o tamanho do CL em fêmeas *Bos indicus* é menor que em *Bos taurus*. De fato, estudos relativos verificaram corpos lúteos entre 17 e 21 mm de diâmetro em vacas *Bos indicus* (RHODES et al., 1995; FIGUEIREDO et al., 1997) e entre 20 e 30 mm em *Bos taurus* (GINTHER et al., 1989; KASTELIC; BERGFELT; GINTHER, 1990). De modo semelhante ao CL, a concentração sérica de progesterona foi menor em zebuínos (SEGERSON et al., 1984). No entanto, Bastos et al. (2010) verificaram maiores concentrações de progesterona e estradiol em vacas *Bos indicus* ($4,64 \pm 0,40$ ng/mL e $12,71 \pm 0,98$ pg/mL, respectivamente) do que em *Bos taurus* ($4,06 \pm 0,18$ ng/mL e $7,70 \pm 0,67$ pg/mL, respectivamente).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 LOCAL E ANIMAIS DO EXPERIMENTO

O experimento foi realizado de julho a novembro de 2009 no Campo Experimental Santa Mônica (CESM), pertencente à EMBRAPA Gado de Leite com sede em Juiz de Fora - MG. O CESM localiza-se a 22°21' de latitude sul e 43°42' de longitude oeste, a uma altitude média de 364 m, situado no distrito de Barão de Juparanã, no município de Valença-RJ. Durante o período experimental, a temperatura ambiental e umidade relativa do ar foram, respectivamente, de 20,1 °C e 84,7 % pela manhã (8:00 h), de 25,4 °C e 64,2 % à tarde (16:00 h) e de 19,7 °C e 87,1 % à noite (23:00 h). No presente experimento foram utilizadas 28 vacas pluríparas, não-lactantes, sendo 14 da raça Gir (*Bos indicus*) e 14 da raça Holandesa (HPB, *Bos taurus*). As vacas apresentavam escore de condição corporal (ECC) médio de $3,22 \pm 0,38$ (variando 2,75 a 3,75, WILDMAN et al., 1982), idade média de $5,21 \pm 0,56$ anos e peso corporal médio de $487,8 \pm 36,6$ Kg (variando de 440 a 570 Kg). As vacas da raça HPB apresentavam ECC médio de $2,84 \pm 0,67$, idade média de $4,78 \pm 0,53$ anos e peso corporal médio de $540,1 \pm 18,7$ Kg. As vacas da raça Gir apresentavam ECC médio de $3,36 \pm 0,11$, idade média de $5,64 \pm 0,59$ anos e peso corporal médio de $465,8 \pm 6,7$ Kg.

5.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O estudo foi dividido em 3 fases: Fase pré-experimental, Fase de adaptação e Fase de tratamento (Figura 1). Na fase pré-experimental, os animais foram submetidos a um período de 30 dias de adaptação ao sistema de *tie-stall* e à dieta a base de uréia e cana, fornecida à vontade. Durante esse período, três exames ultrassonográficos consecutivos (em intervalo de 10 dias) foram realizados para avaliar o número de folículos presentes nos ovários. Tais avaliações permitiram distribuir de forma equilibrada os animais entre os tratamentos, conforme a

população folicular visualizada, minimizando o efeito individual de doadora. Na fase de adaptação, todos os animais receberam dieta de manutenção durante 21 dias, com o objetivo de adaptar os animais à nova dieta. Na fase de tratamento, as vacas receberam as dietas experimentais durante 98 dias e foram distribuídas de forma equilibrada de acordo com o ECC, peso corporal, população folicular e idade (Tabela 1) em arranjo fatorial 2X2 (nível de energia da dieta e raça). Os níveis de energia utilizados no experimento foram 100% da energia de manutenção (M) e 170% da energia de manutenção (1,7M) e as raças utilizadas foram Gir (*Bos indicus*) e Holandesa (HPB, *Bos taurus*). Dessa forma, ficaram categorizados quatro grupos experimentais: 1) Grupo manutenção indicus - vacas da raça Gir, as quais receberam 100% da dieta de manutenção, 2) Grupo alta energia indicus - vacas da raça Gir. As quais receberam 170% da dieta de manutenção, 3) Grupo manutenção taurus - vacas da raça Holandesa, as quais receberam 100% da dieta de manutenção e 4) Grupo alta energia taurus - vacas da raça Holandesa, as quais receberam 170% da dieta de manutenção.

Tabela 1 - Distribuição dos animais nos diferentes grupos experimentais de acordo com o ECC, peso corporal, idade e população folicular ao início do período experimental - Valença, RJ - 2009

	<i>Bos indicus</i>		<i>Bos taurus</i>	
	Mantença	Alta energia	Mantença	Alta energia
ECC	3,45 ± 0,15	3,29 ± 0,12	2,84±0,10	2,86±0,05
Peso corporal (Kg)	455,7 ± 8,1	470,8 ± 5,3	546,3 ± 15,1	534,6 ± 21,7
Idade (anos)	6,00 ± 0,69	5,29 ± 0,53	5,14 ± 0,58	4,43 ± 0,48
População folicular (n)	28,3 ± 6,1	24,9 ± 3,7	25,8 ± 7,6	27,3 ± 5,4

As dietas experimentais foram formuladas a partir do programa SPARTAN (Michigan State University), de acordo com as exigências nutricionais para vacas Holandesas estimadas pelo NRC (2001). Os ingredientes utilizados na formulação das dietas foram cana de açúcar (fonte exclusiva de volumoso), farelo de soja, milho,

uréia pecuária e suplemento mineral. Em função da diferença de peso entre os animais dos diferentes grupos genéticos, quatro dietas foram formuladas. A proporção dos ingredientes e a composição química predita das dietas são apresentadas na tabela 2. A única diferença entre as dietas experimentais foi a quantidade de energia fornecida, mantendo de forma similar o nível diário de ingestão dos principais macro e micronutrientes. A quantidade de proteína (Kg/dia) fornecida foi semelhante entre os grupos experimentais. As dietas foram ajustadas de acordo com o ganho de peso a cada 15 dias.

MANTENÇA - GIR e HPB

ALTA ENERGIA - GIR e HPB

Figura 1 - Diagrama esquemático das diferentes fases do estudo e OPU destinadas à produção *in vitro* de embriões

Os animais permaneceram em sistema *tie-stall* (Figura 2), sendo as dietas fornecidas diariamente em duas refeições (8:00 e 16:00 horas). Esse sistema permitiu avaliar o consumo individual dos animais, a partir da pesagem da dieta total fornecida antes de cada refeição, bem como das sobras remanescentes em cada comedouro 24 horas após o fornecimento. O consumo diário individual foi aferido pela diferença entre o fornecido e a sobra da dieta total. Os animais foram liberados

à noite (23:00 horas) em piquete sem gramínea, tendo acesso livre à água. Durante o período experimental, os animais foram submetidos a nove punções foliculares com intervalo de 14 dias.

5.3 ANÁLISE BROMATOLÓGICA DAS DIETAS DO EXPERIMENTO

As análises das dietas foram realizadas no Laboratório de Bromatologia da EMBRAPA-CNPGL, em Juiz de Fora-MG. Amostras semanais de volumoso, concentrado e das dietas completas foram coletadas durante todo o período experimental. Após as coletas, as amostras foram armazenadas a -20°C para posterior análise bromatológica, seguindo as recomendações de Silva e Queiroz (2002). Ao final do experimento, as amostras foram homogeneizadas e, aleatoriamente, retirou-se uma parte para realização das análises bromatológicas. As amostras foram pré-secadas por 72 h em estufa com circulação e renovação de ar, modelo TE-394/3 (Tecnal Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP) a 55°C e moídas em moinho de facas do tipo Willey da marca NÚCLEO, modelo MR340, dotado de peneira com perfurações de 1 mm. Na análise bromatológica, as amostras foram analisadas quanto aos teores de matéria seca (MS) a 105°C, proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA, Tabela 2).

Tabela 2 - Proporção dos ingredientes e composição química das dietas experimentais - Valença, RJ - 2009

Ingredientes (% MS)	Peso	Manutenção (M)		Alta Energia (1,7M)	
		450 Kg	550 Kg	450 Kg	550 Kg
Cana de açúcar picada		75,5	76,4	40,0	39,3
Fubá de milho		0,0	0,0	44,1	43,4
Farelo de soja		20,4	19,5	10,2	12,3
Uréia pecuária		1,9	1,9	0,9	0,9
Calcário		0,0	0,1	0,3	0,2
Mineral e vitamina		2,2	2,1	2,6	2,4
Bicarbonato de sódio		0,0	0,0	1,4	1,1
Óxido de magnésio		0,0	0,0	0,5	0,4
Composição química da dieta (% MS)					
Proteína Bruta (PB)		16,4	15,8	11,8	12,0
Fibra insolúvel em Detergente Neutro (FDN)		41,4	41,8	26,5	26,3
Fibra insolúvel em Detergente Ácido (FDA)		26,7	26,9	15,6	15,4
Extrato Etéreo (EE)		1,5	1,4	2,7	2,7
Nutrientes Digestíveis Totais (NDT)		62,5	62,2	71,2	71,4
Ingestão diária estimada ¹					
Matéria Seca (Kg)		6,61	8,11	9,59	11,63
Proteína Bruta (Kg)		1,08	1,29	1,13	1,39
EL _m (Mcal) ²		9,00	11,01	15,43	18,81
Cálcio (% MS)		0,54	0,56	0,54	0,56
Fósforo (% MS)		0,33	0,33	0,36	0,37

¹Estimadas pelo SPARTAN (Michigan State University). ²Energia líquida para manutenção.

Figura 2 - Animais do experimento em sistema *tie-stall*

5.4 SINCRONIZAÇÃO DA EMERGÊNCIA DA ONDA FOLICULAR E ASPIRAÇÃO FOLICULAR GUIADA POR ULTRASSONOGRRAFIA

As aspirações foliculares foram precedidas de sincronização da emergência da onda de crescimento folicular, na qual consistiu em administrar 2 mg de benzoato de estradiol (Sincrodiol®, Ourofino Agronegócio) e um implante auricular de norgestomet (Crestar®, Intervet Schering-PloughAnimal Health). Cinco dias após a administração dos tratamentos hormonais, realizou-se a OPU. Os animais permaneceram com o implante auricular por mais 6 dias para realizar a colheita do fluído folicular do folículo dominante (Figura 3).

Figura 3 - Sincronização da onda de crescimento folicular para realização da aspiração dos oócitos (D5) e do líquido folicular (D11). No D0 - administração de 2 mg de benzoato de estradiol e um implante auricular de norgestomet. No D5 - aspiração folicular para PIV. No D11 - aspiração do folículo dominante (FD) para coleta fluído folicular e retirada do implante

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 sabão e água da região posterior dos animais 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 (Anestésico L®, Pearson). Em seguida, a probe convexa com frequência 8,0 MHz (Aquila, Pie

Medical, Holanda) 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 PIV, os ovários foram examinados por ultrassonografia para contagem e classificação dos folículos em 3 categorias: pequenos (2-5 mm), médios (6-9 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) acrescido de 1% de soro fetal bovino (SFB) 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 do campo experimental 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 filtragem, 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 A, grau B e grau C com três ou mais camadas intactas de células do cumulus foram considerados viáveis, enquanto os demais foram descartados. Entretanto, todos os CCOs obtidos por animal foram quantificados e utilizados para o cálculo das estruturas totais. Para a produção *in vitro*, os CCOs classificados com grau de qualidade C foram acondicionados em

criotubos diferente dos graus A e B. Os oócitos de graus A e B foram transferidos para mesmo criotubo.

Os CCOs selecionados foram 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 (TK Incubadora Programável Compacta, TK Tecnologia em Congelação Ltda, Uberaba, MG, Brasil) ao laboratório de Reprodução Animal (Sede da Embrapa Gado de Leite; Juiz de Fora, MG), por um período máximo de oito horas entre o início das punções foliculares. 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.

5.5 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

Os complexos *cúmulus*-oócitos foram submetidos à MIV em criotubos (no máximo 30 estruturas por criotubo) por 22 a 24 horas. Após a maturação, os CCOs selecionados foram fertilizados com espermatozóides descongelados (palheta de 0,25 mL) de um único touro com fertilidade *in vitro* comprovada (70% taxa de clivagem) em oócitos obtidos de ovários coletados em matadouro. Outros pré-requisitos mínimos foram: motilidade pós-descongelamento de 65% e vigor igual ou superior a 2,5 em meio Fert-TALP. Em todas as FIV foram utilizadas palhetas da mesma partida de sêmen (Marsall, touro da raça Holandesa, partida G 950406), para

ambos os tratamentos. O sêmen foi descongelado em banho-maria a 37°C por 1 minuto 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 µL cada; Nutricell). Para a separação dos espermatozóides viáveis, o tubo foi centrifugado por 5 minutos a 10.000 rpm, removido o sobrenadante e o sedimento ressuspensionado em 400 µL de meio Fert-TALP e submetido a outra centrifugação por 3 minutos a 10.000 rpm. Após esta última centrifugação, o sedimento foi ressuspensionado 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 espermatozóides/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 e 192 horas pós-fecundação (D7 e D8). 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.

5.6 AVALIAÇÃO DO GANHO DE PESO, ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL E ESPESSURA DA GORDURA SUBCUTÂNEA (EGS)

As avaliações supracitadas foram realizadas um dia após as aspirações foliculares, anterior ao fornecimento da primeira refeição (8:00 h) . O peso corporal das doadoras foi aferido em balança eletrônica (MGR 2000, Toledo, Brasil) calibrada com peso padrão. O ganho de peso durante o período experimental foi calculado pela diferença entre o peso inicial e final. O escore de condição corporal foi avaliado por um único técnico, segundo classificação de Wildman et al. (1982). As medidas da EGS foram realizadas em imagens ultrassonográficas utilizando ultrassom portátil

com probe linear com frequência de 3,5 MHz e 17,8 cm de comprimento (Scanner 200 VET, Pie Medical, Holanda). Duas medidas de EGS foram realizadas (WILSON,1992): uma na região do *Bíceps femuris* (EGSP8) e outra na região intercostal (EGSD). As imagens ultrassonográficas da EGSP8 foram realizadas entre o íleo e ísquio em posicionamento retilíneo entre as duas tuberosidades até identificação da borda superior do *Bíceps femuris* e as imagens da EGSD entre a 12^a e 13^a costelas (Figura 4). Após a contenção das doadoras, identificou-se o local onde seriam realizadas as imagens e recobriu-se com uma camada de óleo vegetal para melhorar a superfície de contato da probe com o couro do animal. A mensuração da EGSP8 e EGSD compreendeu entre o limite inferior da derme e a fáscia lata profunda dos músculos *Bíceps femuris* e *Longissimus dorsi*, respectivamente.

Figura 4 - Medidas de EGS na região do *Bíceps femuris* (EGSP8) e intercostal (EGSD) em doadoras Gir e Holandesas

5.7 COLETAS DE SANGUE, FLUIDO FOLICULAR E ANÁLISE METABÓLICA E HORMONAL

Durante o período experimental, foram realizadas colheitas de sangue semanais, concomitantes às aspirações foliculares e do FD para avaliação metabólica e hormonal. As amostras de sangue foram colhidas em 3 tubos de vácuo de 10 ml (Vacutainer®, Becton-Dickinson e Company, EUA), sendo um com fluoreto de sódio e dois sem anticoagulante. Durante as colheitas, o sangue foi mantido em caixa de isopor com gelo e, então, conduzido ao laboratório. O plasma e soro foram separados por centrifugação (3000 rpm, Centrífuga Excelsa Baby®, Fanem, Brasil) durante 10 minutos. O soro e plasma separados foram acondicionados em tubos esterilizados (Tubos Eppendorf 3810X standard®, Eppendorf, Alemanha) com identificação e em seguida, armazenados em freezer a -21°C até posterior análise.

A amostra de líquido folicular foi obtida por aspiração do folículo dominante, 11 dias após o início da sincronização (ou 6 dias após a OPU; Figura 3). Durante o período experimental, foram realizadas 10 OPUs do FD (Figura 5). Antes da aspiração do FD, realizou-se a mensuração do maior diâmetro desse folículo por ultrassonografia transvaginal com probe convexa de frequência 8,0 MHz (Aquila, Pie Medical, Holanda). A aspiração do FD foi semelhante ao descrito no item 5.4 da seção Material e Métodos. As únicas diferenças foram que o conteúdo do FD foi direcionado para um tubo de 5 ml e ao final da aspiração, o sistema foi lavado com dois mililitros de cloreto de sódio. Após esses procedimentos, o líquido folicular foi aferido, centrifugado e armazenado em tubo plástico (Tubos Eppendorf 3810X standard®, Eppendorf, Alemanha) com identificação, e em seguida, armazenados em freezer a -21°C até momento da análise.

MANTENÇA - GIR e HPB **ALTA ENERGIA - GIR e HPB**

Figura 5 - Diagrama esquemático das aspirações do FD durante o período experimental

As avaliações metabólicas e hormonais foram realizadas no soro e líquido folicular. Na avaliação metabólica, foram analisadas as concentrações de glicose, colesterol, nitrogênio ureico plasmático, BHB e AGNE e na hormonal, a concentração de insulina e IGF-1.

A determinação dos teores de glicose plasmáticas e do fluido folicular das amostras foi realizada por método enzimático colorimétrico, utilizando o kit CAT 02200 (Laborlab®, Guarulhos, Brasil), adaptado para leitura em tubos no aparelho do tipo espectrofotômetro com comprimento de luz de 500 nm. No método proposto por Trinder (1969), a glicose é oxidada a peróxido de hidrogênio e a reação deste com 4-aminoantipirina e fenol formam a quinoneimina, um composto de cor rosa. Os resultados foram expressos em mg/dL.

O teor de colesterol sérico e do fluído folicular foi quantificado por metodologia enzimática colorimétrica, em Analisador Bioquímico modelo AMS (Liasys®, Itália) utilizando-se kit comercial (Biosystems®, Espanha). Nesse método, o colesterol é exposto à ação das enzimas colesterol esterase e posteriormente à colesterol oxidase, formando um subproduto e água oxigenada. A água oxigenada formada reage com a 4-amino antipirina e fenol, que na presença de peroxidase, forma um composto colorido cuja intensidade, em espectrofotômetro com comprimento de luz

de 500 nm, é diretamente proporcional à concentração de colesterol presente na amostra (ALLAIN et al., 1974). Os resultados foram expressos em mg/dL.

Os teores de AGNE séricos e do fluído folicular foram quantificados em Analisador Bioquímico modelo AMS (Liasys®, Itália), por método enzimático colorimétrico utilizando o kit comercial NEFA da marca Randox®. O teste consiste na ação da acil-CoA sintetase, na presença de ATP e cofatores, sobre os AGNEs resultando em acil-CoA, AMP e Ppi. A Acil-CoA é, então, oxidada, produzindo peróxido de hidrogênio, que será responsável pela reação de condensação de uma hidroxianilina com a aminoantipirina, presentes no reagente. Essa reação forma um composto de cor púrpura, o qual a intensidade de coloração, em espectrofotômetro com comprimento de luz de 500 nm, é diretamente proporcional à quantidade AGNE presente na amostra. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/L}$.

O teor de BHB sérico e do fluído folicular foi quantificado por metodologia enzimática colorimétrica em Analisador Bioquímico modelo AMS (Liasys®, Itália) utilizando o kit comercial Ranbut da marca Randox®. O teste consiste na reação desencadeada pela BHB desidrogenase presente no reagente. Tal reação transforma o BHB em acetoacetato. Concomitantemente, o NAD presente é reduzido a NADH, sendo a absorbância do NADH, espectrofotômetro com comprimento de luz de 340 nm diretamente proporcional à concentração de BHB presente na amostra (WILLIAMSON; MELLAMBY; KREBS, 1962). Os resultados foram expressos em mg/dL.

A concentração de uréia sérica e do líquido folicular foi determinada por método enzimático colorimétrico, descrito por Henry, Cannon e Winkelman (1974), utilizando o kit CAT 02800 (Laborlab®, Guarulhos, Brasil) adaptado para leitura em tubos no aparelho do tipo espectrofotômetro com comprimento de luz de 620 nanômetros. Em seguida as concentrações de uréia foram multiplicadas pelo fator 0,467 (HALLET; COOK, 1971) para obtenção dos teores de nitrogênio advindos da uréia. Os resultados foram expressos em mg/dL.

As concentrações de insulina no soro e no fluído folicular foi determinada por radioimunoensaio (RIA) em fase sólida, utilizando o kit comercial para dosagem de insulina (Coat-a-Count Insulin®, DPC Diagnostic Products Inc, Los Angeles, CA, USA), previamente validado para amostras em bovinos (REIMERS et al., 1982). No teste de RIA, a insulina marcada com o iodo ^{125}I compete, por um período fixo de tempo, com a insulina da amostra pelos sítios específicos do anticorpo anti-insulina.

Em razão do anticorpo estar imobilizado na parede do tubo de polipropileno, uma simples decantação do sobrenadante é suficiente para finalizar a competição e isolar a fração de insulina radiomarcada ligada ao anticorpo. Após esse procedimento o tubo é transferido para um contador Gamma que determina um número que deve ser convertido pela curva de calibração na medida de insulina presente na amostra. Os coeficientes de variação intra e inter-ensaios foram 5,79% e 8,93%. A sensibilidade analítica do teste foi 0,36 μ IU/mL de insulina. Os resultados foram expressos em μ IU/mL.

A concentração de IGF-1 foi mensurada por quimioluminência (IMMULITE IGF-I, Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles, CA) em um único ensaio. O teste é um ensaio quimioluminescente imunométrico em fase sólida utilizando marcador enzimático. A sensibilidade do ensaio foi de 25 ng/ml e coeficientes de variação alta e baixo foram de 4,06 % e 6,07 %, respectivamente.

5.8 TESTE DE TOLERÂNCIA A GLICOSE

No dia 123 do período experimental foi realizado o teste de tolerância à glicose (TTG), com o intuito de determinar o perfil de insulina durante 120 minutos. Antes de iniciar o teste, um cateter flexível de 18 gauge (BD Angiocath®, Becton, Dickinson e Company, EUA) foi introduzido na veia jugular das doadoras. O TTG iniciou-se 5 horas após o fornecimento das dietas segundo estudo proposto por Adamiak et al. (2005). Três amostras de sangue, com intervalo de 10 minutos (-20, -10 e 0 minutos) foram colhidas antes da infusão de glicose, com o objetivo de estabelecer as concentrações basais de glicose e insulina. Os animais receberam por infusão i.v. 0,3 g/kg de solução estéril de glicose [Glicose 50% (p/v)] durante 5 minutos, seguido por coletas de sangue aos 5, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100 e 120 minutos. Todas as amostras foram coletadas em tubos à vácuo de 4 ml (Vacutainer®, Becton-Dickinson e Company, EUA) contendo fluoreto de sódio. Utilizaram-se os mesmos procedimentos de manipulação e armazenamento do sangue e análises de glicose e insulina descritos no item 5.7 da seção Material e Métodos. O TTG foi realizado para calcular a taxa de metabolismo (k) e a meia vida ($T^{1/2}$) da glicose plasmática. O valor de k foi calculado pela fórmula: $k = ((\ln [\text{glicose}] T_{10} - \ln$

$[glicose] T40)/(T40 - T10))*100$, de acordo com Opsomer et al. (1999). Utilizando o valor de k , a meia vida da glicose foi calculada: $T^{1/2} = (0,693/k)*100$. A resposta da insulina após a administração de glicose foi avaliada pelo pico de concentração de insulina e incremento de insulina ($[insulina]$ no pico - $[insulina]$ basal; Δ Max).

5.9 QUANTIFICAÇÃO DE TRANSCRITOS EM OÓCITOS

Os oócitos utilizados para análise da expressão gênica foram obtidos a partir da aspiração folicular realizada após a última OPU para a produção *in vitro* de embriões, no final do período experimental (133^o dia). A OPU foi precedida de sincronização da onda de crescimento folicular e o método utilizado e manipulação dos COCs foram semelhantes aos descritos na seção 5.4. Após a OPU, os oócitos de qualidade A e B foram selecionados em meio PBS e tratados com a enzima hialuronidase em associação à agitação mecânica (vortex) para retirada das células do cumulus. Em seguida, os oócitos foram colocados em criotubos contendo 1 μ L de PBS-PVA e armazenados em nitrogênio líquido até realização das análises.

5.9.1 Quantificação dos transcritos

Os primers (heat shock protein 70.1 - HSP70.1 e β -ACTINA) foram desenhados a partir de sequências disponíveis no banco de dados do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) utilizando o programa Primer3 (ROZEN; SKALETISKY, 2000). Os primers foram produzidos de acordo com Mourot et al. (2006; peroxiredoxina 1 - PRDX1 e Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase - GAPDH), Sagirkaya et al. (2006; Glucose transporter 1 - GLUT1 e Insulin-like growth factor II receptor - IGF2R), Camargo et al. (2005; Glucose transporter 5 - GLUT5) e Bertoli et al. (2002; Insulin-like growth factor I receptor - IGF1R). Todos os primers foram sintetizados pela Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, EUA) e estão descritos no quadro 2.

Produto	Sequência do <i>primer</i>	Temperatura de pareamento	Tamanho produto (pb)	N° de acesso no GenBank/ Referência
PRDX1	F 5'ATGCCAGATGGTCAGTTCAAG3' R 5'CCTTGTTTCTTGGGTGTGTTG3'	53°C	224	Mourot et al. (2006)
HSP70.1	F 5'AACAAGATCACCATCACCAACG3' R 5'TCCTTCTCCGCCAAGGTGTTG3'	59°C	275	NM174550
GLUT1	F 5' -CCAAGGATCTCTCAGAGCACAG- 3' R 5' -TTCTTCTGGACATCACTGCTGG- 3'	53°C	110	Sagirkaya et al. (2006)
GLUT5	F 5' -CATGGTGGCGGGTACTGTTC- 3' R 5' -CGCAAAAATGACGAAGCTGTAAG - 3'	53°C	103	Camargo et al. (2005)
IGF1R	F 5' -CGCTGGATGTCCCCTGAGT - 3' R 5' -GTTGTCCGGCTTGTCCAGAA - 3'	53°C	180	Bertoli et al. (2002)
IGF2R	F 5' -CAGGTCTTGCAACTGGTGTATGA- 3' R 5' -TTGTCCAGGGAGATCAGCATG - 3'	53°C	137	Sagirkaya et al. (2006)
β -ACTINA (endógeno)	F 5'GACATCCGCAAGGACCTCTA3' R 5'ACATCTGCTGGAAGGTGGAC3'	53°C	205	NM_173979
GAPDH (endógeno)	F 5'CCAACGTGTCTGTTGTGGATCTGA3' R 5'GAGCTTGACAAAGTGGTCGTTGAG3'	53°C	237	Mourot et al. (2006)

Quadro 2 - Sequência dos primers específicos, temperaturas de pareamento, tamanho dos produtos e fonte de acesso às sequências no *GenBank* ou referências

5.9.2 Extração de RNA e síntese de DNA complementar (cDNA)

Nove *pools* de 10 oócitos de grau A ou B foram utilizados para cada tratamento. Na extração do RNA utilizou-se o kit comercial RNeasy Micro kit (Qiagen, Hilden, Alemanha). A lise da membrana celular procedeu-se pela ação do tampão RLT acrescido de 10% de β -Mercaptoetanol (β -ME; Gibco Brl Life Technologies, Nova York, EUA). Após a ruptura da membrana da célula, a amostra foi homogeneizada, acrescida de etanol a 70% e transferida para coluna de obtenção do RNA. A amostra foi lavada com tampão RW1 e posteriormente

incubada em solução de DNase por 15 minutos. Ao final desse processo, nova lavagem com o tampão RW1 e com o tampão RPE foi realizada. Em seguida, adicionou-se etanol 80% à coluna e centrifugou-se a amostra para secar a membrana que continha o RNA. No processo de eluição, adicionou-se 12 µL de água RNase-free perfazendo um volume final de aproximadamente 11 µL (~55 ng). A transcrição reversa foi obtida com o kit comercial SuperScript III First-Strand Synthesis Supermix (Invitrogen, Califórnia, EUA). Em cada reação de síntese de cDNA foram utilizados 6 µL (~30ng) de RNA. Uma reação contendo RNA, primer oligo dT, tampão de pareamento e água livre de RNase/DNase foi incubada por 5 minutos a 65°C. Em seguida, 12 µL de um mix (2X First-Strand reaction mix e SuperScript III RNaseOUT Enzyme mix) foi adicionado à reação. Essa reação permaneceu incubada a 50°C por 50 minutos e durante 5 minutos a 85°C. O volume final foi de 20 µL (~14.000 ng) de cDNA por reação.

Após a extração e transcrição reversa, 1 µL do RNA e cDNA de cada amostra foram avaliados em espectrofotômetro (Nanodrop ND-1000, Wilmington, EUA) para análise da concentração e pureza do material. O cDNA de cada grupo experimental permaneceu estocado em freezer a -80°C até posterior análise.

5.9.3 PCR em tempo real

Antes da quantificação dos transcritos pela PCR em tempo real, as concentrações dos primers e de cDNA foram padronizadas. De acordo com as concentrações de cDNA e primers escolhidas, utilizou-se quantidades de cDNA associadas às concentrações de primers que produzissem reações de PCR em tempo real com maior eficiência. Nos genes PRDX1, HSP70, GLUT1, GLUT5, IGF1R, IGF2R, GAPDH e β -ACTINA foram testadas três concentrações de cDNA (100, 200 e 400 ng) em uma diluição de primer de 200 nM. Adicionalmente, os genes PRDX1, HSP70.1 foram testados em 600 e 800 ng de concentrações de cDNA em uma diluição de primer de 100 nM. A eficiência de cada reação foi calculada utilizando o software LinRegPCR (RAMAKERS et al., 2003). Os valores logarítmicos de fluorescência em cada ciclo foram utilizados para obtenção da

inclinação da reta, calculada a partir de regressão linear simples e para o cálculo do coeficiente de correlação de Pearson.

Na análise de cada reação, somente os pontos com coeficiente de correlação entre 0,999 e 1 foram utilizados para o cálculo da eficiência. Desta forma foi possível obter a eficiência de cada reação individualmente. O valor de inclinação da reta foi empregado na fórmula: $Eff = 10^{-1/\text{slope}}$, onde $Eff = 1$, transcrição mínima e $Eff = 2$, transcrição máxima ou eficiência máxima (RAMAKERS et al., 2003). Após padronização, realizaram-se reações com o kit comercial Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A reação contendo cDNA, par de primers, Master Mix (dNTPs, referência passiva-ROX, SYBER Green) e 0,1 U de Taq DNA Polimerase, em um volume final de 25 µL, foi incubada a 95°C por 10 minutos, seguido de 45 ciclos de 95°C por 15 segundos, temperatura de pareamento específica para cada primer (quadro 2) por 30 segundos e extensão a 60°C por 30 segundos. Os controles negativos continham todos os reagentes sem a adição de cDNA.

Cada amostra de todos os grupos experimentais foi analisada nove vezes (9 PCR). No processo de análise dos genes, utilizaram-se placas ópticas de reação de 96 poços (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), seladas com filme adesivo óptico e amplificadas no aparelho de PCR em tempo real (ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems, Applied Biosystems). Na quantificação relativa utilizou-se o método do CT comparativo, com os resultados expressos em relação a genes de referência endógena e um grupo calibrador (grupo controle). Os genes de referência endógena foram GAPDH e β -ACTINA, por serem utilizados em outros estudos de expressão gênica em oócitos bovinos (MOUROT et al., 2006; SAGIRKAYA et al., 2007) e apresentarem pequena variação nos níveis de mRNA durante a MIV (BETTEGOWDA et al., 2006). O grupo calibrador utilizado foi diferente, de acordo com a comparação desejada. Na comparação entre as dietas, o grupo calibrador foi a dieta de manutenção. Na comparação entre grupos genéticos, utilizou-se como grupo calibrador as vacas *Bos taurus*. As análises da quantificação relativa dos genes foram realizadas de acordo com o método descrito por Pfaffl, Horgan e Dempfle (2002), utilizando o modelo matemático representado na figura 6.

$$\text{Quantidade Relativa} = \frac{(E_{\text{alvo}})^{\Delta CT_{\text{alvo}} (\text{média do controle} - \text{média da amostra})}}{(E_{\text{Ref}})^{\Delta CT_{\text{Ref}} (\text{média do controle} - \text{média da amostra})}}$$

Onde:

E_{alvo} = Eficiência da PCR dos genes alvo.

Controle = grupo controle (calibrador).

Amostra = grupo teste.

E_{Ref} = Eficiência da PCR do gene controle endógeno.

Figura 6 - Modelo matemático utilizado para quantificação relativa dos genes

5.10 AVALIAÇÃO DE FRAGMENTAÇÃO DO DNA PELO ENSAIO DE *TUNEL*

Concomitante às duas últimas aspirações do FD (FF9 e FF10), todos os folículos presentes em ambos os ovários foram puncionados. O método de aspiração folicular e manipulação dos COCs foram os mesmos descritos na seção 5.4. No laboratório, todos os oócitos (grau A, B e C) encontrados foram separados das células do *cúmulus* por ação da enzima hialuronidase (0,1%) associada à agitação mecânica (vórtex). Em seguida, os oócitos foram lavados 3 vezes em solução de 0,1% de Polivinil pirrolidona (PVP) em tampão fosfato-salino (PBS) e fixados em paraformaldeído 4% por 1 hora em temperatura ambiente. Posteriormente, os oócitos foram lavados novamente em PBS-PVP e mantidos em 400 µl dessa solução a temperatura de 4 a 8° C até o dia do ensaio. Os oócitos foram submetidos ao ensaio de TUNEL utilizando o kit comercial *In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein* (Boehringer Mannheim/Roche Diagnostics, USA) conforme descrito por Paula-Lopes e Hansen (2002) com pequenas modificações.

No dia do ensaio, os oócitos foram permeabilizados em solução de 0,5% Triton X-100 e 0,1% citrato de sódio em PBS durante 1 hora a temperatura ambiente em câmara úmida. Posteriormente foram lavados 2 vezes em PBS-PVP. Os controles positivos para o ensaio de TUNEL e os oócitos de cada grupo experimental foram lavados em PBS/PVP e incubados com 25 µL de mistura de reação de TUNEL (contendo *fluorescein isothiocyanate-conjugated dUTP* e a enzima *desoxynucleotidil*

transferase terminal preparados segundo instruções do fabricante) por 1 hora à 37°C em câmara úmida. A única diferença para o ensaio de TUNEL nos controles negativos foi ausência da enzima *desoxinucleotidil transferase terminal* na reação de incubação. Os controles positivos foram incubados com 1 µL/mL DNase por 1 hora à 37°C em câmara úmida antes do ensaio de Tunel. Após serem corados pela reação, os oócitos foram lavados novamente em solução de PBS-PVP e corados com Hoechst 33342 (5 µg/ml; Sigma St. Louis, MO, USA) por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, os oócitos foram lavados 6 vezes em PBS-PVP e colocados entre lâmina e lamínula com 1,4 -Diazabicyclo [2.2.2]octane (DABCO - Sigma St. Louis, MO, USA) para avaliação em microscópio de epifluorescência (Olympus IX80, Tóquio, Japão) com filtros adequados para os diferentes corantes. Para cada oócito, foi observado a presença de DNA íntegro (corado em azul) ou DNA fragmentado (corado em verde), visualizados pelos filtros DAPI (Hoechst 33342) e FITC (TUNEL), respectivamente. O filtro DAPI apresentava comprimento de onda de excitação de 359 nm e emissão de 461 nm e filtro FITC com comprimento de onda de excitação de 490 nm e emissão de 520 nm.

5.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com auxílio do software *Statistical Analysis System* for Windows SAS® (SAS, 2000). As variáveis contínuas foram avaliadas quanto à normalidade dos resíduos pelo procedimento UNIVARIATE e submetidas ao teste de Bartlett para analisar a homogeneidade das variâncias. Os dados que não atenderam as premissas da análise de variância foram transformados em: logaritmo na base 10 - Log₁₀ X; inverso - 1/X; elevado a raiz quadrada - X²; raiz quadrada - SQRT (X). As variáveis dependentes de distribuição normal (paramétricas) foram expressas em média e erro padrão da média (média ± EPM) e analisadas por medidas repetidas no tempo usando o procedimento MIXED do SAS. As variáveis binárias foram analisadas pelo procedimento GLIMMIX do SAS. No modelo estatístico, foram considerados os efeitos de dietas (alta energia e manutenção), grupo genético (*Bos indicus* e *Bos taurus*), tempo (OPU) e as interações

entre tais variáveis dependentes (dieta x grupo genético, dieta x tempo, grupo genético x tempo e dieta x grupo genético x tempo). O efeito de vaca foi incluído no modelo como fator aleatório. O ganho de peso foi analisado pelo procedimento GLM do SAS e as médias comparadas pelo teste de Tukey. A correlação do ECC e das medidas de espessura de gordura (EGSP8 e EGSD) e entre perfil bioquímico e hormonal no fluido folicular e sangue foram realizadas por correlação linear simples pelo procedimento CORR do SAS.

A análise estatística da quantificação relativa da PCR em tempo real foi realizada pelo Relative Expression Software Tool (REST®; PFAFFL; HORGAN; DEMPFLER, 2002) que possui o modelo estatístico Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation TEST® (versão 384 - Beta, 2005). Esse modelo foi desenvolvido com base em testes de permutação, como alternativa quando testes paramétricos não puderem ser utilizados. Esses testes obtêm resultados a partir de permutações aleatórias dos dados do experimento.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 GANHO DE PESO, ECC E EGS

Durante o período experimental, observou-se alta ingestão das dietas. A sobra diária da dieta total fornecida foi de 460 g para o Grupo Gir - manutenção, 740 g para o Grupo Gir - alta energia, 260 g para o Grupo HPB - manutenção e 490 g para o Grupo HPB - alta energia. Os resultados da evolução do peso corporal entre as diferentes raças e níveis de energia durante o período experimental estão representados na figura 7. Não houve interação entre as raças e os níveis de energia para o peso corporal ($P=0,28$) ao longo do período experimental. As vacas das raças *Bos taurus* e *Bos indicus* que receberam 1,7M de energia na dieta apresentaram maior peso corporal a partir do 30º e 44º dias do início dos tratamentos, respectivamente ($P=0,001$; Figura 8). Apesar do maior peso corporal das vacas *Bos taurus* ($P=0,001$), as doadoras *Bos indicus* apresentaram maior ganho de peso ($79,1 \pm 13,6$ Kg para Gir e $55,6 \pm 11,3$ para HPB; $P=0,03$) durante o período experimental.

A **B**

Figura 7 - Evolução do peso corporal de vacas *Bos indicus* e *Bos taurus* que receberam diferentes níveis de energia na dieta durante o período experimental. (A) Avaliação conforme a dieta (Alta energia - 170% da manutenção e Manutenção - 100% da manutenção). (B) Avaliação conforme a raça (Gir e HPB). Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB

No presente experimento, as dietas foram formuladas segundo as exigências nutricionais para vacas secas da raça Holandesa. A diferença no ganho de peso entre as raças deve-se, provavelmente, à menor exigência de energia para manutenção das vacas *Bos indicus* (SILVA et al., 2002). Segundo os referidos autores, a exigência energética de manutenção em zebuínos é menor, provavelmente pelo tamanho diferenciado dos órgãos abdominais entre as subespécies. Além disso, o NRC (2001) preconiza que taurinos apresentam exigência energética de manutenção 10% superior aos zebuínos. Por outro lado, Freitas (2004) verificou não haver diferença para as exigências de energia e proteína líquidas entre diferentes grupos genéticos (*Bos indicus*, *Bos taurus* e cruzamento *Bos indicus* X *Bos taurus*). Por este motivo, no presente experimento, utilizou-se como padrão de energia de manutenção aquela recomendada para *Bos taurus*, com o intuito de que ambos os grupos genéticos fossem submetidos às mesmas condições de manejo e alimentação, além de facilitar a logística de fabricação e controle das dietas experimentais.

Os resultados de ECC foram semelhantes aos observados para o ganho de peso corporal entre as diferentes raças e níveis de energia (Figura 9). Da mesma forma, não houve interação entre a raça e o nível de energia na dieta ($P=0,23$). Os ECCs foram diferentes entre as dietas (alta energia e manutenção) em *Bos taurus* e *Bos indicus* a partir do 30º e 44º dias do início dos tratamentos, respectivamente ($P=0,001$; Figura 10). Assim, o ECC pode ser uma importante e eficiente ferramenta para auxiliar na avaliação do ganho de peso de vacas.

A **B**

Figura 8 - Evolução do peso corporal de vacas *Bos indicus* (A) e *Bos taurus* (B) que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental

A **B**

Figura 9 - Evolução do ECC de vacas *Bos indicus* e *Bos taurus* que receberam diferentes níveis de energia na dieta durante o período experimental. (A) Avaliação conforme a raça (Gir e HPB). (B) Avaliação conforme a dieta (Alta energia - 170% da manutenção e Manutenção - 100% da de manutenção). Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB

Figura 10 - Evolução do ECC de vacas *Bos indicus* (A) e *Bos taurus* (B) que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental

As EGSP8 e EGSD foram maiores ($P=0,001$) nas vacas *Bos indicus* ($15,79\pm0,64$ e $7,33\pm0,39$ mm) do que nas *Bos taurus* ($2,29\pm0,19$ e $1,76\pm0,18$ mm). Além disso, verificou-se maior EGSP8 e EGSD nos animais que receberam dieta de alta energia a partir do 58º e 44º dias após o início dos tratamentos ($P=0,003$; Figura 11), respectivamente. Porém, houve interação entre a raça e a dieta tanto para a EGSP8 ($P=0,008$) quanto para a EGSD ($P=0,01$; Figura 12). O aumento da espessura de gordura subcutânea foi maior em vacas *Bos indicus* do que em *Bos taurus* quando submetidas à dieta com alta energia. Tal diferença entre os grupos genéticos provavelmente é consequência do tipo de deposição de gordura entre as duas subespécies. Em *Bos indicus*, o tecido adiposo de reserva é armazenado principalmente no subcutâneo, enquanto em *Bos taurus*, além do subcutâneo e da cavidade abdominal, o excesso de gordura tende a ser depositado entre as fibras musculares (MARSHALL, 1994; O'CONNOR et al., 1997; HASSEN; WILSON; ROUSE, 1998).

Verificou-se alta correlação positiva entre as variáveis ECC, EGSP8 e EGSD, porém, não houve correlação entre o peso e as referidas variáveis (Tabela 3). Semelhantemente aos resultados do presente experimento, Ayres et al. (2009) relataram que o ECC apresenta alta correlação ($r = 0,82$ a $0,93$) e relação ($R^2 = 0,73$ a $0,92$) com a espessura de gordura subcutânea. Assim, apesar do ECC ser uma avaliação visual subjetiva, pode ser uma importante ferramenta para avaliar o estado nutricional e metabólico, visto que apresenta alta correlação com a espessura de gordura subcutânea.

Tabela 3 - Coeficiente de correlação entre as variáveis Peso, ECC, EGSP8 e EGSD calculado pelo procedimento CORR do SAS - Valença, RJ - 2009

	ECC	EGSP8	EGSD
Peso	$r = 0,18$ $P = 0,005$	$r = 0,02$ $P = 0,69$	$r = 0,13$ $P = 0,03$
ECC		$r = 0,85$ $P = 0,0001$	$r = 0,80$ $P = 0,0001$
EGSP8			$r = 0,86$ $P = 0,0001$

ECC - Escore de condição corporal. EGSP8 - Espessura de gordura subcutânea na região do *Biceps Femuris*. EGSD - Espessura de gordura subcutânea intercostal.

Figura 11 - Evolução da espessura de gordura subcutânea na região do *Bíceps femoris* (EGSP8; A) e intercostal (EGSD; B) de vacas que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB

Figura 12 - Evolução da espessura de gordura subcutânea na região do *Bíceps femoris* (EGSP8, A) e intercostal (EGSD, B) de vacas *Bos indicus* (Gir) e *Bos taurus* (HPB) que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB

Diante de tais resultados, pode-se inferir que a quantidade de energia fornecida foi suficiente para promover aumento considerável de peso e ECC tanto em *Bos indicus* quanto em *Bos taurus*. Assim, espera-se que o excesso de energia

fornecido durante o experimento pode ter sido suficiente para promover as alterações metabólicas e endócrinas necessárias para modificar o desempenho reprodutivo das doadoras, conforme anteriormente relatado na literatura (NOLAN et al., 1998; YAAKUB; O'CALLAGHAN; BOLAND, 1999; O'CALLAGHAN et al., 2000; ADAMIAK et al., 2005; LEROY et al. 2008a; ROOKE et al., 2009).

6.2 AVALIAÇÃO OVARIANA E OOCITÁRIA

O número médio de folículos visualizados (> 2 mm) foi de $24,5 \pm 1,0$ para o Grupo alta energia e de $25,2 \pm 1,3$ para o Grupo manutenção e de $25,6 \pm 1,1$ para as vacas da raça Gir e de $24,2 \pm 1,1$ para as vacas da raça HPB. Apesar do efeito individual no número de folículos recrutados por onda de crescimento folicular (BURNS et al., 2005), as avaliações ultrassonográficas do período pré-experimental permitiram que os grupos fossem divididos de forma equilibrada de acordo com o número de folículos presentes nos ovários. Além disso, em função da alta repetibilidade e previsibilidade na população folicular (BONI et al., 1997), as eventuais variações no número de folículos recrutados durante o período experimental podem ser decorrentes dos tratamentos. Não houve interação ($P>0,05$) entre dietas, raças e tempo para o total de folículos visualizados. Também, não foi verificada diferença entre dietas (Figura 13, $P=0,55$), raças (Figura 14, $P=0,44$) e tempo ($P=0,26$) para a variável em questão. Os resultados estão apresentados nas tabelas 4 e 5. Em contraponto ao presente experimento, alguns estudos relatam que a alta ingestão de matéria seca pode aumentar (GUTIERREZ et al., 1997b; GONG et al., 2002a) ou até diminuir o número de folículos recrutados por onda de crescimento folicular (SARTORI et al., 2007). Além disso, pesquisas anteriores demonstram que fêmeas *Bos indicus* recrutam maior número de folículos por onda de crescimento folicular do que as vacas *Bos taurus* (CARVALHO et al., 2008; GIMENES et al., 2009; BASTOS et al., 2010). Durante a avaliação ultrassonográfica prévia ao início do presente experimento, foram selecionadas vacas com maior número de folículos visualizados para que houvesse quantidade suficiente de oócitos para as análises laboratoriais. Essa seleção, pode ter influenciado o número de folículos visualizados,

o que pode justificar em parte a diferença entre os resultados do presente experimento e os dados da literatura.

Figura 13 - Média ($\pm$ EPM) de folículos visualizados no momento da aspiração folicular de vacas que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB

Figura 14 - Média ($\pm$ EPM) de folículos visualizados no momento da aspiração folicular de vacas *Bos indicus* e *Bos taurus* durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB

Tabela 4 - Quantidade e qualidade oocitária (média $\pm$ EPM) em vacas suplementadas com dietas de alta energia (1,7M) e manutenção (M) submetidas a 9 aspirações foliculares a cada 14 dias - Valença, RJ - 2009

	Alta energia	Mantença	P
Número de animais	14	14	
Número de OPUs	126	126	
Folículos visualizados	24,5 $\pm$ 1,0	25,2 $\pm$ 1,3	0,55
Total de oócitos recuperados	18,6 $\pm$ 1,4	18,8 $\pm$ 1,2	0,74
Taxa de recuperação de oócitos (%)	75,5 (2306/3053)	74,7 (2353/3152)	0,32
Oócitos viáveis	14,6 $\pm$ 1,1	15,6 $\pm$ 1,1	0,49
Taxa de oócitos viáveis (%)	78,3 (1806/2306)	83,0 (1953/2353)	0,18
Número de oócitos (qualidade):			
- Grau A	3,19 $\pm$ 0,35	3,81 $\pm$ 0,39	0,17
- Grau B	7,10 $\pm$ 0,52	7,49 $\pm$ 0,58	0,53
- Grau C	4,38 $\pm$ 0,43	4,32 $\pm$ 0,35	0,88
- Degenerado	0,91 $\pm$ 0,19	0,82 $\pm$ 0,12	0,66
IQO*	2,21 $\pm$ 0,04	2,20 $\pm$ 0,04	0,93
Taxa de fragmentação de DNA (TUNEL) %	29,3 (27/92)	26,2 (28/107)	0,62

*IQO - Índice qualidade oocitária = (Grau A*1+ Grau B*2+ Grau C*3+ Degenerado*4)/total de oócitos recuperados. Modificado de Sales et al. (2008).

Apesar da redução numérica no total de folículos visualizados entre a primeira (26,6 $\pm$ 3,1 folículos) e a última (21,6 $\pm$ 1,9 folículos) aspiração folicular, não houve efeito da sessão de OPU no tempo (P=0,26). Diferentemente do presente estudo, Torres Junior et al. (2009) verificaram redução gradativa no número de folículos visualizados e oócitos recuperados em vacas Gir após 24 sessões consecutivas de OPU a cada 7 dias. Essas diferenças devem-se, provavelmente, à maior frequência de aspirações foliculares adotadas pelos referidos autores. Sucessivas aspirações foliculares promovem danos mecânicos que provocam alterações no parênquima ovariano (degeneração, fibrose ou aderência no estroma ovariano; VIANA et al., 2003), na esteroidogênese e no metabolismo do oócito (aumento de fatores inflamatórios locais; PETYIM et al., 2001; VIANA, 2002). Os achados do presente experimento são interessantes, pois asseguram que em vacas com população folicular mediana (15 a 25 folículos), um intervalo de 14 dias entre as OPUs

sucessivas pode não ser prejudicial a ponto de reduzir o número de folículos recrutados nas ondas foliculares subseqüentes, pois aparentemente permite a regeneração dos ovários puncionados. Porém, alguns trabalhos relatam que a maior frequência de aspiração folicular influencia de forma positiva a quantidade e qualidade de oócitos e, conseqüentemente, melhora as taxas de desenvolvimento *in vitro* de embriões (WALTON et al., 1993; GIBBONS et al., 1994; GARCIA; SALAHEDDINE 1998).

Tabela 5 - Quantidade e qualidade oocitária (média $\pm$ EPM) em vacas secas *Bos indicus* e *Bos taurus* submetidas a 9 aspirações foliculares a cada 14 dias - Valença, RJ - 2009

	<i>Bos indicus</i>	<i>Bos taurus</i>	<i>P</i>
Número de animais	14	14	
Número de OPUs	126	126	
Folículos visualizados	25,6 $\pm$ 1,1	24,2 $\pm$ 1,1	0,44
Total de oócitos recuperados	22,8 $\pm$ 1,5	14,6 $\pm$ 0,9	0,001
Taxa de recuperação de oócitos (%)	88,8 (2846/3205)	60,4 (1813/3000)	0,001
Oócitos viáveis	19,3 $\pm$ 1,2	10,8 $\pm$ 0,7	0,001
Taxa de oócitos viáveis (%)	84,9 (2416/2846)	74,1 (1343/1813)	0,001
Número de oócitos (qualidade):			
- Grau A	5,32 $\pm$ 0,44	1,66 $\pm$ 0,18	0,001
- Grau B	9,55 $\pm$ 0,62	4,92 $\pm$ 0,36	0,001
- Grau C	4,46 $\pm$ 0,44	4,24 $\pm$ 0,35	0,68
- Degenerado	0,82 $\pm$ 0,16	0,90 $\pm$ 0,15	0,76
IQO*	2,03 $\pm$ 0,03	2,37 $\pm$ 0,04	0,001
Taxa de fragmentação de DNA (TUNEL) %	16,6 (21/117)	40,6 (34/82)	0,004

*IQO – Índice qualidade oocitária = (Grau A*1+ Grau B*2+ Grau C*3+ Degenerado*4)/total de oócitos recuperados. Modificado de Sales et al. (2008)

Além da frequência de aspiração folicular, outro fator que pode influenciar o rendimento das aspirações foliculares é o número de folículos presentes nos ovários. Alguns estudos relatam que em vacas com baixa população folicular submetidas a sessões de OPU a cada 3 dias não há redução no número de folículos visualizados

e de oócitos recuperados (KRUIP et al., 1994; BONI et al., 1997). De forma diferente, em *Bos indicus* (Nelore), nos quais a população folicular geralmente é alta (>30 folículos), aspirações foliculares sucessivas com intervalo de 14 dias (6 OPUs) reduz o rendimento das OPUs subsequentes (GIMENES, 2010). Essa diferença de resposta entre vacas com alta e baixa população folicular, deve-se, provavelmente, ao maior risco de lesões ovarianas nas vacas submetidas ao maior número de punções ovarianas (VIANA et al., 2004). Logo, podemos inferir que animais com maior população folicular poderiam ser submetidos a aspirações foliculares com intervalos maiores (14 a 21 dias) para evitar a redução no rendimento de punções foliculares sucessivas.

No total de oócitos recuperados e na taxa de recuperação não se verificou interação ($P>0,05$) entre tratamento, raça e tempo. Também não houve diferença estatística para o número total de oócitos recuperados e para a taxa de recuperação entre dietas (Figura 15; $P=0,74$ e Figura 16; $P=0,32$, respectivamente). Porém, o total de oócitos recuperados (Figura 17, $P=0,001$) e a taxa de recuperação (Figura 18, $P=0,001$) foram menores em doadoras *Bos taurus*. Os resultados estão apresentados nas tabelas 4 e 5. A taxa de recuperação oocitária aumentou após as 2 primeiras OPUs e manteve-se constante até o final do período experimental (Figura 19; $P=0,005$).

O número de oócitos recuperados nas diferentes raças foi superior ao observado na literatura (HPB - entre 4 a 7; BILBY et al., 2006; LOPES et al., 2006; MERTON et al., 2009 e Gir - entre 7 a 15; VIANA et al., 2004, 2010; TORRES JUNIOR et al., 2008). Essa diferença pode ser atribuída à prévia seleção dos animais do presente estudo (período pré-experimental), a qual buscou priorizar vacas com maior número de folículos visualizados em duas avaliações com intervalo de 10 dias. Além disso, os animais foram sincronizados para que as aspirações foliculares fossem realizadas no início da emergência da onda, evitando a presença de corpo lúteo e/ou FD. O CL, além de reduzir o espaço ovariano e conseqüentemente o número de folículos recrutados, dificulta tecnicamente a aspiração folicular (LANSBERGEN et al., 1995; STUBBINGS; WALTON, 1995).

Figura 15 - Média ($\pm$ EPM) do número total de oócitos recuperados de vacas que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB

Figura 16 - Taxa de recuperação de oócitos (%) de vacas que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB

A presença do FD está associada à atresia de folículos em desenvolvimento, pela secreção de inibina e estradiol (FAUSER; VAN HEUSDEN, 1997; GARCIA; SALAHEDDINE, 1998; MIHM; AUSTIN, 2002). Ainda, as aspirações de folículos em atresia geram menor produção *in vitro* de embriões (MACHATKOVA et al., 2004). Apesar do FD induzir os demais folículos em desenvolvimento na onda de crescimento folicular à atresia, alguns estudos relatam que sua presença no dia da aspiração folicular não compromete o rendimento de oócitos submetidos à fecundação e cultivo *in vitro* (SMITH et al., 1996; GIMENES, 2010). O efeito do FD em promover a atresia nos folículos subordinados depende do período de estabelecimento da dominância. Ginther et al. (1999) relataram que até 48 horas após a divergência folicular, os folículos subordinados ainda são viáveis e podem, caso o FD seja removido, estabelecer dominância. Essa poderia ser uma explicação pelo qual alguns estudos relatam que a presença do FD no dia da aspiração folicular pode reduzir (GUILBAULT; ROUILLIER; MATTON; 1992; HAGEMANN, 1999; HAGEMANN et al., 1999; MACHATKOVA et al., 2004) ou não a viabilidade de oócitos em folículos subordinados (SMITH et al., 1996).

O número total de oócitos recuperados em doadoras Holandesas foi menor do que em doadoras Gir. Podemos especular que a menor recuperação de oócitos pela aspiração folicular em doadoras Holandesas possa ser atribuída a fatores intrínsecos que aumentam a adesão das células da granulosa à parede folicular, dificultando a aspiração do oócito junto ao fluido folicular. Além disso, observou-se menor número de camadas de células da granulosa ao redor dos oócitos de vacas Holandesas, o que reforça essa hipótese. Outra possibilidade para explicar a baixa taxa de recuperação em *Bos taurus* seria a menor adesão das células do cumulus ao oócito, observada em folículos de qualidade inferior, o que poderia reduzir a captação do oócito pela agulha de punção folicular.

Figura 17 - Média ($\pm$ EPM) do número total de oócitos recuperados de vacas *Bos indicus* e *Bos taurus* durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB

Figura 18 - Taxa de recuperação de oócitos (%) de vacas *Bos indicus* e *Bos taurus* durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB

Figura 19 - Taxa de recuperação de oócitos de 9 OPUs sucessivas com intervalo de 14 dias realizadas em doadoras *Bos indicus* e *Bos taurus*

Não houve interação entre as variáveis experimentais independentes (raça, dieta e tempo; $P > 0,05$) para os índices de qualidade oocitária avaliados. Também, não foram verificadas diferenças entre as dietas ($P > 0,05$) na qualidade oocitária e no número de oócitos viáveis (Figura 20). Porém, vacas *Bos indicus* apresentaram oócitos de melhor qualidade ($P < 0,01$) e maior número de oócitos viáveis (Figura 21). Além disso, verificou-se que oócitos de vacas *Bos taurus* apresentam maior taxa de fragmentação de DNA (apoptose) que vacas *Bos indicus* ($P = 0,004$, Tabela 5). As variáveis relacionadas à qualidade do oócito estão apresentadas na tabela 4 (efeito da dieta) e 5 (efeito do grupo genético). Em contraste ao presente experimento, vários estudos reportam que o excesso de energia diminui a viabilidade oocitária (NOLAN et al., 1998; YAAKUB; O'CALLAGHAN; BOLAND, 1999; O'CALLAGHAN et al., 2000; ADAMIAK et al., 2005, 2006; ROOKE et al., 2009). Porém, em tais estudos, o efeito da alta energia na dieta foi verificado na produção *in vitro* de embriões. Esse contraste com a literatura pode ser atribuído à subjetividade da avaliação visual dos oócitos. Além disso, Torres Junior et al. (2009) observaram que o efeito do estresse térmico na viabilidade oocitária somente foi verificado na taxa de

blastocisto, sendo as fases anteriores do processo de PIV semelhante entre os tratamentos.

Figura 20 - Média ($\pm$ EPM) do total de oócitos viáveis de vacas que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB

Figura 21 - Média ($\pm$ EPM) do total de oócitos viáveis de vacas *Bos indicus* e *Bos taurus* durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB

Os resultados referentes ao grupo genético demonstraram que vacas *Bos indicus* apresentaram melhor qualidade de oócitos do que *Bos taurus*. Resultados semelhantes foram relatados em novilhas (GIMENES et al., 2010) e em vacas (PONTES et al., 2010) submetidas à aspiração folicular. Em tais estudos, as doadoras *Bos taurus* (Holandesas) apresentaram oócitos de qualidade inferior às *Bos indicus* (Nelore; GIMENES et al., 2010 ou Gir; PONTES et al., 2010). Uma das possíveis justificativas para a diferença entre os grupos genéticos em relação à qualidade oocitária seria a concentração de IGF livre. Segundo Simpson et al. (1994), a concentração plasmática de IGF-1 é maior em vacas *Bos indicus* (Brahman, 41 ± 6 ng/ml) do que em vacas *Bos taurus* (Angus; 19 ± 6 ng/ml) e tal diferença de concentração pode estar associada à melhor qualidade dos oócitos.

6.3 AVALIAÇÃO DO DIÂMETRO DO FOLÍCULO DOMINANTE

No presente estudo, não se verificou interação ($P > 0,05$) entre dieta, raça e tempo para o diâmetro do FD da onda de crescimento folicular sincronizada pela OPU. Porém, as doadoras que receberam maior quantidade de energia na dieta apresentaram maior FD que doadoras submetidas a dieta de manutenção ($P = 0,009$; Figura 22). Ainda, doadoras *Bos taurus* apresentaram maior FD que vacas *Bos indicus* ($P = 0,001$; Figura 23). Resultados semelhantes foram observados em ovelhas (DOWNING et al., 1995) e em novilhas (ARMSTRONG et al., 2001; MOLLO et al., 2007), para os quais o excesso de ingestão de matéria seca aumentou a taxa de crescimento final do folículo dominante. Armstrong et al. (2001) atribuíram o maior diâmetro do FD ao aumento das concentrações de insulina e IGF-I livre, induzido pelas dietas com excesso de energia. Os autores observaram que a maior quantidade de IGF-1 disponível ocorreu pela diminuição da expressão de receptores de IGFBP-2 e -4. Assim, o aumento na taxa de crescimento do FD, induzido por dietas energéticas, ocorre provavelmente pela ação tanto da insulina quanto do IGF-I (BEAM; BUTLER, 1998). A insulina e a IGF-1 agem no FD estimulando a esteroidogênese e proliferação das células da granulosa (SPICER; ALPIZAR;

ECHTERNKAMP, 1993; GONG et al., 1994, 2002a; ARMSTRONG et al., 2002b). A ação do sistema IGF-1 no crescimento final do folículo está relacionada ao aumento da afinidade das gonadotrofinas aos receptores presentes nas células da granulosa (GONG et al., 1994; SPICER; STEWART, 1996). Além disso, o aumento do crescimento folicular pode ser influenciado pelo maior aporte de glicose para as células foliculares, induzido pela insulina.

Figura 22 - Média ($\pm$ EPM) do diâmetro do folículo dominante de doadoras de oócitos que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB

O diâmetro do FD também foi diferente entre os grupos genéticos, no qual doadoras da raça *Bos indicus* apresentaram menor diâmetro folicular. Resultados semelhantes foram observados por Bastos et al. (2010) para os quais o diâmetro máximo do folículo ovulatório foi maior em *Bos taurus* ($15,7 \pm 0,3$ mm) do que *Bos indicus* ($13,4 \pm 0,3$ mm). Tal diferença no tamanho do FD está relacionada às particularidades de cada grupo genético observada desde a divergência folicular, na qual o FD apresenta diâmetro entre 8,3 e 9,0 mm em *Bos taurus* (SARTORI et al., 2001, 2004; BASTOS et al., 2010) e entre 5 e 7 mm em *Bos indicus* (CASTILHO et al., 2007; GIMENES et al., 2008; BASTOS et al., 2010). É importante ressaltar que o

momento da divergência folicular é semelhante entre as subespécies (em média 2,3 dias após a emergência; BASTOS et al., 2010). Em função dessa particularidade entre os grupos genéticos, o diâmetro no qual o FD adquire a capacidade ovulatória também é menor em *Bos indicus*. Sartori et al. (2001) verificaram que a capacidade ovulatória em *Bos taurus* ocorre somente após o FD alcançar 10 mm de diâmetro. Já em fêmeas *Bos indicus*, Gimenes et al. (2008) observaram que o FD ovulam com diâmetro entre 7,0 e 8,4 mm. Assim, a capacidade ovulatória em *Bos indicus* ocorre com diâmetros inferiores aos observados em *Bos taurus*. Essas características justificam a diferença encontrada entre os grupos genéticos.

Figura 23 - Média ($\pm$ EPM) do diâmetro do folículo dominante de vacas *Bos indicus* e *Bos taurus* durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB

6.4 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

Durante o período experimental, diferentes problemas laboratoriais inviabilizaram a PIV de algumas aspirações realizadas. Por esse motivo, os dados

da PIV apresentados referem-se a quatro aspirações foliculares. O principal problema encontrado foi a contaminação do meio de cultivo. Concomitantemente, à quatro PIVs do presente experimento, foram realizadas manipulações controle a partir de oócitos obtidos de ovários coletados em abatedouro, obtendo-se taxa de clivagem de 63,9 % e taxa de blastocisto de 30,8 %. Os resultados da PIV foram semelhantes aos observados para as variáveis de qualidade de oócitos, a qual não se verificou interação entre dieta, raça e tempo ($P>0,05$). Também, não houve diferença entre alta energia e energia de manutenção na PIV ($P>0,05$; Tabela 6 e Figura 24). Porém, verificou-se que vacas *Bos indicus* apresentaram maior produção de embriões *in vitro* do que vacas *Bos taurus* ($P<0,05$; Tabela 7 e Figura 25). Essa diferença entre *Bos indicus* e *Bos taurus* na produção *in vitro* de embriões pode ser reflexo da qualidade dos oócitos enviados para PIV (Tabela 5) que é inferior em *Bos taurus*.

Tabela 6 - Efeito de nível de energia na dieta sobre a produção de embriões *in vitro* de doadoras *Bos indicus* (Gir; n=14) e *Bos taurus* (HPB; n=14) submetidas a diferentes níveis de energia na dieta. Alta energia - 170% da manutenção e Manutenção - 100% da manutenção - Valença, RJ - 2009

Qualidade dos oócitos	Grau A e B		Grau C		P	
	Alta Energia	Manutenção	Alta Energia	Manutenção	A e B	C
Número de OPU	56	56	56	56		
Número de estruturas clivadas	4,7 ± 0,5	5,6 ± 0,7	2,8 ± 0,3	3,2 ± 0,4	0,06	0,18
Taxa de clivagem (%)	62,4 (261/418)	60,6 (313/516)	47,8 (154/322)	54,6 (177/324)	0,90	0,27
Número de blastocistos no D8	2,2±0,4	2,4±0,4	0,7±0,4	0,8±0,4	0,73	0,62
Taxa de blastocistos (%)	29,9 (125/418)	25,8 (133/516)	12,1 (39/322)	14,5 (47/324)	0,48	0,62
Taxa de blastocistos D8 sobre oócitos clivados (%)	47,9 (125/261)	42,5 (133/313)	25,3 (39/154)	26,6 (47/177)	0,68	0,52

No presente estudo, a taxa de clivagem a partir de oócitos de vacas da raça Gir (71,7%) foi similar à observada na literatura (68,5 % a 71,1%; VIANA et al., 2004;

TORRES JUNIOR et al., 2009). Em vacas da raça Holandesa, as taxas de clivagem encontradas (38,8%) foram inferiores ao relatado em periódico (63%; SENEDA et al., 2001; PONTES et al., 2010). Porém, em outro estudo realizado em doadoras HPB, os autores encontraram taxas de clivagem semelhante ao presente experimento (FERREIRA et al., 2010). Verificou-se diferença estatística para a PIV entre os grupos genéticos, no qual vacas da raça Gir obtiveram maior produção *in vitro* de embriões.

Figura 24 - Produção *in vitro* de embriões de vacas que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB

Os achados para a produção de embriões *in vitro* entre grupos genéticos do presente estudo corroboram com os resultados observados recentemente por Camargo et al. (2007), Escalona et al. (2008) e Gimenes (2010). Camargo et al. (2007) verificaram que vacas da raça Gir apresentaram maior desempenho na PIV que vacas Holandesas. A redução no rendimento em *Bos taurus* foi atribuída não somente à menor taxa de fertilização, mas também a redução da capacidade de desenvolvimento após a fecundação. No estudo de Escalona et al. (2008), verificou-se que a PIV de doadoras Holandesas (*Bos taurus*) foi inferior ao observado em

vacas da raça Brahman (*Bos indicus*). As taxas de clivagem e blastocisto foram de 92,4% e 29,5% para as doadoras Brahman e 69,4% e 17,5% para vacas da raça Holandesa, respectivamente. Da mesma forma, Gimenes (2010) observou menores taxas de clivagem e de blastocisto no dia 7 na raça *Bos taurus* (82,6% e 28,3% para a raça Nelore e 59,9% e 14,1% para a raça Holandesa, respectivamente). Os autores (ESCALONA et al., 2008; GIMENES, 2010) atribuíram tal diferença entre *Bos indicus* e *Bos taurus* à menor resistência dos oócitos de raças taurinas ao estresse térmico. Dados da literatura suportam essa afirmação, no qual oócitos de vacas zebuínas submetidos ao estresse térmico apresentam menor comprometimento da produção *in vitro* de embriões (PAULA-LOPEZ et al., 2003). Além disso, Camargo et al. (2007) verificaram que oócitos de vacas Holandesas apresentaram maior expressão de genes ligados ao estresse térmico (HSP70.1) do que vacas Gir. Ainda, Torres Júnior et al. (2008) verificaram que o efeito do estresse térmico pode influenciar a taxa de desenvolvimento dos embriões *in vitro* por até 105 dias. Ainda não está bem definido o motivo pelo quais vacas *Bos indicus* são mais resistentes à temperatura elevada, mas a presença de algumas características que auxiliam na manutenção da homeotermia em condições de extremo calor pode ser uma explicação para tal diferença entre os grupos genéticos (HANSEN, 2004). Dessa forma, apesar dos animais serem submetidos às mesmas condições de manejo e o experimento ter iniciado no inverno, possíveis efeitos negativos do estresse térmico sobre a qualidade do oócito durante a estação quente pode ter influenciado as taxas de blastocisto no período do estudo.

Figura 25 - Produção *in vitro* de embriões de vacas *Bos indicus* e *Bos taurus* durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB

Tabela 7 - Efeito de grupo genético (*Bos indicus* - Gir e *Bos taurus* - HPB) sobre a produção de embriões *in vitro* de embriões - Valença, RJ - 2009

Qualidade dos oócitos	Grau A e B		Grau C		P	
	Gir	HPB	Gir	HPB	A e B	C
Número de OPU	56	56	56	56		
Número de estruturas clivadas	7,7 ± 0,5	2,5 ± 0,3	3,8 ± 0,3	2,11 ± 0,4	0,05	0,18
Taxa de clivagem (%)	73,6 (433/588)	40,8 (141/346)	67,9 (212/312)	35,6 (119/334)	0,01	0,01
Número de blastocistos no D8	3,8 ± 0,4	0,7±0,1	1,17 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,01	0,17
Taxa de blastocistos (%)	36,7 (216/588)	12,1 (42/346)	20,5 (64/312)	6,5 (22/334)	0,01	0,03
Taxa de blastocistos D8 sobre oócitos clivados (%)	49,9 (216/433)	29,8 (42/141)	30,2 (64/212)	18,5 (22/119)	0,05	0,18

Em função do comportamento das taxas da PIV ao longo do tempo entre as dietas experimentais, conforme demonstrado na figura 24, foi possível dividir as PIVs em dois períodos: antes e depois de 60 dias de fornecimento das dietas experimentais. Verificou-se que houve interação tripla entre dieta, raça e período para a PIV (Figura 26). As vacas *Bos indicus* apresentaram redução na taxa de blastocisto após ter recebido a dieta de alta energia por mais de 60 dias. Porém, em *Bos taurus* não se verificou efeito do excesso de energia nos diferentes períodos.

Semelhantemente ao encontrado no presente experimento, alguns estudos reportam que o excesso de energia reduz a produção *in vitro* de embriões (ADAMIAK et al., 2006; ROOKE et al., 2009). Em estudo conduzido por Armstrong et al. (2001), novilhas submetidas à dieta de alta energia (1,6 vezes a energia de manutenção) apresentaram comprometimento na qualidade do oócito. Ainda, o aumento da energia na dieta reduziu significativamente a concentração de mRNA para receptores de insulina e IGFBP-2 e -4 em folículos antrais pequenos e, conseqüentemente, aumentou a concentração de IGFs livres. Evento semelhante pode ser observado durante o processo de dominância folicular, na qual há significativa redução na concentração de mRNA para IGFBP-2 nas células da granulosa do FD. A redução no nível de IGFBP-2 no fluido folicular eleva a quantidade de IGF biodisponível, resultando em maior sensibilidade ou resposta ao estímulo do FSH. Assim, o FD mantém o crescimento contínuo mesmo em ambiente de baixa concentração sistêmica de FSH (ARMSTRONG et al., 1998). Porém, em estudos posteriores do mesmo grupo de pesquisa, as novilhas que receberam dietas de alta energia apresentaram aumento nas concentrações de IGF-1 circulantes (ARMSTRONG et al., 2001). Segundo Armstrong et al. (2002a), altas concentrações de IGF-1 biodisponível podem apresentar efeito negativo sobre a competência oocitária e, conseqüentemente, diminui o desenvolvimento embrionário *in vitro*.

Figura 26 - Produção *in vitro* de embriões de doadoras *Bos indicus* (Gir; n=14) e *Bos taurus* (HPB; n=14) que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental. Período 1 - PIV realizadas antes do 60º dia do período experimental e Período 2 - PIV realizadas depois do 60º dia do período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB

Em outro estudo, Adamiak et al. (2005) avaliaram o efeito do excesso de energia (2 vezes a manutenção) e do ECC na produção *in vitro* de embriões. Neste estudo, a ingestão de alta energia aumentou a taxa de blastocistos em novilhas com baixa condição corporal e diminuiu em vacas com ECC moderado. Provavelmente, no presente experimento, o comprometimento na taxa de blastocisto verificado em vacas *Bos indicus* após 60 dias de alta energia na dieta seja consequência do ECC mais elevado desse grupo genético em relação às vacas *Bos taurus*. Porém, no estudo de Adamiak et al. (2005) a alta energia na dieta somente apresentou efeito negativo no desenvolvimento de embriões *in vitro* em novilhas com ECC moderado que apresentaram quadro de hiperinsulinemia. Nas novilhas (ECC moderado) que

mantiveram as concentrações de insulina dentro da normalidade, a produção *in vitro* de embriões foi semelhante aos animais com a mesma condição corporal que receberam dietas de manutenção. Apesar de desconhecerem o mecanismo pelo qual a alta energia atua na qualidade dos oócitos, os autores atribuíram os resultados negativos na PIV ao excesso de insulina, visto que não foram encontradas alterações na concentração de outros hormônios estudados, tais como IGF-1 e leptina. Alguns estudos demonstram que animais com hiperinsulinemia crônica podem desenvolver um quadro de resistência à insulina com comprometimento do mecanismo de captação da glicose, levando a célula ao processo de apoptose (PANTALEON; KAYE, 1996; CHI; SCHLEIN; MOLEY, 2000). Por outro lado, Kendrick et al. (1999) observaram que o excesso de energia na dieta (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. É importante ressaltar que a categoria animal foi distinta entre os referidos experimentos (KENDRICK et al., 1999; ADAMIAK et al., 2005), fator que pode contribuir para a contrariedade dos resultados. 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). Dessa forma, os efeitos do excesso de energia na dieta ainda são controversos e dependentes de distintos fatores, tais como a condição corporal e fisiológica do animal.

6.5 QUANTIFICAÇÃO DOS TRANSCRITOS

A eficiência da reação para cada gene avaliado após a padronização da PCR em tempo real está apresentada na tabela 8. Na análise da quantificação relativa, utilizou-se como referência endógena o gene da GAPDH por apresentar menor coeficiente de variação (3,22%) entre as amostras do que a β -ACTINA (4,38%).

Tabela 8 - Eficiência da reação para cada gene nas condições padronizadas da PCR em tempo real

Gene	Eficiência média	Gene	Eficiência média
PRDX1	1,72	IGF1R	1,80
HSP70.1	1,76	IGF2R	1,78
GLUT1	1,91	β -ACTINA	1,81
GLUT5	1,42	GAPDH	1,86

Os transcritos para HSP70.1, PRDX1, GLUT1, IGF1R e IGF2R foram detectados em todas as amostras avaliadas. Contudo, a quantificação de transcrito para GLUT5 foi detectada exclusivamente em oócitos de vacas *Bos taurus*, tanto no Grupo de alta energia na dieta quanto no Grupo de manutenção. Possivelmente, nas vacas *Bos indicus* do presente experimento, a quantidade desses transcritos em oócitos era muito pequena ou ausente, o que impossibilitou sua detecção pela técnica PCR em tempo real. Vale ressaltar que essa técnica é mais sensível e precisa que a PCR convencional (BETTEGOWDA; PATEL; IRELAND, 2006). Na literatura existem relatos da expressão de gene para GLUT5 em oócitos e embriões de vacas *Bos indicus* (CAMARGO et al., 2005).

Picos referentes a dímeros de primers ou produtos inespecíficos da PCR não foram observados nas análises das curvas de dissociação dos genes estudados (Figura 27). Quando se utiliza o corante Syber Green é essencial a ausência desses picos para validar a quantificação de transcritos por PCR em tempo real, já que esse corante se liga a qualquer dupla fita de DNA, podendo levar a uma alteração nos valores de quantificação e, conseqüentemente, a um erro de interpretação.

GAPDH

B-ACTINA

HSP70.1

PRDX1

GLUT 1

GLUT5

IGF1R

IGF2R

Figura 27 - Curvas de dissociação do gene GAPDH, β -ACTINA, HSP70.1, PRDX1, GLUT1, GLUT5, IGF1R e IGF2R obtidas após amplificação por PCR em tempo real de óocitos de vacas *Bos indicus* (Gir) e *Bos taurus* (HPB) que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental

Na avaliação dos genes, verificou-se menor abundância de transcritos para os genes IGF2R ($P=0,01$) e HSP70.1 ($P=0,005$) para os oócitos de vacas alimentadas com alta energia na dieta. Para os demais genes (PRDX1, GLUT1 e IGF1R), a quantificação dos transcritos foi semelhante entre vacas que receberam dietas de alta energia ou manutenção (Figura 28).

Figura 28 - Abundância relativa de transcritos (médias $\pm$ EPM) relacionados ao estresse (PRDX1, HSP70.1) e metabolismo celular (GLUT1, IGF1R e IGF2R) obtidas após amplificação por PCR em tempo real de oócitos de vacas que receberam dietas com alta energia ($n=180$; 170% da manutenção) ou energia de manutenção ($n=180$; 100% da manutenção). Foi utilizado como calibrador o Grupo dieta de manutenção

Na avaliação do grupo genético, observou-se que vacas da raça Gir apresentaram maior abundância de transcritos para os genes GLUT1 ($P=0,001$) e IGF1R ($P=0,006$). Para os demais genes (HSP70.1, PRDX1 e IGF2R), a quantificação dos transcritos foi semelhante entre os grupos genéticos (Figura 29).

Figura 29 - Abundância relativa de transcritos (médias $\pm$ EPM) relacionados ao estresse (PRDX1, HSP70.1) e metabolismo celular (GLUT1, IGF1R e IGF2R) obtidas após amplificação por PCR em tempo real de oócitos de vacas *Bos indicus* (Gir; n=180) e *Bos taurus* (HPB; n=180) submetidas à diferentes níveis de energia na dieta. Foi utilizado como calibrador o Grupo de vacas *Bos taurus*

Na avaliação dos efeitos da dieta dentro de cada raça, verificou-se que em *Bos indicus* os oócitos do Grupo alta energia apresentaram menor ($P=0,01$) abundância de transcritos para todos os genes estudados (HSP70.1, GLUT1, IGF1R e IGF2R), exceto para o gene PRDX1 (Figura 30). Em *Bos taurus*, apesar de identificados transcritos para GLUT5, não se verificou diferença entre os grupos de alta energia e manutenção. Resultados semelhantes foram observados nos demais genes avaliados (Figura 31). Diferente do presente experimento, Camargo et al. (2007) verificaram que oócitos de vacas da raça Holandesa apresentaram maior quantidade de transcritos para HSP70.1 do que vacas da raça Gir. Essa diferença em relação à sensibilidade ao estresse térmico entre os grupos genéticos pode estar associada à adaptação genética celular, que permite aos oócitos e embriões *Bos indicus* sobreviverem em ambientes com temperaturas mais elevadas (PAULA-LOPES et al., 2003). Porém, em outro estudo, a exposição de oócitos imaturos ao estresse térmico não aumentou a quantidade de mRNA para o gene HSP70.1 (WRENZYCKI et al. 2001). Apesar disso, alguns autores demonstraram que oócitos

submetidos ao estresse térmico durante a PIV apresentam menor competência para o desenvolvimento *in vitro* (KAWARSKY; KING, 2001; PAULA-LOPES; HANSEN, 2002).

Figura 30 - Abundância relativa de transcritos (médias $\pm$ EPM) relacionados ao estresse (PRDX1, HSP70.1) e metabolismo celular (GLUT1, IGF1R e IGF2R) obtida após amplificação por PCR em tempo real de oócitos de vacas *Bos indicus* que receberam dietas com alta energia (n=90; 170% da manutenção) ou energia de manutenção (n=90; 100% da manutenção). Foi utilizado como calibrador o grupo de vacas Gir que receberam dieta de manutenção

De forma interessante, as doadoras da raça Gir apresentaram maior abundância de genes ligados ao metabolismo celular (GLUT1 e IGF1R). Zhou, Bievre e Bondy (2000) demonstraram que a expressão de GLUT1 no oócito pode ser essencial para o processo de maturação oocitária e a expressão desses genes é mediada pela ação da IGF1. Esses achados podem explicar, em parte, a diferença na qualidade dos oócitos e produção *in vitro* de embriões entre vacas *Bos indicus* e *Bos taurus*, visto que a presença dessas proteínas (GLUTs) na célula é importante para captação da glicose, e conseqüentemente, de todo metabolismo energético celular. Além disso, as vacas *Bos indicus* do presente estudo apresentaram maior concentração de IGF1 no líquido folicular do que as vacas *Bos taurus*. Os resultados

da IGF1 estão apresentados na seção 6.7. Provavelmente, a maior concentração de IGF1 observada no líquido folicular em *Bos indicus*, induziu à maior abundância de transcritos para GLUT1. Da mesma forma, a maior quantidade de transcritos para IGF1R permitiu maior utilização da IGF1 livre existente no líquido folicular e seus efeitos positivos na qualidade do oócito. Assim, a presença de mRNA para IGF1R em oócitos demonstram que a IGF1 pode regular de forma direta a maturação oocitária pela ligação a seu receptor.

Figura 31 - Abundância relativa de transcritos (médias $\pm$ EPM) relacionados ao estresse (PRDX1, HSP70.1) e metabolismo celular (GLUT1, GLUT5, IGF1R e IGF2R) obtida após amplificação por PCR em tempo real de oócitos de vacas *Bos taurus* (HPB) que receberam dietas com alta energia (n=90; 170% da manutenção) ou energia de manutenção (n=90; 100% da manutenção). Foi utilizado como calibrador o grupo de vacas HPB que receberam dieta de manutenção

A menor expressão de genes para IGF2R em vacas alimentadas com alta energia pode estar relacionada ao *downregulation* promovido pelo excesso de IGF1 observado nesses animais. Essa afirmação tem como suporte o estudo no qual novilhas alimentadas com alta energia na dieta apresentaram aumento nas

concentrações de IGF-1 circulantes e redução da expressão de genes ligados ao sistema IGF (ARMSTRONG et al., 2001).

Na avaliação da dieta dentro de grupo genético, um interessante resultado foi verificado. O excesso de energia na dieta reduziu a expressão de genes ligados ao metabolismo em vacas *Bos indicus* e não interferiu em *Bos taurus*. Os resultados observados entre os grupos genéticos provavelmente ocorreram pela diferença de ECC e metabolismo entre as duas raças. As vacas do Grupo Gir tinham ECC mais elevado que as HPB no momento da OPU. Adamiak et al. (2005) demonstraram que novilhas com ECC moderado recebendo dieta de alta energia apresentam maior concentração de insulina do que novilhas com ECC baixo recebendo alta energia na dieta. Além disso, o excesso de energia na dieta aumentou a concentração de IGF1 livre (ARMSTRONG et al., 2001). Provavelmente, em vacas com ECC elevado, o excesso de insulina e IGF1 promoveram um *downregulation* na formação de receptores ligados ao sistema IGF e proteínas transportadoras de glicose (GLUTs). Em *Bos taurus*, devido ao menor ECC e a diferenças metabólicas, não foi verificado efeito do excesso de energia na abundância de transcritos para os genes ligados ao metabolismo celular. Provavelmente, não houve *downregulation* nas vacas com ECC baixo no Grupo HPB.

6.6 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA DO SORO E DO FLUIDO FOLICULAR

Os teores séricos e do fluido folicular de glicose, colesterol, nitrogênio ureico, AGNE e BHB estão apresentados nas tabelas 9 (efeito da dieta) e 10 (efeito do grupo genético). Para a concentração de glicose no soro, não houve interação entre dieta e raça ($P=0,43$) e raça e tempo ($P=0,28$). Porém, verificou-se interação entre dieta e tempo ($P=0,02$), na qual, a glicose aumentou durante o período experimental nas vacas que receberam alta energia na dieta e manteve-se estável no grupo que recebeu dieta de manutenção ($P=0,01$; Figura 32). Além disso, observou-se efeito principal de dieta ($P=0,003$; Tabela 9) e raça ($P=0,001$; Tabela 10). Doadoras que receberam alta energia ou da raça Gir apresentaram maiores concentrações de glicose no soro do que as vacas alimentadas com manutenção ou da raça Holandesa.

Tabela 9 - Efeito de nível de energia na dieta sobre parâmetros bioquímicos séricos e no fluido folicular de doadoras *Bos indicus* (Gir; n=14) e *Bos taurus* (HPB; n=14) que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental - Valença, RJ - 2009.

	Sérico			Fluido Folicular		
	Alta Energia	Mantença	P	Alta Energia	Mantença	P
Glicose (mg/dL)	73,1 ± 0,6	70,5 ± 0,8	0,003	80,9 ± 1,1	78,5 ± 1,2	0,08
Colesterol (mg/dL)	84,2 ± 3,8	54,8 ± 1,6	0,001	32,2 ± 1,5	23,3 ± 1,3	0,001
AGNE (μmol/L)	117,4 ± 7,2	120,5 ± 6,3	0,49	334,3 ± 16,1	360,7 ± 6,3	0,65
BHB (mg/dL)	9,6 ± 0,3	8,9 ± 0,2	0,01	12,4 ± 0,3	11,4 ± 0,3	0,01
Nitrogênio ureico (mg/dL)	15,2 ± 0,7	20,7 ± 0,7	0,001	16,9 ± 0,8	22,9 ± 0,8	0,001

Na avaliação das concentrações de glicose no fluido folicular, verificou-se resultados similares ao observado na concentração de glicose no soro. Houve interação entre a dieta e tempo ($P=0,06$), no qual os níveis de glicose no líquido folicular foi maior em vacas que receberam alta energia na dieta durante o período experimental (Figura 32). Além disso, as vacas da raça Gir apresentaram maiores concentrações de glicose no fluido folicular do que vacas da raça Holandesa ($P=0,001$; Tabela 10, Figura 33). Ainda, verificou-se correlação positiva ($P=0,001$) entre as concentrações de glicose no soro e no líquido folicular ($r=0,52$; Figura 51).

Figura 32 - Concentração sérica de glicose e no fluido folicular em vacas que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB

Figura 33 - Concentração sérica de glicose e no fluido folicular de vacas *Bos indicus* e *Bos taurus* durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB

Tabela 10 - Efeito de grupo genético (*Bos indicus* e *Bos taurus*) sobre parâmetros bioquímicos séricos e no fluido folicular de vacas secas doadoras de oócitos - Valença, RJ - 2009

	Sérico		<i>P</i>	Fluido Folicular		<i>P</i>
	<i>Bos indicus</i>	<i>Bos taurus</i>		<i>Bos indicus</i>	<i>Bos taurus</i>	
Glicose (mg/dL)	73,7 ± 0,7	69,9 ± 0,6	0,001	82,5 ± 1,2	76,9 ± 0,9	0,001
Colesterol (mg/dL)	85,5 ± 3,6	53,5 ± 1,9	0,001	32,3 ± 1,7	23,2 ± 0,9	0,001
AGNE (μmol/L)	144,4 ± 6,9	93,6 ± 5,3	0,001	405,9 ± 18,1	297,5 ± 13,4	0,001
β-HBO (mg/dL)	9,3 ± 0,3	9,1 ± 0,3	0,55	12,3 ± 0,3	11,6 ± 0,3	0,10
Nitrogênio ureico (mg/dL)	20,9 ± 0,7	15,1 ± 0,6	0,001	22,9 ± 0,9	16,8 ± 0,7	0,001

Ao analisar os teores de colesterol no soro, verificou-se interação entre dieta e raça ($P=0,001$), dieta e tempo ($P=0,001$), raça e tempo ($P=0,007$), bem como, efeitos principais de dieta ($P=0,001$; Tabela 9) e raça ($P=0,001$; Tabela 10). A concentração de colesterol aumentou somente nas doadoras que receberam alta energia na dieta (Figura 34). Além disso, os teores de colesterol durante todo o experimento foi maior nas doadoras da raça Gir (Figura 35). Ainda, o efeito da dieta no aumento da concentração de colesterol foi dependente da raça, sendo mais evidente nas doadoras *Bos indicus* (Figura 36). Essa relação de dependência caracteriza o efeito de interação entre dieta e raça.

Figura 34 - Concentração sérica de colesterol de vacas que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB

Figura 35 - Concentração sérica de colesterol de vacas *Bos indicus* e *Bos taurus* durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB

Figura 36 - Concentração sérica de colesterol de vacas *Bos indicus* (Gir; n=14) e *Bos taurus* (HPB; n=14) que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB

Na avaliação das concentrações de colesterol no fluido folicular, verificou-se resultados similares ao observado para a concentração de colesterol no soro, à exceção de não haver interação entre dieta e raça ($P=0,11$) e entre raça e tempo ($P=0,13$; Figura 37). Semelhante ao observado nas amostras séricas, houve interação entre dieta e tempo ($P=0,01$; Figura 38). Dessa forma, as doadoras que receberam alta energia na dieta apresentaram maiores níveis de colesterol no líquido folicular durante o período experimental. Além disso, as vacas da raça Gir apresentaram maior concentração de colesterol no fluido folicular do que as vacas da raça Holandesa ($P=0,001$; Tabela 10). Ainda, verificou-se correlação positiva ($P=0,001$) entre as concentrações de colesterol no soro e no líquido folicular ($r=0,67$; Figura 51).

Figura 37 - Concentração de colesterol no fluido folicular de vacas *Bos indicus* e *Bos taurus* durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB

Figura 38 - Concentração de colesterol no fluido folicular de vacas que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB

Na análise das concentrações de nitrogênio ureico sérico (NUS), verificou-se interação entre dieta e tempo ($P=0,001$), bem como efeitos principais de dieta ($P=0,001$; Tabela 9) e raça ($P=0,001$; Tabela 10). A concentração de NUS aumentou durante o período experimental somente nas doadoras que receberam dieta de manutenção (Figura 39). Além disso, os teores de NUS durante todo o experimento foram maiores nas doadoras da raça Gir (*Bos indicus*; Figura 40).

No fluido folicular, os resultados da concentração de nitrogênio ureico foram similares ao observado no sangue, no qual não houve interação entre dieta e raça ($P=0,49$) e entre raça e tempo ($P=0,81$; Figura 41). Porém, semelhante ao observado nas amostras séricas, houve interação entre dieta e tempo ($P=0,01$; Figura 42), no qual as doadoras que receberam dieta de manutenção apresentaram aumento nos níveis de nitrogênio ureico no líquido folicular durante o período experimental. Além disso, as vacas da raça Gir apresentaram maiores concentrações de nitrogênio ureico no fluido folicular do que vacas da raça Holandesa ($P=0,001$; Tabela 10). Ainda, verificou-se alta correlação positiva ($P=0,001$) entre as concentrações de NUS e no líquido folicular ($r=0,91$; Figura 51).

Figura 39 - Concentração sérica de nitrogênio ureico de vacas que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB

Figura 40 - Concentração sérica de nitrogênio ureico de vacas *Bos indicus* e *Bos taurus* durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB

Figura 41 - Concentração de nitrogênio ureico no fluido folicular de vacas *Bos indicus* e *Bos taurus* durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB

Figura 42 - Concentração de nitrogênio ureico no fluido folicular de vacas que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB

Na análise da concentração sérica de AGNE não se verificou interação entre dieta e tempo ($P=0,12$; Figura 43), dieta e raça ($P=0,12$) e raça e tempo ($P=0,21$). Não houve diferença estatística entre as dietas experimentais ($P=0,49$; Tabela 9). Porém, houve efeito de raça ($P=0,001$; Tabela 10), sendo maior os teores de AGNE nas doadoras da raça Gir (*Bos indicus*; Figura 44) durante todo o experimento.

A avaliação da concentração de AGNE no fluido folicular apresentou resultado similar ao observado no sangue, no qual não houve interação entre dieta e raça ($P=0,42$), dieta e tempo ($P=0,54$; Figura 45) e raça e tempo ($P=0,08$; Figura 46). Além disso, não houve efeito de dieta nas concentrações de AGNE ($P=0,65$). Porém, as vacas da raça Gir apresentaram maiores concentrações de AGNE no fluido folicular do que vacas da raça Holandesa ($P=0,001$; Tabela 10). Ainda, não houve correlação ($P=0,10$) entre as concentrações séricas e no líquido folicular de AGNE ($r=0,14$; Figura 51).

Figura 43 - Concentração sérica de AGNE de vacas que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB

Figura 44 - Concentração sérica de AGNE de vacas *Bos indicus* e *Bos taurus* durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB

Figura 45 - Concentração de AGNE no fluido folicular de vacas que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB

Figura 46 - Concentração de AGNE no líquido folicular de vacas *Bos indicus* e *Bos taurus* durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB

Ao analisar as concentrações de betahidroxibutirato (BHB) no soro, verificou-se que não houve interações entre dieta e raça ($P=0,09$) e raça e tempo ($P=0,17$; Figura 47), bem como não houve diferença estatística entre as raças ($P=0,55$; Tabela 10). Porém, houve interação entre dieta e tempo ($P=0,01$), no qual, a concentração de BHB foi maior nas vacas que receberam dieta de alta energia após o 56º dia do período experimental (Figura 48).

No fluido folicular, não houve interação entre dieta e raça ($P=0,11$), dieta e tempo ($P=0,21$; Figura 49) e raça e tempo ($P=0,15$; Figura 50) para concentração de BHB. Além disso, não houve efeito de raça nas concentrações de BHB ($P=0,10$). Porém, vacas alimentadas com excesso de energia apresentaram maiores concentrações de BHB no fluido folicular ($P=0,01$; Tabela 9). Ainda, verificou-se baixa correlação ($P=0,001$) entre as concentrações BHB no soro e no líquido folicular ($r=0,28$; Figura 51).

Figura 47 - Concentração sérica de BHB de vacas *Bos indicus* e *Bos taurus* durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB

Figura 48 - Concentração sérica de BHB de vacas que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB

Figura 49 - Concentração de BHB no fluido folicular de vacas que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB

Figura 50 - Concentração de BHB no líquido folicular de vacas *Bos indicus* e *Bos taurus* durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB

No presente estudo, observou-se que vacas alimentadas com excesso de energia na dieta apresentaram maiores concentrações séricas e no fluido folicular de glicose, colesterol e BHB. Porém, a concentração de nitrogênio ureico foi maior nas vacas que receberam dietas de manutenção. Na avaliação do grupo genético, observou-se que vacas *Bos indicus* apresentavam maiores concentrações de glicose, colesterol, AGNE e nitrogênio ureico tanto no soro quanto no líquido folicular. Além disso, houve correlação entre as concentrações de glicose, colesterol e nitrogênio ureico presentes no soro e líquido folicular. Semelhante ao presente estudo, Leroy et al. (2004a) observaram que a composição bioquímica do fluido folicular (glicose, colesterol e NUS) está diretamente correlacionada à composição sérica. Porém, os referidos autores verificaram que as concentrações séricas de AGNE e BHB também apresentam correlação com as do líquido folicular. Essa correlação é importante, pois alterações nos níveis séricos de metabólitos

bioquímicos e hormonais refletem diretamente na constituição do líquido folicular. O líquido folicular pode interferir tanto na função das células da granulosa (esteroidogênese), quanto no desenvolvimento final do oócito (LEROY et al., 2004b). É importante ressaltar que as concentrações de AGNE e nitrogênio ureico observadas no presente estudo estão dentro dos limites aceitáveis para que não ocorra redução na fertilidade (ARMSTRONG et al., 2001; LEROY et al., 2005).

Diante dos resultados relativos à qualidade oocitária e à dosagem bioquímica, a glicose e colesterol podem atuar positivamente sobre a qualidade dos oócitos das vacas *Bos indicus*. O colesterol por ser o precursor dos hormônios esteróides e a glicose por ser a principal fonte de energia e agir no sistema nervoso central, modulando a síntese e liberação de GnRH pelo hipotálamo e, conseqüentemente, de LH e FSH (DISKIN et al., 2003). Além disso, a glicose induz à liberação de insulina e, conseqüentemente, de IGF-1, os quais 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.

Figura 51 - Correlação entre as concentrações metabólicas no soro e no fluido folicular de vacas *Bos indicus* (Gir) e *Bos taurus* (HPB) submetidas à dietas com diferentes níveis de energia

Apesar das doadoras *Bos indicus* apresentarem maior concentração de AGNE no líquido folicular do que *Bos taurus*, os níveis encontrados são inferiores aqueles relatados em vacas em balanço energético negativo em que se observa comprometimento na qualidade dos oócitos (LEROY et al., 2005, 2008b). Assim, a maior concentração de glicose e colesterol em *Bos indicus* pode ter contribuído para a melhor qualidade oocitária observada nas vacas desse grupo genético.

6.7 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE IGF1 NO SORO E NO FLUIDO FOLICULAR

Na avaliação da concentração de IGF1 no soro e no líquido folicular, não se verificou interação ($P > 0,05$) entre dieta e raça, bem como de dieta e tempo. Além disso, não houve diferença entre as dietas ($P = 0,81$) para a concentração de IGF1 no soro (Alta energia - $150,9 \pm 6,9$ ng/ml e - $150,1 \pm 7,7$ ng/ml). No entanto, a concentração de IGF1 no líquido folicular foi maior ($P = 0,01$) em vacas alimentadas com dieta de manutenção ($302,5 \pm 30,1$ ng/ml vs $254,7 \pm 31,9$ ng/ml). Além disso, as vacas *Bos indicus* apresentaram maior concentração de IGF1 no líquido folicular ($336,8 \pm 35,8$ ng/ml vs $217,3 \pm 23,2$ ng/ml; $P = 0,001$) e menor no soro ($142,5 \pm 7,1$ ng/ml vs $158,4 \pm 7,6$ ng/ml; $P = 0,02$) do que as vacas *Bos taurus*. O aumento da concentração de IGF1 no fluido folicular pode ser responsável, em parte, pela melhor qualidade do oócito e pelo desenvolvimento embrionário inicial (GONG et al., 1994; ZHOU; BIEVRE; BONDY, 2000; ARMSTRONG; GONG; WEBB, 2003). O sistema IGF pode atuar diretamente no desenvolvimento inicial do oócito ou na via de produção do estradiol, visto que sua síntese nos folículos antrais é mediada por tais fatores de crescimento (FORTUNE; RIVERA; YANG, 2004). O IGF aumenta a sensibilidade das células da granulosa ao estímulo do FSH (ARMSTRONG et al., 1998). Sabe-se que o FSH ao se ligar aos receptores na célula da granulosa desencadeia uma série de eventos que transformam o colesterol em estrógeno. O aumento da sensibilidade ao FSH permite que o folículo sintetize concentrações adequadas de estradiol mesmo em ambiente de baixa concentração sistêmica de FSH, mantendo a viabilidade dos oócitos (ARMSTRONG et al., 1998). Além disso, o desenvolvimento oocitário adequado é dependente da quantidade de estradiol produzida pelo folículo (COMIN et al., 2002). Essa diferença na concentração de

IGF-1 pode explicar a ineficácia da administração de FSH antes da OPU em *Bos indicus* (MONTEIRO et al., 2009) e o efeito positivo em vacas *Bos taurus* (BLONDIN et al., 2002). Além disso, observa-se que alguns componentes do sistema IGF estão expressos no oócito (NUTTINCK et al., 2004) e tornam a maturação nuclear *in vitro* mais rápida (SAKAGUCHI et al., 2002). Assim, a maior concentração de IGF-1 observada em *Bos indicus* pode explicar a melhor qualidade dos oócitos encontrada nesse grupo genético. Inesperadamente, a concentração sérica de IGF1 foi maior em *Bos taurus* e em vacas que receberam dieta de manutenção, contrastando com os resultados presente na literatura para os grupos genéticos (SIMPSON et al., 1994, ALVAREZ et al., 2000) e para as dietas (ARMSTRONG et al., 2001). No entanto, os dados deve ser analisados com cautela, pois a técnica de quimioluminescência para a dosagem hormonal ainda é pouco utilizada em bovinos e visa substituir o radioimunoensaio. Assim, outros estudos, relacionados a presente metodologia de dosagem de IGF1, são necessários para confirmar esses achados.

6.8 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INSULINA NO SORO E NO FLUIDO FOLICULAR E TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE

Na avaliação da concentração de insulina no soro não se verificou interação entre dieta e raça ($P=0,13$) e raça e tempo ($P=0,28$; Figura 52). Porém, houve interação entre dieta e tempo ($P=0,001$). Durante o período experimental, a concentração de insulina aumentou nas vacas que receberam alta energia na dieta e não se alterou no grupo que recebeu dieta de manutenção (Figura 53). Além disso, observou-se efeito principal de dieta ($P=0,001$) e raça ($P=0,001$), no qual doadoras que receberam alta energia ($24,9 \pm 2,7 \mu\text{UI/ml}$) ou da raça Gir ($30,0 \pm 2,5 \mu\text{UI/ml}$) apresentaram maiores concentrações de insulina no soro do que as alimentadas com dieta de manutenção ($17,8 \pm 1,4 \mu\text{UI/ml}$) ou da raça Holandesa ($10,7 \pm 1,1 \mu\text{UI/ml}$).

Na avaliação das concentrações de insulina no fluido folicular não houve interação entre dieta e tempo ($P=0,85$; Figura 54) e entre raça e tempo ($P=0,77$; Figura 55). Porém, houve interação entre dieta e raça ($P=0,03$), no qual vacas da raça Gir alimentadas com alta energia ($4,64 \pm 0,99 \mu\text{UI/ml}$) apresentaram maior concentração de insulina no fluido folicular do que vacas Gir alimentadas com dieta

de manutenção ($1,57 \pm 0,28 \mu\text{UI/ml}$). Em *Bos taurus*, não se verificou diferença entre as vacas alimentadas com dieta de manutenção ($0,71 \pm 0,05 \mu\text{UI/ml}$) ou alta energia ($0,86 \pm 0,20 \mu\text{UI/ml}$). Além disso, não houve efeito de dieta na concentração de insulina no líquido folicular ($P=0,23$). No entanto, as vacas da raça Gir ($3,09 \pm 0,53 \mu\text{UI/ml}$) apresentaram maior ($P=0,001$) concentração de insulina no fluido folicular do que as vacas da raça Holandesa ($0,79 \pm 0,11 \mu\text{UI/ml}$). Ainda, verificou-se correlação positiva ($P=0,001$) entre as concentrações de insulina no soro e no líquido folicular ($r=0,47$; Figura 56).

Figura 52 - Concentração sérica de insulina de vacas *Bos indicus* e *Bos taurus* durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB

Figura 53 - Concentração sérica de insulina de vacas que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB

Figura 54 - Concentração de insulina no fluido folicular de vacas que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB

Figura 55 - Concentração de insulina no líquido folicular de vacas *Bos indicus* e *Bos taurus* durante o período experimental. Dieta = alta energia ou energia de manutenção; Raça = Gir ou HPB

Figura 56 - Correlação entre as concentrações de insulina no soro e no fluido folicular de vacas *Bos indicus* (Gir) e *Bos taurus* (HPB) submetidas à dietas com diferentes níveis de energia

Os resultados do teste de tolerância à glicose (TTG) estão apresentados na tabela 11. Não houve interação ($P>0,05$) entre dieta e raça para variáveis avaliadas no TTG. Porém, a concentração basal de glicose foi maior ($P=0,001$) em vacas que receberam alta energia na dieta (1,7M) do que as vacas submetidas à dieta de manutenção. Além disso, verificou-se que as vacas *Bos indicus* apresentaram menor ($P=0,04$) concentração basal de glicose que as *Bos taurus*. O pico de concentração de glicose após sua infusão foi semelhante ($P=0,29$) entre as dietas e maior ($P=0,002$) em vacas da raça Gir (*Bos indicus*). A taxa de metabolismo (k) da glicose foi maior ($P=0,06$) e sua meia vida ($T^{1/2}$), menor ($P=0,06$) no Grupo de alta energia na dieta. As vacas *Bos taurus* apresentaram maior k ($P=0,002$) e menor $T^{1/2}$ ($P=0,002$) da glicose que vacas *Bos indicus*. A curva de concentração de glicose do TTG nos diferentes grupos experimentais está apresentada na figura 57.

Figura 57 - Concentração de glicose no plasma após a infusão intravenosa de glicose (0,3 g/Kg de peso corporal) de vacas *Bos indicus* (Gir; n=14) e *Bos taurus* (HPB; n=14) que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental

Antes da infusão de glicose, a concentração basal de insulina foi maior em vacas alimentadas com alta energia ($P=0,001$) quando comparada à dieta de manutenção e maior em vacas *Bos indicus* ($P=0,001$) do que em *Bos taurus*. As

concentrações basais de insulina nos diferentes grupos experimentais foram de $16,8 \pm 2,6$ $\mu\text{UI/ml}$ (manutenção) e $47,9 \pm 5,4$ $\mu\text{UI/ml}$ (alta energia) para as vacas da raça Gir e $8,8 \pm 1,5$ $\mu\text{UI/ml}$ (manutenção) e $23,2 \pm 4,9$ $\mu\text{UI/ml}$ (alta energia) para as vacas da raça HPB. Além disso, o pico de insulina e o aumento da insulina (Δ Max) após a infusão de glicose foi maior em vacas alimentadas com alta energia na dieta. No entanto, as referidas variáveis foram semelhantes ($P > 0,05$) entre os grupos genéticos. A curva de concentração de insulina do TTG nos diferentes grupos experimentais está apresentada na figura 58.

Tabela 11 - Concentração de glicose e insulina no plasma após a infusão intravenosa de glicose (0,3 g/Kg de peso corporal) em vacas *Bos indicus* (Gir; n=14) e *Bos taurus* (HPB; n=14) submetidas a diferentes níveis de energia na dieta. Alta energia - 170% da manutenção e Manutenção - 100% da manutenção - Valença, RJ - 2009

	Dieta		P	Grupo genético (Raça)		P	
	Mantença	Alta Energia	Dieta	<i>Bos indicus</i>	<i>Bos taurus</i>	Raça	Dieta*Raça
Glicose basal (mg/dL)	$65,9 \pm 0,9$	$72,2 \pm 1,0$	0,001	$67,7 \pm 1,1$	$70,4 \pm 0,9$	0,04	0,64
Pico de glicose (mg/dL)	$238,6 \pm 8,4$	$251,8 \pm 7,7$	0,29	$262,7 \pm 6,9$	$227,8 \pm 6,5$	0,002	0,85
K (%/min)	$1,5 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,2$	0,06	$1,2 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,2$	0,002	0,52
$T^{1/2}$ (min)	$56,9 \pm 6,2$	$43,3 \pm 5,0$	0,06	$59,7 \pm 4,1$	$40,6 \pm 6,4$	0,002	0,53
Insulina basal ($\mu\text{UI/ml}$)	$12,8 \pm 1,6$	$35,6 \pm 4,1$	0,001	$32,3 \pm 3,8$	$15,9 \pm 2,8$	0,001	0,09
Pico de insulina ($\mu\text{UI/ml}$)	$128,6 \pm 20,4$	$209,7 \pm 21,3$	0,005	$150,2 \pm 20,5$	$188,2 \pm 25,5$	0,29	0,89
Δ Max ($\mu\text{UI/ml}$)	$116,6 \pm 18,4$	$174,1 \pm 16,3$	0,03	$155,8 \pm 20,6$	$134,9 \pm 17,0$	0,41	0,66

A alta energia na dieta aumentou a concentração circulante de insulina, corroborando com vários outros estudos (GONG et al., 2002a, b; ADAMIYAK et al., 2005; GARNSWORTHY et al., 2009; ROOKE et al., 2009). O delineamento experimental em fatorial (energia na dieta e grupo genético) permitiu criar grupos de animais com concentração de insulina baixa (~ 9 $\mu\text{UI/ml}$ - HPB manutenção), média (~ 19 $\mu\text{UI/ml}$ - HPB alta energia e Gir manutenção) e alta (~ 50 $\mu\text{UI/ml}$ - Gir alta energia). Essa grande variação na concentração de insulina é observada em animais

manejados em diferentes condições. Os valores baixo e médio de insulina verificados no presente estudo são encontrados com frequência em vacas em lactação (2 a 7 $\mu\text{UI/ml}$; SINCLAIR et al., 2002; GONG et al., 2002a) ou em vacas não lactantes (17 $\mu\text{UI/ml}$; VIEIRA et al., 2010), respectivamente. Valores de insulina altos (48 a 55 $\mu\text{UI/ml}$) foram observados em ovelhas obesas (MCCANN et al., 1986) ou em novilhas com ECC alto, alimentadas com dietas acima dos requerimentos de manutenção (ADAMIAK et al., 2005). Em ambos os estudos, o excesso de insulina foi associado ao aumento da resistência periférica à insulina. No TTG, verificamos que as vacas do Grupo alta energia apresentaram maior (~ dobro) pico de concentração de insulina após infusão de glicose do que o Grupo de vacas que receberam dieta de manutenção. Apesar disso, a taxa de metabolismo da glicose e sua meia vida foram semelhantes entre as diferentes dietas, caracterizando um quadro de resistência periférica à insulina. O pico de concentração de insulina após a infusão de glicose do Grupo alta energia ($209,7 \pm 21,3 \mu\text{UI/ml}$) foi semelhante ao observado na literatura em ovelhas obesas (210 $\mu\text{UI/ml}$; MCCANN et al., 1986), em vacas de leite lactantes (200 $\mu\text{UI/ml}$; OPSOMER et al., 1999) e em novilhas cíclicas (200 $\mu\text{UI/ml}$; MCCANN; REIMERS, 1986).

Figura 58 - Concentração de insulina no plasma após a infusão intravenosa de glicose (0,3 g/Kg de peso corporal) em vacas *Bos indicus* (Gir; n=14) e *Bos taurus* (HPB; n=14) que receberam dietas com alta energia (170% da manutenção) ou energia de manutenção (100% da manutenção) durante o período experimental

Apesar da maior concentração basal de insulina nas vacas *Bos indicus*, não se verificou diferença entre os grupos genéticos no pico de concentração de insulina após a infusão de glicose. Entretanto, a taxa de metabolismo da glicose foi maior e sua meia vida menor em vaca *Bos taurus*. Além disso, o pico de glicose foi maior nas vacas *Bos indicus*. Ainda, as concentrações de glicose e insulina permaneceram elevadas nas vacas da raça Gir após 120 min da infusão de glicose. Esses resultados associados aos parâmetros bioquímicos evidenciam a diferença de metabolismo entre os dois grupos genéticos.

Semelhante aos resultados encontrados no presente estudo, alguns autores relacionaram a alta concentração de insulina circulante à redução da competência oocitária (ARMSTRONG et al., 2001; ADAMIAK et al., 2005, 2006). Nos referidos estudos, vacas alimentadas com alto plano nutricional apresentaram concentrações elevadas de insulina e baixo rendimento na PIV. No presente estudo, as vacas *Bos indicus* que receberam alta energia na dieta apresentaram maior concentração de insulina circulante ($36,1 \pm 4,4$ $\mu\text{UI/ml}$) do que os demais grupos experimentais (Gir manutenção - $23,9 \pm 2,0$ $\mu\text{UI/ml}$; HPB alta energia - $13,8 \pm 1,8$ $\mu\text{UI/ml}$; HPB manutenção - $7,6 \pm 0,9$ $\mu\text{UI/ml}$), o que pode estar associado ao comprometimento na PIV nesse grupo de animais. No estudo de Armstrong et al. (2001), a redução da PIV foi atribuída ao excesso de IGF-1 biodisponível, em consequência da redução na expressão de mRNA para IGFBPs, induzida pela ação da insulina circulante.

Adamiak et al. (2005) verificaram alta concentração de insulina em vacas com ECC moderado (3,7; escala de 1 a 5) e alimentadas com energia acima da manutenção. Porém, nesse grupo experimental, somente houve comprometimento da PIV nos animais que apresentaram quadro de hiperinsulinemia (insulina >58 $\mu\text{UI/ml}$). Esses autores classificaram como animais hiperinsulinêmicos, àqueles que apresentaram concentração de insulina maior que 3 vezes o desvio padrão da concentração média de insulina dos grupos intermediários (grupo alta energia com ECC baixo e grupo manutenção com ECC alto). Assim, dos 12 animais do Grupo alto plano nutricional com ECC elevado, oito vacas foram consideradas hiperinsulinêmicas e apresentaram menor número de folículos visualizados e menor taxa de blastocisto.

Diante dos resultados relativos à qualidade oocitária dos animais que receberam alta energia na dieta (1,7M), adotou-se a mesma metodologia proposta

por Adamiak et al. (2005) para identificar os animais hiperinsulinêmicos. Porém, em função da diferença na concentração de insulina entre os grupos genéticos, o cálculo do valor mínimo da concentração de insulina nos animais com quadro de hiperinsulinemia teve como base a concentração de insulina das vacas que receberam dieta de manutenção nas diferentes raças. Assim, dois valores mínimos da concentração de insulina foram calculados. Em *Bos indicus*, as vacas foram consideradas hiperinsulinêmicas quando a concentração de insulina média foi $>51,9 \mu\text{UI/ml}$ e em *Bos taurus* $>17,2 \mu\text{UI/ml}$. Dessa forma, dos 14 animais que receberam alta energia na dieta, 7 apresentaram quadro de hiperinsulinemia, sendo 3 vacas *Bos taurus* e 4 vacas *Bos indicus*. A concentração de insulina em vacas *Bos indicus* hiperinsulinêmicas foi semelhante ao observado para as vacas do estudo de Adamiak et al. (2005) e em mulheres com ovário policístico (40 a $52 \mu\text{UI/ml}$; DUNAIF, 1997). Em *Bos taurus*, a concentração de insulina nos animais hiperinsulinêmicos foi semelhante ao observado em vacas e ovelhas obesas ($24\text{--}33 \mu\text{IU/ml}$; MCCANN; REIMERS, 1986; MCCANN et al., 1986). Após a identificação dos animais com excesso de insulina, não se verificou diferença ($P>0,05$) na quantidade e qualidade de oócitos de vacas normais e hiperinsulinêmicas (Tabela 12). É importante ressaltar que a avaliação da qualidade dos oócitos foi realizada de forma visual em estereomicroscópio, o que pode ter comprometido a identificação de diferenças entre os grupos experimentais.

Tabela 12 - Diferença entre vacas *Bos indicus* e *Bos taurus* submetidas à dieta de 170% da manutenção com concentração plasmática de insulina normal ou >3x o desvio padrão da concentração média de vacas alimentadas com dieta de manutenção - Valença, RJ - 2009

	Normal Gir - <51,9 µUI/ml HPB - <17,2 µUI/ml	Hiperinsulinêmica Gir - >51,9 µUI/ml HPB - >17,2 µUI/ml	P
Número de animais	7 (Gir - 3 / HPB - 4)	7 (Gir - 4 / HPB - 3)	
Folículos visualizados	25,3 ± 1,4	23,6 ± 1,4	0,58
Número de observações	63	63	
Oócitos recuperados	19,5 ± 2,3	17,7 ± 1,4	0,77
Taxa de recuperação - % (n/n)	64,4 (1027/1594)	70,1 (1042/1487)	0,36
Oócitos viáveis	14,9±1,8	14,2±1,2	0,85
Oócitos (qualidade)			
- Grau A	3,08 ± 0,53	3,29 ± 0,46	0,90
- Grau B	7,10 ± 0,86	6,90 ± 0,60	0,91
- Grau C	4,73 ± 0,61	4,03 ± 0,61	0,64
- Degenerado	0,93 ± 0,28	0,87 ± 0,25	0,87
IQO*	2,54 ± 0,05	2,38 ± 0,06	0,21

*IQO - Índice qualidade oocitária = (Grau A*1+ Grau B*2+ Grau C*3+ Degenerado*4)/total de oócitos recuperados.

7 DISCUSSÃO GERAL

Diante dos resultados obtidos, a quantidade de energia fornecida na dieta foi suficiente para promover aumento considerável de peso, ECC e gordura subcutânea na região do *Bíceps femuris* e intercostal tanto em *Bos indicus* quanto em *Bos taurus*. Apesar do aumento das variáveis relacionadas ao ganho energético (Peso, ECC e gordura subcutânea), não houve efeito do excesso de energia na quantidade e na qualidade de oócitos avaliados visualmente. É importante ressaltar que essa avaliação tem caráter subjetivo, apesar de haver uma correlação entre os graus de qualidade do oócito e o rendimento da produção *in vitro* de embriões. No entanto, verificamos que o excesso de energia reduziu as taxas de produção *in vitro* de embriões em vacas *Bos indicus* após 60 dias de fornecimento da dieta, corroborando com dados da literatura (NOLAN et al., 1998; ARMSTRONG et al., 2001; ROOKE et al., 2009). É importante ressaltar que a energia na dieta é necessária para adequada funcionalidade do sistema reprodutivo, no entanto, quando em excesso, torna-se deletéria (LEROY et al., 2008). Semelhantemente à literatura (ADAMIAK et al., 2006), os efeitos da alta energia foram verificados somente em vacas que apresentavam ECC mais elevado (*Bos indicus*). Além disso, os efeitos negativos do excesso de energia na PIV aumentaram progressivamente com o tempo, sugerindo efeito acumulativo do plano nutricional na fertilidade (ADAMIAK et al., 2005). Dessa forma, é necessário um longo período de exposição à alta energia para que ocorra efeito negativo na qualidade do oócito, conforme observado no presente estudo. Os efeitos negativos da alta energia na qualidade do oócito podem estar relacionados ao *downregulation* de proteínas transportadoras de glicose (GLUTs) e de receptores do sistema IGF, observados em vacas *Bos indicus*. O excesso de insulina e IGF1 em vacas alimentadas com alta energia na dieta pode ser responsável pela redução da expressão de genes relacionados ao metabolismo celular (ARMSTRONG et al., 2001). Além disso, a expressão de GLUT1 no oócito parece ser essencial para o processo de maturação oocitária (ZHOU; BIEVRE; BONDY, 2000). No presente estudo, verificou-se que nas vacas que apresentaram redução na taxa de blastocisto (Grupo alta energia *Bos indicus*), as concentrações de insulina e IGF1 no líquido folicular eram elevadas. Por fim, observou-se quadro de hiperinsulinemia em 60% das vacas *Bos indicus* que receberam alta energia na dieta. Apesar de não haver

redução da qualidade de oócitos avaliados visualmente em doadoras hiperinsulinêmicas, têm-se apresentado efeito negativo na produção *in vitro* de embriões (ADAMIAK et al., 2005).

Em relação ao grupo genético, verificou-se maior ganho de peso em vacas *Bos indicus*. Provavelmente, essa diferença deve-se a menor exigência de energia para manutenção nos zebuínos (SILVA et al., 2002). Verificou-se interação entre dieta e raça para a espessura de gordura no subcutâneo. Nos animais que receberam alta energia na dieta houve maior deposição de gordura no subcutâneo em vacas *Bos indicus*. Esse resultado pode ser devido ao tipo de deposição de gordura entre os grupos genéticos (O'CONNOR et al., 1997; HASSEN; WILSON; ROUSE, 1998). Com relação as variáveis reprodutivas, dados da literatura relataram que fêmeas *Bos indicus* recrutam maior número de folículos por onda do que *Bos taurus* (CARVALHO et al., 2008; GIMENES et al., 2009; BASTOS et al., 2010). Porém, no presente estudo, não houve diferença no número de folículos visualizados entre os grupos genéticos. As avaliações ultrassonográficas prévias ao experimento, com as quais selecionou-se vacas *Bos taurus* e *Bos indicus* pelo número de folículos visualizados pode explicar essa diferença em relação à literatura. Apesar do número de folículos visualizados ser semelhante entre os grupos genéticos, verificou-se maior taxa de recuperação de oócitos em *Bos indicus*, sendo a causa dessa diferença ainda desconhecida. Além disso, as doadoras *Bos indicus* apresentaram melhor qualidade oocitária e maior PIV. Alguns resultados observados no presente estudo podem explicar a diferença na qualidade do oócito entre *Bos indicus* e *Bos taurus*: 1) maior concentração de glicose e colesterol no fluido folicular (substratos necessários para esteroidogênese e qualidade oocitária); 2) maior abundância de transcritos para genes ligados ao metabolismo celular (GLUT1 e IGFR, fonte de energia para as principais funções do oócito); 3) maior concentração de insulina e IGF1 no líquido folicular (metabolismo celular). Porém, é importante ressaltar que o excesso de glicose (MOLEY, 2001), insulina (ADAMIAK et al., 2005, 2006) e IGF1 (ARMSTRONG et al., 2001) podem reduzir a viabilidade do oócito.

8 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos conclui-se que:

A dieta com diferentes níveis de energia não interferiu na qualidade oocitária de vacas *Bos taurus*, porém, verificou-se menor produção *in vitro* de embriões em vacas *Bos indicus* após receber a dieta de alta energia por 60 dias, confirmando, em parte, a primeira hipótese do presente estudo. Além disso, as vacas *Bos indicus* apresentaram melhor qualidade oocitária e maior produção *in vitro* de embriões do que vacas *Bos taurus*. Além disso, verificou-se maior fragmentação de DNA (Tunel) nos oócitos de vacas *Bos taurus*, confirmando a segunda hipótese do presente estudo.

Em relação ao perfil bioquímico, diferentes concentrações séricas (glicose, colesterol e nitrogênio ureico) e no líquido folicular (glicose, colesterol, betahidroxibutirato e nitrogênio ureico) foram observadas entre vacas submetidas as dietas experimentais. Além disso, as vacas *Bos indicus* apresentavam maiores concentrações de glicose, colesterol, AGNE e nitrogênio ureico, tanto no soro quanto no líquido folicular, não confirmando a terceira hipótese do presente estudo.

Na análise hormonal, as vacas *Bos indicus* apresentaram maior concentração de insulina no soro e no líquido folicular do que vacas *Bos taurus*. Além disso, a dieta de alta energia aumentou os níveis insulina no soro e no fluido folicular, confirmando a quarta hipótese experimental.

A alta energia na dieta promoveu menor abundância de transcritos para os genes IGF2R e HSP70.1. Em *Bos indicus*, o excesso de energia na dieta promoveu menor expressão dos genes HSP70.1, GLUT1, IGF1R e IGF2R, rejeitando a quinta hipótese experimental.

9 IMPLICAÇÕES

Em função da redução na produção *in vitro* de embriões em vacas com alto ECC, recomenda-se não utilizar por períodos prolongados dietas hipercalóricas para vacas destinadas à programas reprodutivos. Assim, é necessário o estabelecimento de dietas balanceadas para vacas secas, principalmente as submetidas à programas de TE.

Pelo fato de vacas *Bos indicus* apresentarem melhor qualidade oocitária e maiores concentrações de glicose, colesterol, insulina e IGF1, a formulação de dietas específicas, com o objetivo de aumentar a concentração intrafolicular desses substratos e hormônios, pode colaborar para melhorar a qualidade de oócitos em *Bos taurus*.

A baixa qualidade oocitária em vacas Holandesas confirma os achados comerciais e justifica a reduzida utilização da PIV para essa raça no Brasil.

REFERÊNCIAS

- ADAMIAK, S. J.; MACKIE, K.; WATT, R. G.; WEBB, R.; SINCLAIR, K. D. Impact of nutrition on oocyte quality: Cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle. **Biology Reproduction**, v. 73, p. 918-26, 2005.
- ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A. Bovine model for study of ovarian follicular dynamics in humans. **Theriogenology**, v. 43, p. 113–120, 1995.
- AHMADZADEH, A.; BARNES, M. A.; PEARSON, R. E. Effect of Naloxone on Serum Luteinizing Hormone Concentration in Anovulatory Holstein Cows During the Early Postpartum Period. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 15, p. 177-181, 1998.
- ALLAIN, C. C.; POON, L. S.; CHAN, C. S. G.; RICHMOND, W.; FU, P. C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. **Clinical Chemistry**, v. 20, p. 470-475, 1974.
- ALVAREZ, P.; SPICER, L. J.; CHASE JR, C. C.; PAYTON, M. E.; HAMILTON, T. D.; STEWART, R. E.; HAMMOND, A. C.; OLSON, T. A.; WETTEMAN, R. P. Ovarian and endocrine characteristics during the estrous cycle in Angus, Brahman and Senepol cows in a subtropical environment. **Journal Animal Science**, v. 78, p. 1291-1302, 2000.
- 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.; 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, 2002a.
- ARMSTRONG, D. G.; GONG, J. G.; GARDNER, J. O.; BAXTER, G.; HOGG, C. O.; WEBB, R. Steroidogenesis in bovine granulosa cells: the effect of short-term changes in dietary intake. **Reproduction**, v. 123, p. 371–378, 2002b.
- 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.
- ARMSTRONG, D. G.; BAXTER, G.; GUTIERREZ, C. G.; HOGG, C. O.; GLAZYRIN, A. L.; CAMPBELL, B. K.; BRAMLEY, T. A.; WEBB, R. Insulin-like growth factor binding protein-2 and -4 mRNA expression in bovine ovarian follicles: effect of gonadotropins and developmental status. **Endocrinology**, v. 139, p. 2146–2154, 1998.
- AUGUSTIN, R.; POCAR, P.; SANTOS, A. N.; WRENZYCKI, C.; GANDOLFI, F.; NIEMANN, H.; FISCHER, B. Glucose transporter expression is developmentally

regulated in in vitro derived bovine preimplantation embryos **Molecular Reproduction and Development**, v. 60, p. 370-376, 2001.

AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; TORRES-JÚNIOR, J. R. S.; DEMÉTRIO, C. G. B.; LIMA, C. G.; BARUSELLI, P. S. Validation of body condition score as a predictor of subcutaneous fat in Nelore (*Bos indicus*) cows. **Livestock Science**, v. 123, p. 175-179, 2009.

BADR, H.; BONGIONI, G.; ABDOON, A. S. S.; KANDIL, O.; PUGLISI, R. Gene expression in the in vitro-produced preimplantation bovine embryos. **Zygote**, v. 15, p. 355-367, 2007.

BARROS, C. M.; NOGUEIRA, M. F. G. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v. 56, p. 1483-1496, 2001.

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*).

BASTOS, M. R.; RAMOS, A. F.; DRIESSEN, K.; MARTINS, A. C.; RUMPF, R.; SARTORI, R. Influência da alta ingestão de matéria seca na resposta superovulatória em vacas mestiças. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, p. 1066-1073, 2009.

BEAM, S. W.; BUTLER, W. R. Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in postpartum dairy cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 54, p. 411-424, 1999.

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.

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.

BERTOLINI, M.; BEAM, S. W.; SHIM, H.; BERTOLINI, L. R.; MOYER, A. L.; FAMULA, T. R.; ANDERSON, G. B. Growth, development and gene expression by *in vivo*- and *in vitro*-produced day 7 and 16 bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 63, p. 318-328, 2002.

BETTEGOWDA, A.; PATEL, O. V.; LEE, K.; PARK, K.; SALEM, M.; YAO, J.; IRELAND, J. J.; SMITH, G. W. Identification of novel bovine cumulus cell molecular markers predictive of oocyte competence: functional and diagnostic implications. **Biology of Reproduction**, v. 79, p. 301-309, 2006.

BETTEGOWDA, A.; PATEL, O. V.; IRELAND, J. J. Quantitative analysis of messenger RNA abundance for ribosomal protein L-15, cyclophilin-A,

phosphoglycerokinase, beta-glucuronidase, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, beta-actin, and histone 2a during bovine oocyte maturation and early embryogenesis in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, p. 267-278, 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.

BILODEAU-GOESEELS, S. Effect of oocyte quality on the relative abundance of specific gene transcripts in bovine mature oocytes and 16-cell embryos. **Canadian Journal Veterinary Research**, v. 67, p. 151-156, 2003.

BLONDIN, P.; BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUNGU, H.; BARNES, F.; SIRARD, M. A. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 38-43, 2002.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MARTINEZ, M. F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 307-26, 2003.

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

BOLS, P. E. J.; LEROY, J. L. M. R.; VAN HOLDER, 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.

BONI, R.; ROELOFSEN, M. W. M.; PIETERSE, 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. 227- 289, 1997.

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

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, W. R. Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. **Journal Dairy Science**, v. 81, p. 2533–2539, 1998.

CAMARGO, L. S. A.; VIANA, J. H. M.; RAMOS, A. A.; SERAPIÃO, R. V.; SA, W. F.; FERREIRA, A. M.; GUIMARÃES, M. F. M.; VALE FILHO, V. R. Developmental competence and expression of the Hsp 70.1 gene in oocytes obtained from *Bos indicus* and *Bos taurus* dairy cows in a tropical environment. **Theriogenology**, v. 68, p. 626-632, 2007.

CAMARGO, L. S. A.; POWELL, A. M.; FILHO, V. R.; WALL, R. J. Comparison of gene expression in individual preimplantation bovine embryos produced by in vitro fertilisation or somatic cell nuclear transfer. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 17, p. 487–496, 2005.

CAMPBELL, B. K.; SCARAMUZZI, R. J.; WEBB, R. Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. Reproduction in Domestic Ruminants III. **Journal Reproduction Fertility**, v. 49, p.335–350, 1995. Supplemetum 49.

CANTFIELD, R. W.; BUTLER, W. R. Energy balance and pulsatile LH secretion in early postpartum dairy cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 7, p. 23-330, 1990.

CARVALHO, J. B. P.; CARVALHO, N. A. T.; REIS, E. L.; NICHI, M.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, v. 69, p. 167-175, 2008.

CASTILHO, C.; GARCIA, J. M.; RENESTO, A.; NOGUEIRA, G. P.; BRITO, L. F. Follicular dynamics and plasma FSH and progesterone concentrations during follicular deviation in the first post-ovulatory wave in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Animal Reproduction Sciencie**, v. 98, p. 189-196, 2007.

CECCONI, S.; CICCARELLI, C.; BARBERI, M. Granulosa cell-oocyte interactions. **European Journal Obstetricy Gynecology Reproduction Biology**, v. 115, p. 19-22, 2004.

CHI, M. M. Y.; SCHLEIN A. L.; MOLEY, K. H. High Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF-1) and Insulin Concentrations Trigger Apoptosis in the Mouse Blastocyst via Down-Regulation of the IGF-1 Receptor. **Endocrinology**, v. 141, p. 4784-4792, 2000.

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.

COMIN, A.; GERIN, D.; CAPPA, A.; MARCHI, V.; RENAVILLE, R.; MOTTA, M.; FAZZINI, U.; PRANDI, A. The effect of an acute energy deficit on the hormone profile of dominant follicles in dairy cows. **Theriogenology**, v. 58, p. 899-910, 2002.

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

DOMINGUEZ, M. M. Effects of body condition, reproductive status and breed on follicular population and oocyte quality in cows. **Theriogenology**, v. 43, p. 1405-1418, 1995.

DOWNING, J. A.; JOSS, J.; CONNELL, P.; SCARAMUZZI, R. J. Ovulation rate and the concentrations of gonadotrophic and metabolic hormones in ewes fed lupin grain. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.103, p.137-145, 1995.

DUNAIF, A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. **Endocrinology Review**, v. 18, p. 774-800, 1997.

ECHTERNKAMP, S. E.; SPICER, L. J.; GREGORY, K. E.; CANNING, S. F.; HAMMOND, J. M. Concentrations of Insulin-Like Growth Factor-I in Blood and Ovarian Follicular Fluid of Cattle Selected for Twins. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 8-14, 1990.

ELROD, C. C.; BUTLER, W. R. Reduction of fertility and alteration of uterine pH in heifers fed excess ruminally degradable protein. **Journal of Animal Science**, v. 71, p. 694-701, 1993.

ESCALONA, F.; MERCADO, J.; RODRIGUEZ, A.; RODRÍGUEZ-SALLABERRY, C.; KOWALSKY, A. A. Different response of *Bos indicus* vs. *Bos taurus* oocyte on maturation, cleavage and embryo development under in vitro system. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 188, 2008.

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

EVANS, A. C. O.; ADAMS, G. P.; RAWLINGS, N. C. Endocrine and ovarian follicular changes leading up to the first ovulation in prepubertal heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 100, p. 187–194, 1994.

FAUSER, B. C. J. M.; VAN HEUSDEN, A. M. Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences. **Endocrine Reviews**, v. 18, p. 71-106, 1997.

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

FERREIRA, R. M.; AYRES, H.; FERRAZ, M. L.; ARAUJO, A. B.; CHIARATTI, M. R.; SA FILHO, M. F.; CALOMENI, G.; RODRIGUES, C. A.; WATANABE, Y. F.; VIREQUE, A. A.; BARUSELLI, P. S. Ovum pick up and in vitro embryo production during the summer: differences between holstein heifers, high producing hostein cows in peak lactation and repeat-breeder hostein cows. **Reproduction Fertility and Development**, v. 22, p. 290, 2010.

FERREIRA, E. M.; VIREQUE, A. A.; ADONA, P. R.; MEIRELLES, F. V.; FERRIANI, R. A.; NAVARRO, P. A. A. S. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v. 71, p. 836-848, 2009.

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

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.

FREITAS, J. A. **Exigências nutricionais de energia e proteína e eficiência líquida de utilização da energia metabolizável para bovinos de diferentes grupos genéticos, em confinamento**. 2004. 89 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

GARCIA, A.; SALAHEDDINE, M. Effects of repeated ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and subsequent follicular development. **Theriogenology**, v. 50, p. 575-585, 1998.

GARNSWORTHY, P. C.; FOULADI-NASHTA, 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.

GIBBONS, J. R.; WILTBANK, M. C.; GINTHER, O. J. Functional interrelationships between follicles greater than 4 mm and follicle-stimulating hormone surge in heifers. **Biological of Reproduction**, v. 57, p. 1066-1073, 1997.

GIBBONS, J. R.; BEAL, W. E.; KRISHER, R. L.; FABER, E. G.; PEARSON, R. E.; GWAZDAUSKAS, F. C. Effect of once versus twice-weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. **Theriogenology**, v. 42, p. 405-419, 1994.

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.; FANTINATO NETO, P.; ARANGO, J. S. P.; AYRES, H.; BARUSELLI, P. S. Follicular dynamics of *Bos indicus*, *Bos taurus* and *Bubalus bubalis* heifers treated with norgestomet ear implant associated or not to injectable progesterone. **Animal Reproduction**, v. 6, p. 256, 2009 (*resumo*).

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 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.; BERGFELT, D. R.; KULICK, L. J.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle: establishment of follicle deviation in less than 8-h through depression of FSH concentrations. **Theriogenology**, v. 52, p. 1079–1093, 1999.

GINTHER, O. J.; KNOFF, L.; KASTELIC, J. P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two or three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 87, p.223-230, 1989.

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.

GONG, J. G.; MCBRIDE, D.; BRAMLEY, T. A.; WEBB, R. Effects of recombinant bovine somatotrophin, insulin-like growth factor-I and insulin on bovine granulosa cell steroidogenesis in vitro. **Journal of Endocrinology**, v. 143, p. 157–164, 1994.

GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryos**. London: Cambridge University Press, 2004. 576 p.

GREER, R. C.; STAIGMILLER, R. B.; PARRISH, J. J. Female traits, ovary and follicle characteristics, and the conditional probability of normal oocyte development after superovulation of beef cows. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 263-272, 1992.

GUILBAULT, L. A.; ROUILLIER, R.; MATTON, P. In vitro release of estradiol and level of atresia of subordinate follicles collected during the growing or regressing phase of follicular dominance in cattle. **Theriogenology**, v. 37, p. 218, 1992 [abstract].

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, 1997a.

GUTIERREZ, C. G.; RALPH, J. H.; TELFER, E. E.; WILMUT, I.; WEBB, R. Growth and antrum formation of bovine antral follicles in long-term culture in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 1322–1328, 2000.

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

HAGEMANN, L. J. Influence of the dominant follicle on oocytes from subordinate follicles. **Therioqenology**, v. 51, p. 449-459, 1999.

HAGEMANN, L. J.; BEAUMONT, S. E.; BERG, M.; DONNISON, M. J.; LEDGARD, A.; PETERSON, A. J. Development during single IVP of bovine oocytes from dissected follicles: interactive effects of estrous cycle stage follicle size and atresia. **Molecular Reproduction Development**, v. 53, p. 451–458, 1999.

HALLETT, C. J.; COOK, J. G. H. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide-coupled reaction for emergency blood urea estimation. **Clinica Chimica Acta**, v. 35, p. 33-37, 1971.

HAMMON, D. S.; HOLYOAK, G. R.; DHIMAN, T. R. Association between blood plasma urea nitrogen levels and reproductive fluid urea nitrogen and ammonia concentrations in early lactation dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 86, p. 195-204, 2005.

HAMMON, D. S.; WANG, S.; HOLYOAK, G. R. Ammonia concentration in bovine follicular fluid and its effect during in vitro maturation on subsequent embryo development. **Animal Reproduction Science** v. 58, p. 1-8, 2000.

HANSEN, P. J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Animal Reproduction Science**, v. 83, p. 349-360, 2004.

HASSEN, A.; WILSON, D. E.; ROUSE, G. H. Evaluation of carcass live, and real-time ultrasound measures im feedlot cattle: I. Assessment of Sex and breed effects. **Journal Animal Science**, v. 76, p. 273-282, 1998.

HENRY, R. J.; CANNON, D. C.; WINKELMAN, J. **Clinical chemistry: principles and techniques**. 2ed. New York: Harper &Row Publishers Inc N.Y.,1974. 1288 p.

HERNÁNDEZ, A. J. L.; NAVEDA, R. P.; CASTILLO, G. S.; ATENCIO, A.; CHASE JR., C. C.; CHENOWETH, P. J. Social and breed effects on the expression of a PGF2 α induced oestrus in beef cows. **Reproduction Domestic Animal**, v. 39, p. 315-320, 2004.

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.

IWATA, H.; INOUE, J.; KIMURA, K.; KUGE, T.; KUWAYAMA T.; MONJI, Y. Comparison between the characteristics of follicular fluid and the developmental

competence of bovine oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 91, p. 215–223, 2006.

KAKUDA, D. K.; MACLEOD, C. L. Na(+)-independent transport (uniport) of amino acids and glucose in mammalian cells. **The Journal of Experimental Biology**, v. 196, p. 93-108, 1994.

KASTELIC, J. P.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J. Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. **Theriogenology**, v. 33, p. 1269-1278, 1990.

KAWARSKY, S. J.; KING, W. A. Expression and localisation of heat shock protein 70 in cultured bovine oocytes and embryos. **Zygote**, v. 9, p. 39-50, 2001.

KEISLER, D. H.; LUCY, M. C. Perception and interpretation of the effects of undernutrition on reproduction. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 1–17, 1996.

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.

KIANG, J. G.; TSOKOS, G. C. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. **Pharmacology Therapeutics**, v. 80, p. 183-201, 1998.

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.

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.

KREGEL, K. C. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance, **Journal Applied Physiology**, v. 92, p. 2177-2186, 2002.

KRUIP, T. H. A. M.; BONI, R.; WURTH, Y. A.; ROELOFSEN, M. W. M.; PIETERSE, M. C. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. **Theriogenology**, v. 42, p. 675-684, 1994.

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

LANSBERGEN, L. M. T. E.; VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A. M.; DEN DAAS, J. H. G.; DE RUIGH, L.; VAN DER STREEK, G. J. M.; REINDERS, C.; AARTS, M.;

RODEWIJK J. Factors affecting ovum pick up in cattle. **Theriogenology**, v. 43, p. 259, 1995.

LAVEN, R. A.; DAWUDA, P. M.; SCARAMUZZI, R. J.; WATHES, D. C.; BIGGADIKE, H. J.; PETERS, A. R. The effect of feeding diets high in quickly degradable nitrogen on follicular development and embryo growth in lactating Holstein dairy cows. **Animal Reproduction Science** v. 84, p. 41–52, 2004.

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.

LEIBFRIED, L.; FIRST, N. L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. **Journal 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.; KRUIF, A. Metabolite and ionic composition of follicular fluid from different-sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 80, p. 201-211, 2004a.

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, 2004b.

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.; 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, 2008a.

LEYENS, G.; KNOOPS, B; DONNAY, I. Expression of peroxiredoxins in bovine oocytes and embryos produced in vitro. **Molecular Reproduction Development**, v. 69, p. 243-251, 2004.

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.

LOPEZ, H.; SATTER, L. D.; WILTBANK, M. C. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 81, p. 209–223, 2004.

LOZANO, J. M.; LONERGAN, P.; BOLAND, M. P.; O'CALLAGHAN, D. Influence of nutrition on the effectiveness of superovulation programmes in ewes: effect on oocyte quality and post-fertilization development. **Reproduction**, v. 125, p. 543–553, 2003.

LOZANO, J. M.; NATION, D. P.; WARD, F. A.; O'CALLAGHAN, D. Effect of nutrition on oocyte developmental capacity in dairy cows. **Theriogenology**, v. 53, p. 276, 2000 (*resumo*).

LUCY, M. C. Mechanisms linking nutrition and reproduction in postpartum cows. **Reproduction Domestic Ruminant**, v. 61, p. 415–417, 2003.

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.

MACHATKOVA, M.; KRAUSOVA, K.; JOKESOVA E.; TOMANEK, M. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo production. **Theriogenology**, v. 61, p. 329–335, 2004.

MACKEY, D. R.; SREENAN, J. M.; ROCHE, J. F.; DISKIN, M. G. Effect of acute restriction on incidence of anovulation and periovulatory estradiol and gonadotropin concentrations in beef heifers. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 1601–1607, 1999.

MANN, G. E.; LAMMING, G. E. Relationship between maternal endocrine environment early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. **Reproduction**, v. 121, p. 175–180, 2001.

MARSHALL, D. M. Breed differences and genetic parameters for body composition traits in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 2745–2755, 1994.

MARTINS, A. C.; MOLLO, M. R.; BASTOS, M. R.; GUARDIEIRO, M. M.; SARTORI, R. Concentrações séricas hormonais em vacas azebuadas submetidas à baixa e alta ingestão alimentar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 243–247, 2008.

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.

MCCAFFERY, F. H.; LEASK, R.; RILEY, S. C.; TELFER, E. E. Culture of bovine preantral follicles in a serum-free system: markers for assessment of growth and development. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 267-273, 2000.

MCCANN, J. P.; HANSEL, W. Relationship between insulin and glucose metabolism and pituitary-ovarian functions in fasted heifers. **Biology of Reproduction**, v. 34, p. 630-641, 1986.

MCCANN, J. P.; REIMERS, T. J. Effects of obesity on insulin and glucose metabolism in cyclic heifers. **Journal of Animal Science**, v. 62, p. 772-782, 1986.

MCCANN, J. P.; ULLMANN, M. B.; TEMPLE, M. R.; REIMERS, T. J.; BERGMAN, E. M. Insulin and glucose responses to glucose injection in fed and fasted obese and lean sheep. **Journal of Nutrition**, v. 116, p. 1287-1297, 1986.

MCEVOY, T. G.; SINCLAIR, K. D.; STAINES, M. E.; ROBINSON, J. J.; ARMSTRONG, D. G.; WEBB, R. In-vitro blastocyst production in relation to energy and protein intake prior to oocyte collection. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 19, p. 132, 1997 (Resumo).

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

MCNAMARA, S.; BUTLER, T.; RYAN, D. P.; MEE, J. F.; DILLON, P.; O'MARA, F. P.; BUTLER, S. T.; ANGLESEY, D.; RATH, M.; MURPHY, J. J. Effect of offering rumen-protected fat supplements on fertility and performance in spring-calving Holstein-Friesian cows. **Animal Reproduction Science**, v. 79, p. 45-56, 2003.

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

MERTON, J. S.; ASK, B.; ONKUNDI, D. C.; MULLAART, E.; COLENBRANDER, B.; NIELEN, M. Genetic parameters for oocyte number and embryo production within a bovine ovum pick-up–in vitro production embryo-production program. **Theriogenology**, v. 72, p. 885-893, 2009.

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.

MEMBRIVE, C. M. B. **Estudo da sincronização das ondas foliculares e das características de estros, por radiotelemetria, em novilhas cruzadas (Bos**

indicus x Bos taurus) tratadas com acetato de melengestrol e prostaglandina associados a hCG, GnRH ou 17 β estradiol + progesterona. 2000. 156 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

MIHM, M.; AUSTIN, E. J. The final stages of dominant follicle selection in cattle. **Domestic Animal Endocrinology** v. 23, p. 155-166, 2002.

MIYANO, T. Bringing up small oocytes to eggs in pigs and cows. **Theriogenology**, v. 59, p. 61-72, 2003.

MIZUTA, K. **Estudo comparativo dos aspectos comportamentais do estro e dos teores plasmáticos de LH, FSH, progesterona e estradiol que precedem a ovulação em fêmeas bovinas Nelore (Bos taurus indicus), Angus (Bos taurus taurus) e Nelore x Angus (Bos taurus indicus x Bos taurus taurus).** 2003. 98 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MOALLEM, U.; KATZ, M.; LEHRER, H.; LIVSHITZ, L.; YAKOBY, S. Role of peripartum dietary propylene glycol or protected fats on metabolism and early postpartum ovarian follicles. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 1243-1254, 2007.

MOLEY, K. H. Hyperglycemia and apoptosis: mechanisms for congenital malformations and pregnancy loss in diabetic women. **Trends Endocrinology Metabolism**, v. 12, p. 78-82, 2001.

MOLLO, M. R.; RUMPF, R.; MARTINS, A. C.; MATTOS, M. C. C.; LOPES JR., G.; CARRIJO, L. H. D.; SARTORI, R. Ovarian function in Nelore heifers under low or high feed intake. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, p. 958, 2007 (Abstract).

MONTEIRO, F. M.; FERREIRA, M. M. G.; POTIENS, J. R.; EBERHARDT, B. G.; TRINCA, L. A.; BARROS, C. M. Influence of superovulatory protocols on in vitro production of Nelore (Bos indicus) embryos. **Reproduction of Domestic Animals** v. 4, p. 1-5, 2009.

MOUROT, M.; DUFORT, I.; GRAVEL, C.; ALGRIANY, O.; DIELEMAN, S.; SIRARD, M. A. The influence of follicle size, FSH-enriched maturation medium, and early cleavage on bovine oocyte maternal mRNA levels. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, p. 1367-1379, 2006.

MURPHY, M. G.; ENRIGHT, W. J.; CROWE, M. Q.; MCCONNELL, K.; SPICER, L. J.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F. Effect of dietary intake on pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle in beef heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 92, p. 333-338, 1991.

NRC - NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle.** 7.rev.ed. Washington, D.C.: NRC, 2001. 381 p.

NISWENDER, G. D. Molecular control of luteal secretion of progesterone. **Reproduction**, v. 123, p. 333-339, 2002.

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

NUTTINCK, F.; CHARPIGNY, G.; MERMILLOD, P.; LOOSFELT, H.; MEDURI, G.; FRERET, S.; GRIMARD, B.; HEYMAN, Y. Expression of components of the insulin-like growth factor system and gonadotropin receptors in bovine cumulus–oocyte complexes during oocyte maturation. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 27, p. 179–195, 2004.

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

O'CALLAGHAN, D.; YAAKUB, H.; HYTTEL, P.; SPICER, L. J.; BOLAND, M. P. Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition and systemic hormone concentrations in ewes. **Journal Reproduction Fertility**, v. 118, p. 303-313, 2000.

O'CONNOR, S. F.; TATUM, J. D.; WULF, D. M.; GREEN, R. D.; SMITH, G. C. Genetic effects on beef tenderness in *Bos indicus* composite and *Bos taurus* cattle. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 1822-1830, 1997.

OPSOMER, G.; WENSING, T. H.; LAESENS, H.; CORYN, M.; DE KRUIF, A. Insulin resistance: the link between metabolic disorders and cystic ovarian disease in high yielding dairy cows? **Animal Reproduction Science**, v. 56, p. 211- 222, 1999.

PALMA, G. A.; MÜLLER, M.; BREM, G. Effect of insulin-like growth factor I (IGF-I) at high concentrations on blastocyst development of bovine embryos produced in vitro. **Journal Reproduction Fertility**, v. 110, p. 347-353, 1997.

PANTALEON, M; KAYE, P. L. IGF-I and insulin regulate glucose transport in mouse blastocysts via IGF-I receptor. **Molecular Reproduction Development**, v. 44, p. 71-76, 1996.

PAPADOPOULOS, S.; LONERGAN, P.; GATH, V.; QUINN, K. M.; EVANS, A. C.; O'CALLAGHAN, D.; BOLAND, M. P. Effect of diet quantity and urea supplementation on oocyte and embryo quality in sheep. **Theriogenology**, v. 55, p. 1059-1069, 2001.

PAULA-LOPES, F. F.; CHASE JR., C. C.; AL-KATANANI, Y. M.; KRININGER, C. E.; RIVERA, R. M.; TEKIN, S.; MAJEWSKI, A. C.; OCON, O. M.; OLSON, T. A.; HANSEN, P. J. Genetic divergence in cellular resistance to heat shock in cattle: differences between breeds developed in temperate versus hot climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract tissues and lymphocytes to increased culture temperatures. **Reproduction**, v. 125, p. 285-294, 2003.

PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Apoptosis is an adaptative response in bovine preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 295, p. 37-42, 2002.

PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Heat Shock-Induced Apoptosis in Preimplantation Bovine Embryos Is a Developmentally Regulated Phenomenon. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 1169-1177, 2002.

PAWSHE, C. H.; RAO, K. B.; TOTEY, S. M. Effect of insulin-like growth factor I and its interaction with gonadotropins on in vitro maturation and embryonic development, cell proliferation, and biosynthetic activity of cumulus-oocyte complexes and granulosa cells in buffalo. **Molecular Reproduction Development**, v. 49, p. 277-285, 1998.

PETYIM, S.; BÁ, R. G. E.; FORSBERG, M.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; LARSSON, B. Effects of Repeated Follicular Punctures on Ovarian Morphology and Endocrine Parameters in Dairy Heifers. **Journal Veterinary Medicine**, v. 48, p. 449-463, 2001.

PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 30, p. 26-36, 2002.

PINHEIRO, O. L.; BARROS, C. M.; FIGUEREDO, R. A.; VALLE, E. R.; ENCARNÇÃO, R. O.; PADOVANI, C. R. Estrous behaviour and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F₂ α or norgestomet and estradiol valerate. **Theriogenology**, v. 49, p. 667-681, 1998.

PONTES, J. H. F.; SILVA, K. C. F.; BASSO, A. C.; FERREIRA, C. R.; SANTOS, G. M. G.; SANCHES, B. V.; PORCIONATO, J. P. F.; VIEIRA, P. H. S.; STERZA, F. A. M.; SENEDA, M. M. Comparison of oocyte and embryo production among *Bos taurus*, *Bos indicus* and *indicus-taurus* donor cows. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, p. 248, 2010.

RAE, D. O.; CHENOWETH, P. J.; GIANGRECO, M. A.; DIXON, P. W.; BENNET, F. L. Assessment of estrus detection by visual observation and electronic detection methods and characterization of factors associated with estrus and pregnancy in beef heifers. **Theriogenology**, v. 51, p. 1121-1132, 1999.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J. M.; DEPREZ, R. H.; MOORMAN, A. F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, v. 339, p. 62-66, 2003.

REIMERS, T. J.; COWAN, R. G.; MCCANN, J. P.; ROSS, M. W. Validation of a rapid solid-phase radioimmunoassay for canine, bovine, and equine insulin. **American Journal of Veterinary Research**, v. 43, p. 1274-1278, 1982.

RHOADS, M. L.; RHOADS, R. P.; GILBERT, R. O.; TOOLE, R.; BUTLER, W. R. Detrimental effects of high plasma urea nitrogen levels on viability of embryos from lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 91, p. 1-10, 2006.

RHODES, F. M.; ENTWISTLE, K. W.; KINDER, J. E. Changes in ovarian function and gonadotropin secretion preceding the onset of nutritionally induced anestrus in *Bos indicus* heifers. **Biology and Reproduction**, v. 55, p. 1437-1443, 1996.

RHODES, F. M.; FITZPATRICK, L. A.; ENTWISTLE, K. W.; DE'ATH, G. Sequential changes in ovarian follicular dynamics in *Bos indicus* heifers before and after nutritional anoestrus. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 104, p. 41-49, 1995.

ROBINSON, J. J.; ASHWORTH, C. J.; ROOKE, J. A.; MITCHELL, L. M.; MCEVOY, T.G. Nutrition and fertility in ruminant livestock. **Animal Feed Science Technology**, v. 126, p. 259–276, 2006.

ROELOFS, J.; LÓPEZ-GATIUS, F.; HUNTERD, R. H. F.; VAN EERDENBURGE, F. J. C. M.; HANZEN, C. H. When is a cow in estrus? Clinical and practical aspects. **Theriogenology**, 2010. (*In press*).

ROOKE, J. A.; AINSLIE, A.; WATT, R. G.; ALINK, F. M.; MCEVOY, T. G.; SINCLAIR, K. D.; GARNSWORTHY P. C.; WEBB R. Dietary carbohydrates and amino acids influence oocyte quality in dairy heifers. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 21, p. 419-427, 2009.

ROMAR, R.; SANTIS, T.; PAPILLIER, P.; PERREAU, C.; THELIE, A.; DELL'AQUILA, M. E.; MERMILLOD, P.; DALBIE`S-TRAN, R. Expression of Maternal Transcripts During Bovine Oocyte In Vitro Maturation is Affected by Donor Age. **Reproduction in Domestic Animals**, 2010. (*In press*).

ROZEN, S.; SKALETISKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Methods in Molecular Biology**, v. 132, p. 365-386, 2000.

SAGIRKAYA, H.; MISIRLIOGLU, M.; KAYA, A.; FIRST, N. L.; PARRISH, J. J.; MEMILI, E. Developmental potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. **Animal Reproduction Science**, v. 101, p. 225-240, 2007.

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

SAKAGUCHI, M.; DOMINKO, T.; YAMAUCHI, N.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; NAGAI, T.; FIRST, N. L. Possible mechanism for acceleration of meiotic progression of bovine follicular oocytes by growth factors in vitro. **Reproduction**, v. 123, p. 135–142, 2002.

SALES, J. N. S.; DIAS, L. M. K.; VIVEIROS, A. T. M.; PEREIRA, M. N.; SOUZA, J. C. Embryo production and quality of Holstein heifers and cows supplemented with betacarotene and tocopherol. **Animal Reproduction Science**, v. 106, p. 77-89, 2008.

SANGSRITAVONG, S.; COMBS, D. K.; SARTORI, R.; WILTBANK, M. C. High feed intake increases blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 β in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 2831-2842, 2002.

SANTOS, J. E.; CERRI, R. L.; SARTORI, R. Nutritional management of the donor cow. **Theriogenology** v. 69, p. 88-97, 2008.

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**, 2010. (*In press*).

SARTORI, R.; BASTOS, M. R.; MOLLO, M. R.; MARTINS, A. C. Influência da ingestão alimentar na produção de embriões bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35 p. 869-873, 2007.

SARTORI, R.; HAUGHIAN, J. M.; SHAVER, R. D.; ROSA, G. J.; 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.; FRICKE, P. M.; FERREIRA, J. C. P.; GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biology of Reproduction**, v. 65, p.1403-1409, 2001.

SAS - STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **SAS user's guide**: statistics. Versão 8.0. Cary: SAS, 2000.

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

SCHULTZ, R. M. The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. **Human Reproduction Update**, v. 8, p. 323-331, 2002.

SCHULTZ, R. M. Regulation of zygotic gene activation in the mouse. **BioEssays**, v. 15, p. 531-538, 1993.

SEGERSON, E. C.; HANSEN, T. R.; LIBBY, D. W.; RANDEL, R. D.; GETZ, W. R. Ovarian and uterine morphology and function in Angus and Brahman cows. **Journal Animal Science**, v. 59, p. 1026-1046, 1984.

SENEDA, M. M.; ESPER, C. R.; GARCIA, J. M.; OLIVEIRA, J. A.; VANTINI, R. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **Animal Reproduction Science**, v. 67, p. 37-43, 2001.

SHORT, R. E.; ADAMS, D. C. Nutritional and hormonal interrelationships in beef cattle reproduction. **Canadian Journal Animal Science**, v. 68, p. 29-39, 1988.

SILVA, A. W. M. V.; ANDERSON, G. W.; GWAZDAUSKAS, F. C.; MCGILLIARD, M. L.; LINEWEAVER, J. A. Correlations with estrous behavior and conception in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 64, p. 2409-2418, 1981.

SILVA, F. F.; VALADARES FILHO, S. C.; ITAVO, L. C. V.; VELOSO, C. M.; PAULINO, M. F.; VALADARES, R. F. D.; CECON, P. R.; SILVA, P. A.; GALVÃO, R. M. Consumo, desempenho, características de carcaça e biometria do trato gastrointestinal e dos órgãos internos de novilhos Nelore recebendo dietas com diferentes níveis de concentrado e proteína. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, p. 1849-1864, 2002.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos (Métodos químicos e biológicos)**. Viçosa: UFV Press, 2002. 235 p.

SIMPSON, R. B.; CHASE JR., C. C.; SPICER, L. J.; VERNON, R. K.; HAMOND, A. C.; RAE, D. O. Effect of exogenous insulin on plasma and follicular insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor binding protein activity, follicular estradiol and progesterone, and follicular growth in superovulated Angus and Brahman cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 102, p. 483-492, 1994.

SINCLAIR, K. D.; KURAN, M.; GEBBIE, F. E.; WEBB, R.; MCEVOY, T. G. Nitrogen metabolism and fertility in cattle: II. Development of oocytes recovered from heifers offered diets differing in their rate of nitrogen release in the rumen. **Journal Animal Science**, v. 78, p. 2670-2680, 2000.

SINCLAIR, K. D.; MOLLE, G.; REVILLA, R.; ROCHE, J. F.; QUINTANS, G.; MARONGIU, L.; SANZ, A.; MACKEY, D. R.; DISKIN, M. G. Ovulation of the first dominant follicle arising after day 21 postpartum in suckling beef cows. **Animal Science**, v. 75:115-126, 2002.

SMITH, L. C.; OLIVERA-ANGEL, M.; GROOME, N. P.; BHATIA, B.; PRICE, C. A. Oocyte quality in small antral follicles in the presence or absence of a large dominant follicle in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 106, p. 193-199, 1996.

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.

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.

SPICER, L. J.; TUCKER, W. B.; ADAMS, G. D. Insulin-like growth factor-I in dairy cows: relationships among energy balance, body condition, ovarian activity, and estrous behavior. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 929-937, 1990.

SPITZER, J. C.; NISWENDER, G. D.; SEIDEL, G. E.; WILTBANK, J. N. Fertilization and blood levels of progesterone and LH in beef heifers on a restricted energy diet. **Journal of Animal Science**, v. 46, p. 1071-1077, 1978.

STAGG, K.; DISKIN, M. G.; SREENAN, J. M.; ROCHE, J. F. Follicular development in longterm anoestrous suckler beef cows fed two levels of energy postpartum. **Animal Reproduction Science**, v. 38, p. 49-61, 1995.

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

STUBBINGS, R. B.; WALTON, J. S. Effect of ultrasonically-guided follicle aspiration on estrous cycle and follicular dynamics in Holstein cows. **Theriogenology**, v. 43, p. 705-712, 1995.

THELIE, A.; PAPILLIER, P.; PERREAU, C.; UZBEKOVA, S.; HENNEQUET-ANTIER, C.; DALBIES-TRAN, R. Regulation of bovine oocyte-specific transcripts during in vitro oocyte maturation and after maternal-embryonic transition analyzed using a transcriptomic approach. **Molecular Reproduction Development**, v. 76, p. 773-782, 2009.

TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 6, n. 1, p. 24-26, 1969.

TORRES JUNIOR, J. R. S.; PIRES, M. F. A.; SÁ, W. F.; FERREIRA, A. M.; VIANA, J. H. M.; CAMARGO, L. S. A.; RAMOS, A. A.; FOLHADELLA, I. M.; POLISSENI, J.; FREITAS, C.; CLEMENTE, C. A. A.; SÁ FILHO, M. F.; LOPES, F. F. P.; BARUSELLI, P. S. Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v. 69, p. 155-166, 2008.

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

VASCONCELOS, J. L. M.; 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. 15, p. 307-314, 2001.

VIEIRA, F. V. R.; LOPES, C. N.; CAPPELLOZZA, B. I.; SCARPA, A. B.; COOKE, R. F.; VASCONCELOS, J. L. M. Effects of intravenous glucose infusion and nutritional balance on serum concentrations of nonesterified fatty acids, glucose, insulin, and progesterone in nonlactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 3047-3055, 2010.

VIANA, J. H. M. **Punção e aspiração folicular orientada por ultra-som em vacas da raça Gir**. 2002, 124 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.

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.; FERREIRA, A. M.; SÁ, W. F.; CAMARGO, L. S. A. Follicular dynamics in zebu cattle. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 2501-2509, 2000.

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, Seropédica*, v. 23, n. 3, p. 119-124, 2003.

VIANA, J. H. M.; PALHAO, M. P.; SIQUEIRA, L. G. B.; FONSECA, J. F.; CAMARGO, L. S. A. Ovarian follicular dynamics, follicle deviation, and oocyte yield in Gyr breed (*Bos indicus*) cows undergoing repeated ovum pick-up. **Theriogenology**, v. 73, p. 966-972, 2010.

VILLA-GODOY, A.; HUGHES, T. L.; EMERY, R. S.; ENRIGHT, W. J.; EALY, A. D.; ZINN, S. A.; FOGWELL, R. L. Energy balance and body condition influence luteal function in Holstein heifers. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 7, p. 135-148, 1990.

WALTON, J. S.; CHRISTIE, K. A.; STUBBINGS, R. B. Evaluation of frequency of ultrasonically guided follicle aspiration on bovine ovarian dynamics. **Theriogenology**, v. 39, p. 336, 1993.

WANG, L. M.; FENG, H. L.; MA, Y. Z. H.; CANG, M.; LI, H. J.; YAN, Z. H.; ZHOU, P.; WEN, J. X.; SHORGAN BOU; LIU, D.J. Expression of IGF receptors and its ligands in bovine oocytes and preimplantation embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 114, p. 99-108, 2009.

WANG, T. H.; CHANG, C. L.; WU, H. M.; CHIU, Y. M.; CHEN, C. K.; WANG, H. S. Insulin-like growth factor-II (IGF-II), IGF-binding protein-3 (IGFBP-3), and IGFBP-4 in follicular fluid are associated with oocyte maturation and embryo development. **Fertility and Sterility**, v. 86, p. 1392-1401, 2006.

WEBB, R.; ARMSTRONG, D. G. Control of ovarian function; effect of local interactions and environmental influences on follicular turnover in cattle: a review. **Livestock Production Science**, v. 53, p. 95-112, 1998.

WEBB, R.; CAMPBELL, B. K.; GARVERICK, H. A.; GONG, J. G.; GUTIERREZ, C. G.; ARMSTRONG, D. G. Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 54, p. 33-48, 1999.

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.

WETTEMANN, R. P.; LENTS, C. A.; CICCIOLO, N. H.; WHITE, F. J.; RUBIO, I. Nutritional- and suckling-mediated anovulation in beef cows. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 48-59, 2003.

WHITE, F. J.; WETTEMANN, R. P.; LOOPER, M. L.; PRADO, T. M.; MORGAN, G. L. Seasonal effects on estrous behavior and time of ovulation in non-lactating beef cows. **Journal Animal Science**, v. 80, p. 3053-3059, 2002.

WILDMAN, E. E.; JONES, G. M.; WAGNER, P. E.; BOMAN, R. L.; TROUTT JR., H. F.; LESCH, T. N. A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. **Journal Dairy Science**, v. 65, p.495-501, 1982.

WILKINSON, R. F.; MING, R.; ANDERSON, B.; BUNCH, T. D.; WHITE, K. L. The use of neural networks in developing novel embryo culture media-formulations. **Theriogenology**, v. 45, p. 41-49, 1996.

WILLIAMS, G. L.; GAZAL, O. S.; VEGA, G. A. G.; STANKO, R. L. Mechanisms regulating suckling-mediated anovulation in the cow. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.289-297, 1996.

WILLIAMSON, D. H.; MELLANBY, J.; KREBS, H. A. Enzymatic determination of D(-) β -hydroxybutyric and acetoacetic acid in blood. **Biochemical Journal**, v. 82, p. 90. 1962.

WILLIAMS, G. L. Suckling as a regulator of postpartum rebreeding in cattle: a review. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 8331-852, 1990.

WILSON, D. E. Application of ultrasound for genetic improvement. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 973-983, 1992.

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

WOLFENSON, D.; INBARA, G.; ROTH, Z.; KAIMB, M.; BLOCHA, A.; BRAW-TAL, R. Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. **Theriogenology**, v. 62, p. 1042-1055, 2004.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; KESKINTEPE, L.; MARTINS JR., A.; SIRISATHIEN, S.; BRACKETT, B. Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. **Human Reproduction**, v. 16, p. 893-901, 2001.

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.

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

ZEITOUN, M. M.; RODRIGUEZ, H. F.; RANDEL, R. D. Effect of season on ovarian follicular dynamics in Brahman cows. **Theriogenology**, v. 45, p. 1577-1581, 1996.

ZHOU, J.; BIEVRE, M.; BONDY, C. A. Reduced GLUT1 expression in Igf1-/- null oocytes and follicles. **Growth Hormone and IGF Research**, v. 10, p. 111-117, 2000.