JULIANNE DE REZENDE NAVES

**Perfil lipídico do plasma de vacas leiteiras segundo abordagem “ômica” e sua relação
com desempenho reprodutivo**

Pirassununga-SP

2015

JULIANNE DE REZENDE NAVES

**Perfil lipídico do plasma de vacas leiteiras segundo abordagem “ômica” e sua relação
com desempenho reprodutivo**

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

Departamento:

Reprodução Animal

Área de Concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Ed Hoffmann Madureira

Pirassununga-SP

2015

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)

T.3138
FMVZ

Naves, Julianne de Rezende
Perfil lipídico do plasma de vacas leiteiras segundo abordagem "ômica" e sua relação
com desempenho reprodutivo / Julianne de Rezende Naves. -- 2015.
110 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, Pirassununga, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Ed Hoffmann Madureira.

1. Espectrometria de massas. 2. Lipidômica. 3. Período de transição. 4. Plasma
sanguíneo. 5. Vacas Holandesas. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Estudo das condições metabólicas e hormonais de vacas leiteiras de alta e média produção de leite durante o período de transição e início de lactação”, protocolado sob o nº 2393/2011, utilizando amostras de sangue de 200 (duzentas) vacas, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Ed Hoffmann Madureira, foi aprovado “ad referendum” e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research “Study of metabolic and hormonal conditions of dairy cows with high and medium milk production during the transition period and early lactation”, protocol number 2393/2011, utilizing blood samples of 200 (two hundred) cows, under the responsibility Prof. Dr. Ed Hoffmann Madureira, was approved “ad referendum” and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo.

São Paulo, 14 de agosto de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: NAVES, Julianne de Rezende

Título: Perfil lipídico do plasma de vacas leiteiras segundo abordagem “ômica” e sua relação com desempenho reprodutivo

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.Dr: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

À Deus por guiar-me nesta e em todas as trajetórias;

Aos meus pais (Márcio Antônio Naves e Lucília de Rezende Naves) e irmão (Adriano de Rezende Naves) que são meus maiores tesouros, meus maiores amores, meus grandes ensinamentos, minhas maiores verdades...por vocês e com vocês a força se reconstrói.

À todos os meus familiares, em especial, à minha prima Débora Naves, meus primos Alexandro Rezende e Soraya Fleicher, tia Edyr, tio David, tia Raquel, tia Maria, pelos eternos momentos de alegria, carinho, apoio e dedicação ao longo da minha vida e, principalmente, colaborando e incentivando na continuidade dos meus estudos;

Ao meu amor, Mauro Lúcio Vanzelli Marcucci, pelos infinitos momentos de dedicação, respeito, paciência, amizade, ajudas, alegrias, carinho, compreensão e sacrifícios. Eu te amo.

À Mikaela Marcucci, pela amizade, respeito, ajuda, compreensão e alegria que tornaram o final desta caminhada mais branda;

A família Marcucci pelo carinho, respeito, amizade e acolhimento;

Às minhas queridas amigas da minha cidade natal, Brasília, (Benigna Teixeira, Juliana Franco Raulino, Aline Campeche, Karine Ribas, Daniela Damasceno, Amanda Roewer, pelos longos anos de convivência (apesar da distância), amizade, carinho, cuidados, alegrias, apoio e motivação;

A minha pequena Rosário, pelos eternos cuidados, amor e carinhos sempre dispensados;

Aos meus amigos Mary e família, Shane, Christina, Sushil, Choortee, Karina e Daniela Resende Bruno pelo apoio, amizade, alegrias e dedicação durante meu estágio no Texas (EUA);

Aos meus mascotes adotivos, Maggie e Mingau, pelos eternos momentos de descontração e alegrias durante meu doutorado em meio a tantos tumultos diários;

Agradeço à Universidade de São Paulo, à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, e ao Departamento de Reprodução Animal pelas oportunidades proporcionadas, pelo apoio incessante ao trabalho, pelo aprimoramento do conhecimento profissional, acadêmico e científico;

À CAPES, pela concessão das bolsas de estudos no Brasil e nos Estados Unidos, proporcionando aprimoramento do conhecimento, amadurecimento e experiência profissional com consequente tranquilidade para dedicação deste trabalho;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão do auxílio à pesquisa que possibilitou a realização deste estudo;

À Fazenda Colorado, pela disposição da propriedade, animais e imprescindível profissionalismo;

Ao Sr. Lair Antonio de Souza, Sr. Antonio Carlos, administrador da Fazenda Colorado. Obrigada pela permissão e colaboração na execução desse estudo;

Ao Dr. Sérgio Soriano, médico veterinário, pela atenção e dedicação dispensadas;

Ao Senhor Luis, responsável pelo manejo das vacas na fazenda Colorado pelo auxílio no desenvolvimento das etapas deste estudo, pela colaboração nos protocolos, inseminações e profissionalismo;

Às vacas do experimento, que são os maiores motivos e incentivos motivacionais para se chegar aos resultados finais;

Aos Funcionários do Manejo: Luca, Luisinho, Mauro e Bitá e médicos veterinários da fazenda: Natalia e Cica. Obrigada pelo apoio.

À equipe da ordenha, do trato e do manejo do galpão que permitem o sincronismo de todos os processos diários da fazenda. Muito obrigada!

Ao professor e orientador Prof. Dr. Ed Hoffmann Madureira, pela orientação, profissionalismo, amizade, humildade, ensinamentos e conselhos, confiança e paciência. Muito obrigada por todo apoio e incentivos!

À equipe do LFER e amigos: Milton Maturana Filho e Thiago Santin....longo tempo de amizade... Agradeço, do fundo do meu coração: pelo amadurecimento profissional, pela consideração, compreensão, dedicação, parceria nos projetos, alegrias, tristezas e até pelos pontos de vista divergentes. Cada um com sua grandeza e destreza para lidar com a vida, e independente de qualquer fator, obrigada por fazerem parte da minha. Durante este longo convívio e aprendizados diários foram chaves para valores fundamentais como o amadurecimento, crescimento, a cessação e o perdão.

Aos amigos Júlio Barboza, Agustin Silva e Kleber Menegon Lemes pelos ensinamentos, aprimoramentos, alegria e confiança;

À minha querida ex-estagiária Juliana Marques, pela amizade, profissionalismo, alegrias e apoio perante os desafios e dificuldades;

À todos os professores do Departamento de Reprodução Animal (VRA): Dr. Mario Binelli, Dr. Rubens de Paes Arruda, Dra. Anneliese Souza Traldi, Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini pela colaboração, amizade e profissionalismo dispensados;

Aos Profs. Drs. Julio Balieiro, Luís Felipe Prada e Silva, Dr Eduardo Harry Birgel, a Dra Daniela Birgel pela compreensão, humildade, amizade, atenção, parceria nos projetos e ensinamentos;

Aos profissionais Dr. Fabio D’Alexandri, Dr. Helio Alves Martins Júnior, Dra. Christina Ramires e Rosy Simas, pela dedicação, apoio, ensinamentos e conclusão dos estudos;

Ao meu orientador de estágio sanduíche de doutorado no Texas A&M AGRILIFE, Texas (EUA), Dr. Pablo Pinedo e família, pela orientação, pelos ensinamentos, apoio, amadurecimento profissional e amizade;

Aos professores Dr. Srirama Krishna Reddy e Dr. Hemant Naikare pelo apoio, orientação e amizade durante minha estadia no Texas A&M AGRILIFE, Texas (EUA);

Aos colegas e amigos de pós-graduação, pelos queridos momentos de convivência e ensinamentos eternos: Rafa (bizão), Leonardo Batissaco, Saara Scolari, Roberta Harue, Fernanda Jordão, Daniela Chiebao, Estela Araújo, Moana França, Roberta Ferreira, Gisele Mouro, Laís (Kokota), Julia, Robertinha, Shirley Florez, Everton Lopes, Maíra Bianchi, Vanessa Storillo, Vanessa Piotto, Vanessa Figueredo, Henrique Fulaneti, Henrique Hooper, Melina Yasuoka, Flávio Minieri, Renata Lançoni, Mariana Rodrigues, Ticiano Guimarães Leite, Bruna Oliveira, Daniela Franco, Letícia Zocollaro, Elmeson Ferreira, Juliana Barreiro, Marina Migliano, Rafael Teixeira, Guta, Gabriela Fonseca, Mayara...

Às minhas amigas, “irmãs”, Milena Oliveira, Juliane Diniz, Ana Carolina de Mira Geraldo e Larissa Parazzi por estarem em todos os momentos ao meu lado, fornecendo-me conselhos e forças. Fazendo com que esta etapa se tornasse mais branda. Obrigada pelo incessante carinho, esforço, dedicação, respeito, atenção, ajuda, alegria e, principalmente, amor!

Ao meu grande amigo, Roney Ramos, pela competência, amadurecimento profissional, amizade, sinceridade, atenção, apoio, carinho e honestidade;

À todos os estudantes estagiários e de iniciação científica: Virgílio Nunes, Thiago Nishimura, Juan Camilo, Fidel, Mayra Aguiar, Letícia Pereira, Aline Laila Portes e Guilherme Colares, que, de alguma forma, ajudaram na participação deste processo. Agradeço pelos momentos sérios e descontraídos;

Ao funcionário da Secretaria do VRA, Sr. Clayton Costa pelo apoio e atenção dispensados;

Ao Sr. Ari Luiz de Castro, Sra. Simi Luiza Aflalo Robassini, Sr. Gilson Luiz Alves de Godoy e Sr. Everson de Jesus Lázaro, funcionários do Laboratório de Bromatologia do

Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ-USP, pela amizade, atenção, alegria e fundamental colaboração na realização das análises laboratoriais;

Aos funcionários do Departamento de Reprodução Animal: Sr. José Maria, João, Márcio, Cleiton, pela atenção, ajuda e alegria de todos os dias;

Aos funcionários do estábulo leiteiro da USP- Pirassununga, Srs: José Antônio Coelho, Antônio Carlos Baladore, Edilson José da Silva, João Paulo Pagotti, José Antônio da Costa, José Antônio da Silva, Luis Tadeu de Oliveira, Carlos Alberto Schimmit e Valmir Donizetti Botteon, pela amizade, dedicação, profissionalismo e atenção dispensada;

Aos funcionários do setor de gado de Corte: Ismael, Paulinho, Ricardo e Macarrão, pelo profissionalismo, bom humor e conduta na estação de monta;

À secretária da pós-graduação, Sra. Harumi, pelo profissionalismo, atenção e apoio;

À querida bibliotecária Elza Soares, pela paciência, dedicação e eficiência;

Às queridas moças da faxina, Elaine, Sandra e Alexandra pelo bom humor diário, amizade e carinho;

Aos porteiros, pela alegria, convivência, amizade e respeito;

Meu sincero, muito obrigada!

RESUMO

NAVES, J. R. **Perfil lipídico do plasma de vacas leiteiras segundo abordagem “ômica” e sua relação com desempenho reprodutivo.** [Lipid profile in plasma of dairy cows second approach "omics" and its relationship to reproductive performance]. 2015. 110f. Tese (Doutorado em ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

O objetivo deste estudo foi analisar o plasma sanguíneo correspondente ao período de transição, de vacas Holandesas de alta produção e sua relação com o desempenho reprodutivo. Para isso, este plasma foi analisado com emprego do equipamento de espectrômetro de massas híbrido triplo quadrupolo/tempo-de-vôo, para identificação dos Lipídios. As alterações metabólicas e hormonais ocorridas durante esta fase, nas vacas leiteiras, afetam diretamente a saúde e o desempenho produtivo e reprodutivo das mesmas. Nesse período, ocorre o balanço energético negativo, caracterizado pelo aumento da mobilização de reservas energéticas, normalmente do tecido adiposo, para atender às demandas voltadas à produção de leite. Neste projeto, propõe-se o estudo da condição metabólica, principalmente sob um contexto lipidômico, durante o período de transição e início de lactação de vacas leiteiras em dois grupos de produção (Alta: $\geq 45,9$ kg leite/dia e Média: 30-45,8kg leite/dia), nos períodos de Inverno e Verão que se tornaram prenhes ou não aos 150 dias de experimento (após 3 IATF), em um contexto multidisciplinar, visando o melhor entendimento, tanto do desempenho produtivo, como do reprodutivo e na elaboração de estratégias de manejo, para aplicação nos rebanhos leiteiros no Brasil. Foram utilizadas 31 vacas da raça Holandesa, multíparas e gestantes, com parto previsto para 21 dias após o início do período de avaliação experimental. Os animais foram avaliados durante o período pré-parto até 150 dias de lactação. Nas amostras foram analisadas variáveis plasmáticas, conhecidamente ligadas às condições metabólicas (energética, proteica e enzimática). Estes valores serão utilizados como guias na utilização da abordagem *ômica* (lipidômica), com finalidade de identificar biomarcadores lipídicos descritivos do metabolismo destes animais. Todos os dados obtidos foram analisados por métodos estatísticos convencionais e por estatística multivariada, utilizando técnicas como PCA (Principal Component Analysis) e OPLS (Orthogonal Projection on Latent Structures) e ferramentas de bioinformática, a fim de identificar quais metabólitos são mais descritivos do metabolismo destes animais, bem como a interação das diferentes vias metabólicas. Conclui-se que ao final do período de transição, o plasma de vacas pós-parto que contenham maiores quantidades de fosfatidilcolinas, principalmente 36:2 e 36:4, podem obter melhores chances de se tornarem prenhes à 11ATF. Estas fosfatidilcolinas podem ser consideradas como bons

biomarcadores lipídicos devido à sua interferência com a maior síntese de lipoproteínas VLDL, evitando assim, a ocorrência de fígado gorduroso, característico desse período. Além disso, estas moléculas podem auxiliar no processo de monitoramento de alguns parâmetros metabólicos alterados, normalmente observados durante o balanço energético negativo.

Palavras-chave: Espectrometria de Massas. Lipidômica. Período de transição. Plasma sanguíneo. Vacas Holandesas.

ABSTRACT

NAVES, J. R. **Lipid profile in plasma of dairy cows second approach "omics" and its relationship to reproductive performance.** [Perfil lipídico do plasma de vacas leiteiras segundo abordagem "ômica" e sua relação com desempenho reprodutivo]. 2015. 110f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

The aim of this study was to analyze the corresponding blood plasma in transitional period of Holstein cows with high production and its relation to the reproductive performance. Therefore, this plasma was analyzed with the use of a triple quadrupole mass spectrometer time-of-flight, for identification of lipids. In dairy cows, the metabolic and hormonal changes during this phase, directly affect the health and productive and reproductive performance. In this period, the negative energy balance is characterized by increased mobilization of energy reserves, usually by fat, due the demands on milk production. In this project, we proposed the study of metabolic condition, especially under a lipidomic context, during the transition period and early lactation dairy cows on two milk productions (High: ≥ 45.9 kg milk/day and Medium: 30 -45,8kg milk/day) during the periods, winter and summer, of cows that became pregnant or not in the 150 days of the experiment (after 3 IATF), in a multidisciplinary context, for get better understand the both productions performances, the reproductive and developing management strategies for application in dairy herds in Brazil. They used 31 Holstein cows, multiparous and pregnant, with calving expected to 21 days after the beginning of the experimental evaluation period. The animals were evaluated during ante partum period to 150 days of lactation. Samples were analyzed by parameters, known to be linked to metabolic conditions (energy, protein and enzyme). These values will be used as guides in a omic approach (lipidomics), with the purpose of identifying biomarkers describe lipid metabolism of these animals. All data were analyzed by conventional statistical methods and multivariate statistics, using techniques such as PCA (Principal Component Analysis) and OPLS (Orthogonal Projection on Latent Structures) and bioinformatics tools to identify which metabolites are more descriptive of the metabolism of these animals as well as the interaction of different metabolic pathways. It can be concluded that the end of the transition period, the plasma post-partum cows containing larger amounts of phosphatidylcholines, especially 36:2 and 36:4, may best chance of becoming pregnant in 1IATF. These phosphatidylcholines may be considered a good lipid biomarkers interfering with the highest synthesis of VLDL, thereby avoiding the occurrence of fatty liver characteristic of that period. Therefore, these

molecules can be used for monitoring the process of change of some metabolic parameters normally observed during negative energy balance.

Keywords: Mass Spectrometry. Lipidomics. Transition period. Blood plasma. Holstein Cows.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Apresentação em diagrama que exemplifica os mecanismos que influenciam a qualidade de oócitos e embriões através do BEN e nutrição.....	25
Figura 2 - Caracterização do protocolo de IATF e dos manejos reprodutivos subsequentes (ressincronizações)	60
Figura 3 - Distribuição esquemática das amostras individuais do experimento	62
Figura 4 - Diagrama de íons totais representativo de aquisição MS (azul) com aquisição dependente MS/MS (vermelho).....	73

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Levantamento de resultados de estudos sobre a qualidade dos oócitos de vacas de alta produção leiteira.....	23
Quadro 2 - Parâmetros bioquímicos plasmáticos de vacas leiteiras sadias durante o período de transição e/ou início de lactação	33
Quadro 3 - No gráfico abaixo são mostradas as proporções para os diferentes volumes de amostra:.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da ração total no período de transição e início de lactação.....	57
Tabela 2 - Proporção de ingredientes e composição nutricional da ração oferecida durante o período de transição e início de lactação	58
Tabela 3 - Parâmetros nutricionais da ração durante o período de transição (D-21±3 a D21±3) e no início de lactação (depois do período de transição até D150±3).....	59
Tabela 4 - Coeficiente de correlação de Pearson e valores de p significativos ($p < 0,05$) entre as principais Fosfatidilcolinas analisadas pela Lipidômica, PC 36:2 e PC 34:2, em relação às principais variáveis metabólicas selecionadas pelo processo stepwise.....	80

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - OPLS com prenhez como variável Y com dados da lipidômica e metabólitos (Q2: 0,62)	74
Gráfico 2 - OPLS com prenhez como variável Y com dados da lipidômica e metabólitos (Q2: 0,62)	75
Gráfico 3 - OPLS (Q2: 0,62)	76
Gráfico 4 - OPLS com prenhez como variável Y com apenas dados da lipidômica (Q2:0,76)	77
Gráfico 5 - OPLS com prenhez como variável Y com apenas dados lipídicos (Q2:0,76)	78
Gráfico 6 - Gráfico 6 -VIP (Q2:0,76)	78
Gráfico 7 - OPLS com prenhez como variável Y com apenas dados da lipidômica (Q2:0,76)	79
Gráfico 8 - OPLS com Período como variável Y com apenas dados da lipidômica (Q2:-0,234).....	80
Gráfico 9 - OPLS com Grupo de produtividade como variável Y com apenas dados da lipidômica (Q2:-0,157).....	81
Gráfico 10 - OPLS com Prenhez e Grupo de produtividade como variáveis Y, apenas dados da lipidômica (Q2: 0,525)	82
Gráfico 11 - OPLS com Prenhez e Grupo de produtividade como variáveis Y, apenas dados da lipidômica (Q2: 0,525)	83
Gráfico 12 - VIP (Q2: 0,525).....	84
Gráfico 13 - OPLS com Prenhez e Período como variáveis Y, apenas dados da lipidômica (Q2: 0,367)	85
Gráfico 14 - OPLS com Prenhez e Período como variáveis Y, apenas dados da lipidômica (Q2: 0,367)	86

LISTA DE ABREVIATURAS

Balanço Energético Negativo (BEN)
Inseminação Artificial (IA)
Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1)
LH (Hormônio Luteinizante)
P4 (Progesterona)
Estrogênio (E2)
FD (Folículo Dominante)
Consumo de Matéria Seca (CMS)
Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF)
Inseminação Artificial (IA)
Nitrogênio Ureico No Plasma (NUP)
Hormônio De Crescimento (GH)
Cromatografia Gasosa (GC)
Cromatografia líquida (LC)
Espectrometria de massas (MS)
Triacilgliceróis (TG)
Aspartato Aminotransferase (AST)
Gama-Glutamiltransferase (GGT)
Creatina Fosfoquinase (CK)
Proteínas Totais (PT)
Albumina (ALB)
Creatinina (CREAT)
 β -hidróxibutirato (BHB)
Ácido Graxo Não-Esterificado (AGNE)
Triacilglicerol (TG)
Nitrogênio Ureico no Sangue (NUS)
Fecundação In Vitro (FIV)
Magnésio (Mg),
Potássio (K),
Fósforo (P)
Zinco (Zn)

Prostaglandina F2 α (PGF2 α)
Hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH)
Fosfatidilcolina (PC)
Fosfatidiletanolamina (PE)
Hormônio do crescimento (GH)
Ácidos graxos poliinsaturados (PUFA)
Leptina (LEP)
Glicerofosfocolina (PC)
Relação massa/carga (m/z)
Espectrometria De Massas Em Tandem (MS/MS),
Ressonância Magnética Nuclear (RMN)
Ionização por electropulverização (ESI).
Intramuscular (IM)
Cromatografia Líquida De Alta Eficiência (HPLC)
Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC)
Dinucleotídeo De Adenina Nicotinamida (NADH)
Clorofórmio (CHCl₃)
Metanol (MeOH)
OPLS (Orthogonal Projections on Latent Structures)
Lipoproteínas De Baixa Densidade (LDL)
Lipoproteínas De Alta Densidade (HDL)
Lipoproteínas De Muito Baixa Densidade (VLDL)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	HIPÓTESE E OBJETIVOS	22
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
3.1	FATORES INTRÍNSECOS E EXTRÍNSECOS DO AMBIENTE INTRAFOCULAR SOB A QUALIDADE DO OÓCITO.....	23
3.2	EFEITOS ADVERSOS DO BEN NA QUALIDADE DO OÓCITO	26
3.2.1	LIGAÇÃO ENDÓCRINA ENTRE O BEN E A QUALIDADE DO OÓCITO	26
3.2.2	LIGAÇÃO METABÓLICA ENTRE O BEN, QUALIDADE E OVULAÇÃO DO OÓCITO	29
4	BEN E METABOLISMO LIPÍDICO (VLDL E FOSFATIDILCOLINA)	37
5	LIPÍDIOS	42
5.1	INTRODUÇÃO.....	42
5.2	LIPÍDIOS - CLASSIFICAÇÃO E METABOLISMO	42
5.3	CONCEITOS E CAMPOS DE ESTUDO LIPIDÔMICOS	44
6	ÔMICS	47
6.1	MÉTODOS DE ANÁLISE DOS LIPÍDIOS	50
6.2	ATUAÇÃO DA LIPIDÔMICA EM HUMANOS	53
7	MATERIAL E MÉTODOS	55
7.1	CARACTERIZAÇÃO DOS ANIMAIS E MANEJO NUTRICIONAL.....	55
7.2	MANEJO REPRODUTIVO	60
7.3	COLETA DE AMOSTRAS	61
7.4	ESQUEMA DE DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS INDIVIDUAIS.....	62
7.5	ANÁLISES DOS METABÓLITOS PLASMÁTICOS	62
7.5.1	AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO HEPÁTICA.....	63
7.5.2	AVALIAÇÃO DO LIPIDOGRAMA.....	65
7.5.3	DETERMINAÇÃO DOS TEORES PLASMÁTICOS DE GLICOSE	68
7.5.4	AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL	68
7.6	ANÁLISES ÔMICS.....	70
7.6.1	PROTOCOLO UTILIZADO PARA O PREPARO DAS AMOSTRAS.....	70
7.6.2	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	73
8	RESULTADOS	74
9	DISCUSSÃO	87
10	CONCLUSÃO	91
	REFERÊNCIAS	92

1 INTRODUÇÃO

Falhas reprodutivas em vacas de leite de alta produção constituem um problema multifatorial. Essa patogênese reprodutiva de subfertilidade é complexa e, em especial, envolve interações entre o balanço energético negativo (BEN) no início do pós-parto e o eixo que compreende o hipotálamo, hipófise, ovário e útero. Este assunto vem sendo pesquisado minuciosamente cada vez mais (DUCKER, 1985; LUCY et al., 2001; BUTLER, 2003). O distúrbio na resposta endócrina lidera o retardo no recomeço da ciclicidade ovariana pós-parto, que tem sido reconhecida como o maior fator de falha reprodutiva em vacas leiteiras (OPSOMER, 1998), relatando um desapontamento com as baixas taxas de concepção destes animais (BOUQUET et al., 2004).

Nos sistemas atuais, a alta capacidade de produção destes animais tem afetado o desempenho reprodutivo em grandes rebanhos (LUCY, 2001). Nestes, a média da taxa de concepção encontra-se entre 35% e 40%, em vacas multíparas, 51% em primíparas e maior do que 65% em novilhas, demonstrando a necessidade de revisão das exigências dos atuais sistemas de produção, quanto aos aspectos como fertilidade e eficiência reprodutiva (BUTLER, 2004).

Nos últimos 50 anos, as taxas de prenhez por inseminação artificial (IA) em vacas leiteiras diminuíram significativamente (BUTLER; SMITH, 1989; STEVENSON et al., 2008). O aumento da demanda por nutrientes, que ocorre durante a lactação e os consequentes transtornos metabólicos estão associados ao BEN durante o início da lactação. Estes mecanismos, em parte, explicam a baixa fertilidade que vem ocorrendo nestes animais (BEAM; BUTLER, 1999; BUTLER, 2000).

O período de transição é caracterizado pelas transformações e adaptações no metabolismo de lipídios, carboidratos e proteínas, no intuito de compensar as altas exigências nutritivas, que ocorrem no período de lactação. O BEN se inicia poucos dias antes do parto e se agrava no pós-parto (ALVES, 2009). Com isso, nesta fase, podem ser realizadas análises sanguíneas destes animais na intenção de identificar vias metabólicas que estejam relacionadas com a energia, proteínas e minerais, bem como a funcionalidade de determinados órgãos. Neste contexto, permite-se prever ou identificar possíveis afecções ou desajustes metabólicos que possam interferir na próxima fertilização da vaca.

Neste contexto e segundo Dirksen e Breitner (1993), os componentes bioquímicos sanguíneos ainda são os mais comumente utilizados e representam um papel significativo na determinação do perfil metabólico, pois representam um estudo macro das principais vias metabólicas do organismo, das quais a glicose, o colesterol, o ácido graxo não esterificado (AGNE), o β -hidroxibutirato (BHB) representam o metabolismo energético; a ureia, as globulinas, a albumina, o nitrogênio ureico, creatinina e as proteínas totais representam o metabolismo proteico. Adicionalmente são estudados metabólitos indicadores do funcionamento hepático, tais como as enzimas Aspartato Aminotransferase (AST), Gama-Glutamiltransferase (GGT) e CK, bem como o colesterol total e suas frações LDL, VLDL e HDL, representando um lipidograma completo (BARROS, 2001). Por isso, variações dos metabólitos sanguíneos, em vacas leiteiras, permitem estimar o processo de adaptação metabólica às novas situações fisiológicas.

Os lipídios possuem importante papel em várias vias metabólicas, compõem componentes estruturais das membranas celulares, como os complexos proteicos, tais como os canais iônicos, os receptores, e diversos complexos incorporados (BARRERA et al., 2013). Além disso, exercem funções de substratos, produtos e cofatores de reações bioquímicas dentro da célula. Atentando-se a isso, esta pesquisa tem por finalidade, dentro de um contexto multidisciplinar, determiná-los de acordo com as interferências de variáveis reprodutivas de um rebanho leiteiro, a fim de obter uma visão mais ampla de seus efeitos sejam eles diretos e/ou indiretos.

O modo como os lipídios participam de várias reações bioquímicas, integrando as diferentes vias metabólicas, pressupõem-se que qualquer alteração nestes afetará os outros metabólitos, que estão direta ou indiretamente ligados. Isto faz com que o tecido celular responda rapidamente a qualquer alteração ambiental ou genética (VILLAS-BOAS; GOMBERT, 2006). O objetivo do presente estudo é encontrar, na lipidômica, uma ferramenta onde a complexidade do metabolismo lipídico e suas funções elucidem, retrospectivamente, a condição de vacas leiteiras, que se tornaram prenhes na 1ª IATF (Inseminação Artificial em Tempo Fixo), ou permaneceram não prenhes após 3 IATF, ou seja, não conceberam nos primeiros 150 dias do período de serviço, levando-se em consideração a produtividade (Alta e Média), e o período do ano (Inverno e Verão). Com este estudo, espera-se que, com a utilização da bioinformática e sob uma visão moderna e tecnológica, seja possível determinar e classificar lipídios relacionados às eficiências reprodutiva e metabólica.

2 HIPÓTESE E OBJETIVOS

A presente proposta tem como hipótese central que, em função da estação do ano, o perfil lipidômico do plasma sanguíneo de vacas leiteiras pode ser usado como um marcador de fertilidade destes animais.

Para testar esta hipótese o presente projeto tem os seguintes objetivos: (i) comparar a lipidômica do plasma sanguíneo de vacas leiteiras no D21 pós-parto do grupo de alta ($\geq 45,9$ kg leite/dia) e média (30-45,8kg leite/dia) produções, que se tornaram prenhes na 1ª IATF, ou permaneceram não prenhes após 3 IATF, ou seja, não conceberam nos primeiros 150 dias do período de serviço, (ii) avaliar o efeito da estação do ano (inverno e verão) na relação entre o perfil lipidômico das vacas e o sucesso gestacional destes animais, (iii) identificar biomarcadores lipídicos como diferencial de animais que conceberam ou não à primeira IATF, ou, que permaneceram vazias após a terceira IATF e (iv) avaliar o comportamento destes biomarcadores em diferentes períodos do ano (inverno e verão) e correlacionar seus teores com a produção de leite (grupo de alta e média).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 FATORES INTRÍNSECOS E EXTRÍNSECOS DO AMBIENTE INTRAFOLICULAR SOB A QUALIDADE DO OÓCITO

Estudos confirmam que gametas femininos e embriões de vacas leiteiras são constantemente desafiados devido aos sistemas produtivos de alta exigência (LEROY, 2005). Snijders et al. (2000) estudaram o desenvolvimento da competência *in vitro* de oócitos de vacas de leite, com alto e moderado mérito genético, para produção de leite. Observaram que oócitos de vacas de alto mérito genético resultavam em baixo rendimento blastocístico *in vitro*, independentemente da produção de leite. Isso sugere que há efeitos adversos à seleção genética, aplicada para produção de leite e fertilidade desses animais (Quadro 1).

Quadro 1 - Levantamento de resultados de estudos sobre a qualidade dos oócitos de vacas de alta produção leiteira

Autor	Redução da qualidade dos oócitos (Sim/não)	Achado
Kruip et al. (1995)	Sim	Devido ao prolongado BEN o desenvolvimento da capacidade oocitária é reduzido quando comparado com vacas controle entre 80 e 120 dias pós-parto
Kendrick et al. (1999)	Sim	Declínio da morfologia oocitária após 30 dias pós-parto
Gwazdauskas et al. (2000)	Sim	Maior qualidade da morfologia do oócito no dia 28 em comparação ao dia 117 pós-parto
Snijders et al. (2000)	Sim	Vacas com alto mérito genético para produção leite comparadas a vacas com baixo mérito
Wiltbank et al. (2001)	Sim	Vacas lactantes possuem pior morfologia do que vacas não lactantes
Walters et al. (2002b)	Sim	Declínio morfológico a partir dos 70 dias pós-parto
Argov et al. (2004)	Não	Sem diferenças morfológicas na qualidade e desenvolvimento oocitário entre os dias 73 e 263 pós-parto

Wiltbank et al. (2001) demonstraram que vacas não lactantes possuem maior qualidade oocitária, quando comparadas a vacas lactantes. Sartori et al. (2002), em estudos com embriões de 5 dias à 2 e 3 meses pós-parto, também evidenciaram que vacas não lactantes possuem melhores embriões quanto ao quesito qualidade, quando comparadas a vacas lactantes ou novilhas. Além disso, este estudo evidenciou que há uma maior proporção de embriões não viáveis em vacas lactantes do que em vacas não lactantes. No entanto, estes mesmos autores ressaltam a necessidade de se obter uma visão geral da qualidade média destes embriões em vacas de alta lactação. Nestes estudos, observou-se que a baixa qualidade dos oócitos e embriões é minimamente responsável pela redução geral da fertilidade destes animais e, especificamente, pela baixa concepção e alta prevalência de morte embrionária precoce. Assim, baixa qualidade dos oócitos e um subsequente mau desenvolvimento embrionário são resultados, tanto de um comprometido no desenvolvimento folicular, quanto do ambiente intrafolicular. Adicionado a isso, interrupções no microambiente do oviduto e útero também podem auxiliar na inferioridade da qualidade do embrião (LEROY, 2005). Portanto, além das condições intrafoliculares que são determinantes para a qualidade do oócito. Podem-se citar também o aparecimento morfológico das células do *Cumulus* e Ooplasma, conteúdo lipídico, presença de genes transcritos e marcadores apoptóticos (LEROY, 2005).

Similarmente, muitos parâmetros invasivos e até não invasivos (como os morfológicos, o número de células, desenvolvimento cinético, presença de apoptose, anomalias genéticas) têm sido descritos com a finalidade de avaliar a qualidade do embrião (revisão de VAN SOOM et al., 2003). Com isso, essa qualidade acaba sendo predominantemente determinada mais pelo ambiente de cultura do que pela origem do embrião (LONERGAN, et al., 2001; KNIJN et al., 2002). Assim, o ambiente uterino e o oviduto pós-fertilização possuem um grande impacto na qualidade embrionária (WRENZYCKI et al., 2000; RIZOS et al., 2002).

Nestes ambientes, tanto o oócito quanto o embrião de vacas de alta produção leiteira estão altamente vulneráveis devido à diversidade e vulnerabilidade. Segundo a hipótese de Britt (1992), a competência de desenvolvimento do oócito e a capacidade esteroidogênica do folículo de vacas de alta produção de leite são determinados durante um grande período (de até 80 dias) do crescimento folicular antes da ovulação. Assim, folículos primordiais expostos a diversas condições associadas a um período de desafio metabólico como o BEN no início do pós-parto serão menos capazes de produzir quantidades adequadas de estrógeno e P4 (BRITT,

1992; ROTH et al., 2001). Adicionado a isso, esses folículos são condenados a conter oócitos que serão ovulados em torno de 60 a 80 dias pós-parto e, havendo a formação de um embrião, este microambiente do oviduto ao útero poderá ser hostil ao desenvolvimento embrionário (BOLAND et al., 2001; MCEVOY et al., 2001, KENNY et al., 2002b). Conclusivamente à ideia de Britt (1992) e de acordo com os estudos aqui citados, tanto oócitos quanto embriões de vacas de alta produção leiteira estão atualmente e rotineiramente sendo desafiados por diversas vias metabólicas.

Portanto, a competência no desenvolvimento de oócitos e embriões, em vacas modernas de alta lactação, estão vinculados a inúmeros fatores, como exemplificados na figura 1. Neste esquema, são demonstradas as alterações do BEN pré-parto, juntamente com as alterações metabólicas que podem afetar a saúde do folículo primordial, transferindo efeitos adversos ao oócito e à qualidade deste folículo. Aspectos como a nutrição desencadeiam uma variação metabólica e endócrina que acaba por afetar a produção de esteroides no fluido folicular, a qualidade do oócito e, posteriormente do embrião, e secreções do endométrio. Além disso, vacas de alta produção possuem alto metabolismo hepático de P4 devido à alta ingestão de alimentos e, portanto, pode ocasionar uma baixa concentração de P4 circulante com uma possível falha na concepção no oviduto ou mortalidade embrionária precoce.

Figura 1 - Apresentação em diagrama que exemplifica os mecanismos que influenciam a qualidade de oócitos e embriões através do BEN e nutrição

Sabendo-se da importância fisiológica do metabolismo lipídico e sua influência direta e indireta na reprodução e levando-se em consideração o modelo hipotético de Britt (1992)

quanto à importância do BEN no período de transição e sua influência com a qualidade oocitária, surge o presente estudo que possui como proposta central que, em função da estação do ano, o perfil lipídico do plasma sanguíneo de vacas leiteiras de alta produção pode ser usado como um marcador de fertilidade destes animais, a fim de explicar marcadores que possam conter informações elucidativas quanto às alterações reprodutivas, de vacas que passaram por um maior ou menor período de BEN, principalmente no pós-parto.

3.2 EFEITOS ADVERSOS DO BEN NA QUALIDADE DO OÓCITO

3.2.1 Ligação endócrina entre o BEN e a qualidade do oócito

A foliculogênese é um complexo sintonizado e fino de sinais endócrinos e parácrinos que possuem papéis importantes (WEBB et al., 2004). A capacidade de desenvolvimento do oócito está intrinsecamente ligada à fase de crescimento e desenvolvimento do folículo (BILODEAU-GOESSELS; PANICH, 2002). É altamente aceitável o fato de que o BEN conjuntamente à perda de peso dificulta o funcionamento do eixo hipotálamo-pituitária-ovariano (BEAM; BUTLER, 1997; LUCY, 2000; LUCY, 2003; WENN et al., et al., 2004).

Este problema, primeiramente, resulta em uma baixa concentração de insulina e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), aumento do hormônio de crescimento (GH) e provavelmente uma diminuição do hormônio Leptina. Estes hormônios são as principais vias do sistema endócrino e através do qual o crescimento folicular pode ter dificuldades em vacas de alta lactação, sendo elas: diretas, causando uma sensibilidade das gonadotrofinas no ovário e, indiretamente, através de baixas concentrações de LH e de sua pulsatilidade (LUCY, 2003; WENN et al., 2004).

Em segundo lugar, como relatado inicialmente, vacas lactantes possuem diferenças, principalmente hormonais, quando comparadas a novilhas não lactantes. Estas primeiras possuem menores concentrações de Estrogênio (E2) que as últimas, fazendo com que as vacas lactantes possuam um prolongamento da fase de crescimento dos folículos a fim de ser capaz de disparar uma adequada frequência de pulso e pico de LH (LOPEZ et al., 2004; SARTORI

et al., 2004). Além da redução na produção de E2, há também o aumento do metabolismo deste hormônio devido às altas exigências nutricionais destes animais, devido à fase que se encontram, ocasionando uma menor concentração estrogênica pré-ovulatória em vacas lactantes em relação a novilhas não lactantes (SANGSRITAVONG et al., 2002). Todo esse processo pode explicar o prolongamento da fase de crescimento folicular e, conseqüentemente, um atraso da ovulação ou mesmo uma anovulação no caso de vacas de alta produção leiteira (LUCY, 2003). Segundo este mesmo autor, em experimentos com folículos persistentes observou-se que os mesmos continham oócitos inferiores devido a uma maturação nuclear prematura. Contrariamente, Vos et al. (1996) em experimento sob as mesmas condições não encontrou efeito após 16 horas de atraso do pico de LH no desenvolvimento *in vivo* na maturidade de oócitos.

Estudos vêm sendo realizados para assegurar que desordens endócrinas e/ou metabólicas, durante o início do pós-parto de vacas, podem causar problemas no desenvolvimento e qualidade dos oócitos. Como citado acima, esta primeira investigação foi criada a partir, principalmente, da hipótese de Britt (1992) e, depois, Reis et al. (2002) que sugerem este estudo ao longo de todo o período de transição e, conseqüentemente, levando-se em consideração a ocorrência do BEN, característico do período. Curiosamente e adicionado a esse contexto, segundo Beker et al. (2002) e Beker-Van Woudenberg et al. (2004), o fato fisiológico natural do decréscimo de E2 com o pico de LH na pré-ovulação e o aumento da P4 subsequente podem auxiliar na dificuldade da correta maturação nuclear afetando a formação do fuso e organização microtubular do oócito.

Vacas de alta lactação possuem baixas concentrações de P4 depois das primeiras ovulações pós-parto devido à baixa atividade do CL associado ao período de BEN (SARTORI et al., 2004). Associado a isso, possuem metabolismo hepático acelerado devido a dietas específicas deste período com altos níveis nutricionais (VASCONCELOS et al., 2003). O papel da P4 é bastante importante já que logo após as 18 horas do pico de LH já constitui quase 90% do conteúdo esteroide intrafolicular (SILVA; KNIGHT, 2000). Com isso, a adequada secreção de P4 pelas células da granulosa garantem uma ótima maturação e desenvolvimento pós-ovulatório, tornando-se crucial para o correto *down-regulation* das junções *gaps* das células da granulosa no isolamento das células do *Cumulus* e redução das concentrações de Estrógeno no oócito, abaixo do limiar, para manutenção da contínua divisão meiótica (McEVOY et al., 1995).

A mobilização de gordura devido ao BEN resulta em pequenos incrementos nos teores de P4 (RABBIE et al., 2002). Ainda não se sabem as consequências da concentração suprabasal desse hormônio presente na maturação oocitária. No entanto, é sabido que tanto em novilhas (BAGE, 2003) quanto em vacas em lactação (WALDMANN, 2001) tem sido observado uma concentração basal deste hormônio acima de 0,5 nmol/L no momento da inseminação artificial (IA) o que resulta em uma baixa taxa de concepção.

Um dos maiores efeitos colaterais do BEN é o rompimento da correta frequência e amplitude da pulsatilidade do hormônio Luteinizante (LH) o que ajuda a prolongar o intervalo de ovulação no período periparto (LUCY, 2003; WEBB et al., 2004). A correta pulsatilidade desse hormônio está intrinsecamente ligado ao crescimento e maturação do oócito. Já o pico de LH é extremamente importante para o recomeço e progressão meiótica da Metáfase I para a Metáfase II que assegurará a competência no desenvolvimento pré-ovulatório do oócito (RIZOS et al., 2002; HUMBLLOT et al., 2005). Uma vez que os receptores de LH não estejam adequadamente presentes nos folículos é possível que seja desencadeada sua maturação com origem nas células vizinhas do *Cumulus*. Já o correto estabelecimento do pico de LH provocará uma mudança na produção de esteroides pelas células da granulosa a partir do E2 para um ambiente Progestogênico necessário para a retomada da Meiose (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005).

Além do LH, outros hormônios também são representativos nesse processo entre BEN e qualidade de oócitos, no entanto, ainda há uma grande necessidade de mais estudos aprofundados sobre a total interferência de cada um desses no processo como um todo. Assim, pode-se citar: a Leptina, um peptídeo secretado pela gordura que age direta ou indiretamente sobre a via de inibição do neuropeptídeo Y e que sinalizará o estado nutricional do corpo. Concentrações desse hormônio são inversamente correlacionadas com a extensão e duração do BEN em vacas de alta produção leiteira (BLOCK et al., 2001; LIEFERS et al., 2003) e, possivelmente, podem afetar a qualidade e desenvolvimento do embrião. Durante este crítico período, também, as concentrações de insulina diminuem nesses animais, principalmente no pós-parto. Ele não é o principal hormônio responsável pela adequada resposta folicular às gonadotrofinas, assim como o crescimento dos mesmos, mas possui efeito estimulatório direto sobre os oócitos (BUTLER; SMITH, 1989). Contrariamente às concentrações de insulina, o GH neste mesmo período e nestes mesmos animais apresenta-se elevado (KRUIP; KEMP, 1999; TRIPP et al., 2000), mas ainda há necessidade de maiores esclarecimentos quanto a este aumento e a ligação compensatória deste hormônio em relação

ao status energético negativo deste período e sua promoção em relação à maturação dos oócitos (LEROY, 2005).

Já o IGF-1, possui papel de status corpóreo energético para um desenvolvimento normal folicular (BEAM; BUTLER, 1997; VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Baseado em estudos *in vitro*, atribui-se a este hormônio o efeito estimulatório da maturação oocitária (IZADYAR et al., 1997; PAWSHE et al., 1998) e a promoção da qualidade e formação do embrião (SIRISATHIEN; BRACKETT, 2003).

3.2.2 Ligação metabólica entre o BEN, qualidade e ovulação do oócito

Muitos transtornos metabólicos, que ocorrem no ciclo de produção das vacas leiteiras, são mais frequentes no período de transição e início da lactação. O período de transição compreende as três últimas semanas da gestação e as três primeiras semanas de lactação (GRUMMER, 1995; DRACKLEY, 1999). Durante o BEN e o início da lactação, caracterizada como sendo os primeiros 90 a 120 dias de lactação pós-parto, ocorrem mudanças na demanda de nutrientes, sendo necessárias coordenadas alterações no metabolismo animal, como no fígado, tecido adiposo, músculo esquelético e na secreção e ação de muitos hormônios envolvidos (HEAD; GULAY, 2001), para atender às exigências de manutenção, lactação e reprodução (BELL, 1995).

O BEN começa poucos dias antes do parto, agravando-se no pós-parto, alcançando seu máximo ponto negativo (*nadir*) cerca de duas semanas após o parto (BELL, 1995). A intensidade do BEN nestas últimas 3 semanas, juntamente com seu *nadir*, possuem alta correlação com o intervalo à primeira ovulação (BUTLER, 2001).

Os últimos dias de gestação coincidem com a formação do colostro, aumento da demanda da glândula mamária por glicose, aminoácidos, ácidos graxos, minerais e vitaminas (ALVES, 2009). Segundo estudos de Bell (1995), a glândula mamária exige três vezes mais energia do que o útero.

No pós-parto, entre cinco e sete dias, o desenvolvimento de uma onda folicular irá acontecer independentemente do BEN comum deste período. Com isso, Butler (2003) relatou que o início de uma onda folicular e a formação de um folículo dominante (FD) durante o

BEN não parecem limitar a primeira ovulação. No entanto, o FD da primeira onda folicular pós-parto pode sofrer ovulação (entre 16 e 20 dias pós-parto), falha com uma consequente nova onda ou formação de um cisto folicular (BEAM; BUTLER, 1997). A ocorrência de um FD não ovulatório ou de folículos císticos aumenta o intervalo do parto à primeira ovulação para 40 a 50 dias pós-parto. Este impedimento da ocorrência de ovulação está altamente correlacionado com a baixa disponibilidade de energia durante o BEN que não somente suprime a secreção pulsátil de LH, mas também reduz a responsividade ovariana ao LH (BUTLER, 2001).

Cada vez mais se tem dado atenção à questão do BEN nas mudanças endócrinas do soro de vacas de alta lactação e sua interferência folicular, especialmente quanto ao crescimento e a saúde geral desses animais nesta fase. Alguns estudos apontam o BEN associado à concentração de Glicose, β HBA e o AGNE com a qualidade dos oócitos (LEROY, 2005).

Folículos quiescentes exibem uma descontínua e unilaminar parede devido a múltiplas lacunas que promove um isolamento parcial do oócito com o estroma circundante resultando em um contato quase que direto do oócito com o sangue (ZAMBONI, 1974). Nesta fase, muitos metabólitos que atingem o folículo acabam tendo acesso ao oócito.

Além dos efeitos indiretos da hipocalcemia em vacas leiteiras modernas no início do pós-parto (seja pela influência da secreção de LH ou pela baixa resposta às Gonadotrofinas pelo ovário), pode ser hipotetizado que a baixa concentração de glicose consiga afetar a qualidade do oócito diretamente (LEROY, 2005). Com isso, Landau et al. (2000), demonstrou que as concentrações de glicose no fluído folicular são influenciados pela *status* nutricional. Nas células do *Cumulus*, a glicose primeiramente é convertida pela via glicolítica em piruvato e lactato tendo o oócito a preferência por substratos compatíveis para síntese de ATP. Por outro lado, a glicose é predominantemente metabolizada pela via Fosfato-Pentose para síntese de DNA e RNA, portanto, sendo ainda mais importante que a via Glicolítica já que este último envolve no progresso meiótico e, assim, a capacidade de desenvolvimento do oócito (SUTTON et al., 2003). Experimentos *in vitro* com adição de glicose em meios de maturação melhoraram os processos de expansão do *Cumulus*, a maturação nuclear, a clivagem embrionária e o desenvolvimento blastocístico (KRISHER; BAVISTER, 1998; SUTTON-McDOWALL et al., 2004). Concluindo-se que suprimentos de glicose possuem compromisso com a capacidade de desenvolvimento dos oócitos (LEROY, 2005).

Vacas expostas a prolongados períodos de BEN, têm uma diminuição de até 2 vezes a probabilidade de ficar prenhes à primeira IA (WALSH et al., 2007). Um dos fatores que explica este fato é que os oócitos, em meios plasmáticos com elevados teores de AGNE podem ter sua taxa de fertilização prejudicada (BRITT, 1992; WEBB et al., 2008).

No início da lactação, os teores plasmáticos de glicose em vacas saudáveis, estão por volta de 3,63 mmol/L (GONZÁLEZ et al., 1996; MATURANA FILHO 2009; CERRI et al., 2009). A redução destes valores associado às baixas concentrações de insulina e P4, e teores elevados de AGNE e β -hidroxibutirato (BHB), alteram a pulsatilidade de LH (BUTLER, 2004; BUTLER et al., 2004), o que pode alterar o desenvolvimento folicular e a qualidade dos oócitos.

Durante o período de transição, as exigências energéticas são maiores e podem provocar a mobilização de grandes quantidades de ácidos graxos do tecido adiposo, podendo acarretar um aumento substancial na concentração plasmática de AGNE (DRACKLEY, 1999; HERDT, 2000; MATURANA FILHO, 2009), o que pode provocar a redução da gliconeogênese hepática (EMERY et al., 1992; GRUMMER, 1993; OVERTON et al., 1999). Além disso, neste processo há formação de corpos cetônicos, que quando acima de 15 mg/dL, configuram um quadro clínico de cetose, principalmente quando coincidem com teores plasmáticos de triacilgliceróis <10,6 mg/dL, redução da glicemia (<45 mg/dL) (GONZÁLEZ, 2000; LEBLANC et al., 2005; DUFFIELD et al., 2009) e consequentes alterações nas concentrações plasmáticas de insulina.

No verão, o CMS é reduzido tornando o BEN mais evidente no período de transição, o que proporciona teores plasmáticos de AGNE superiores a 0,8 mmol/L, segundo LeBlanc et al. (2005). A prolongação deste quadro, segundo este mesmo autor, predispõe distúrbios como deslocamento de abomaso e retenção de placenta. Vacas leiteiras, que desenvolvem estes ou outros problemas metabólicos ou reprodutivos, reduzem ainda mais o CMS o que agrava o estado de saúde do animal.

Normalmente a suficiente concentração de E2 produzido pelos folículos é capaz de desencadear a onda pré-ovulatória de LH e, consequentemente, acarretar na ovulação que, segundo Butler (2003), parece estar correlacionado com a disponibilidade de insulina e IGF-1 circulantes, sendo que vacas que se apresentem em BEN possuem baixas concentrações desses dois hormônios. O IGF-1, especificamente, no fluido folicular reflete a sua concentração sistêmica. Este hormônio, segundo Wathes et al. (2007), juntamente com as

concentrações de insulina desencadeiam a proliferação das células foliculares e a esteroidogênese. Butler et al. (2006) verificaram que as vacas que ovularam o primeiro FD da primeira onda folicular pós-parto apresentaram balanço energético mais positivo na primeira semana pré-parto, balanço energético menos negativo nos primeiros 30 dias pós-parto, maior CMS, maior concentração de estradiol, insulina e IGF-1 e menor concentração de AGNE no plasma.

A secreção de insulina é regulada pela disponibilidade de energia, que é capaz de minimizar a lipólise, influenciando positivamente no consumo de matéria seca (CMS), no início da lactação (DOEPEL et al., 2002; MATURANA FILHO, 2009). Aumento do CMS influencia positivamente a função hepática, a produção de leite e a função ovariana (BEAM; BUTLER, 1997; STAPLES et al., 1998; GWAZDAUSKAS et al., 2000; STAPLES et al., 2001). Esse hormônio é bastante importante na adaptação do metabolismo de vacas leiteiras durante o período de transição. Há uma redução na concentração plasmática de insulina durante o período seco, permanecendo baixa durante as primeiras semanas do pós-parto (MOORBY et al., 2000). Esta redução no pós-parto associada à resistência a este hormônio nos tecidos adiposo e muscular inibe a captação e a utilização de glicose por estes tecidos (BELL, 1995).

Neste período ainda, nos momentos de maior demanda metabólica, há um aumento de marcadores de estresse oxidativo, que ocasionam modificações progressivas nos mecanismos fisiológicos normais, para permitir que o indivíduo responda ao agente estressor. No verão, o estresse oxidativo pode ser mais severo e causar danos maiores ao DNA e às membranas dos oócitos e dos espermatozóides (BRITT, 1992; NICHI, 2003).

Embora seja um mecanismo de proteção, a produção de radicais livres, causa inúmeras alterações morfofuncionais no organismo da vaca leiteira, como a atividade imunológica, podendo ocasionar maior susceptibilidade a doenças e comprometer o desempenho reprodutivo.

O organismo possui sistemas de defesa antioxidante, que podem ser classificados em primários e secundários. As defesas primárias são constituídas pelas enzimas catalase, superóxido desmutase (SOD) e glutathione peroxidase, que atuam na prevenção e na inativação das espécies reativas de oxigênio (EROS), antes destas oxidarem os lipídios. A defesa secundária é constituída pela vitamina E, que atua no reparo e eliminação desses danos (RIVERA et al., 2002; PEETERS et al., 2005).

Devida à escassez de dados bibliográficos referentes às concentrações de SOD em vacas leiteiras em período de transição, Maturana Filho (2013) em delineamento experimental idêntico ao apresentado nesse trabalho, verificou as associações entre variáveis plasmáticas ligadas ao metabolismo energético, proteico, hepático e renal. Neste estudo, verificou-se que entre os dias 7 e 104 pós-parto as concentrações de SOD das vacas de alta produção, nos períodos de Inverno e Verão, apresentaram-se altas quando comparadas às vacas de média produção, nestes mesmos períodos.

Segundo González et al. (2000), os teores plasmáticos de colesterol correspondem à 30% do total de lipídios no plasma. A mensuração deles pode indicar alterações hepáticas e nutricionais. Junto a estes, os teores plasmáticos de ureia, albumina e creatinina podem ser usados para determinar o balanço proteico da dieta, como descrito no quadro 2, por alguns autores. Conforme observado abaixo, a ampla variação apresentada pode ser devida à função do manejo nutricional, do estágio de lactação, do estado metabólico e da produção leiteira (MATURANA FILHO, 2009; GONZÁLEZ et al., 2001).

Quadro 2 - Parâmetros bioquímicos plasmáticos de vacas leiteiras sadias durante o período de transição e/ou início de lactação

Autor	Parâmetro					
González et al. (1996); González e Rocha, (1998); Maturana Filho, (2009)	<u>Colesterol Total (mg/ dL)</u>					
	106 e 152					
	<table> <tr> <th><u>HDL (mg/ dL)</u></th> <th><u>LDL (mg/ dL)</u></th> <th><u>VLDL (mg/ dL)</u></th> </tr> <tr> <td>47 à 90</td> <td>112 à 150</td> <td>6 à 11</td> </tr> </table>	<u>HDL (mg/ dL)</u>	<u>LDL (mg/ dL)</u>	<u>VLDL (mg/ dL)</u>	47 à 90	112 à 150
<u>HDL (mg/ dL)</u>	<u>LDL (mg/ dL)</u>	<u>VLDL (mg/ dL)</u>				
47 à 90	112 à 150	6 à 11				
Maturana Filho, (2009); Cerri et al. (2009)	<u>Albumina (g/L)</u>					
González et al. (1996) (início de lactação)	49,3 ± 10,5					
González e Rocha, (1998); Maturana Filho, (2009) (início de lactação)	<u>Ureia (mg/dl)</u>					
	25 e 57					

Os teores de ureia e nitrogênio ureico no plasma (NUP) e no leite podem indicar intensa mobilização energética, adaptação ao estresse e são afetados pela nutrição, sendo um indicador sensível, direto e imediato da ingestão de proteína (GONZÁLEZ et al., 2001). Altas concentrações de NUP estão associadas à diminuição da fertilidade em vacas leiteiras, por alterar os teores de ureia, Mg, K, P e Zn e o pH uterino. Teores acima de 57 mg/dl de NUP

podem resultar em um aumento de até 15% na porcentagem de oócitos não fertilizados em vacas leiteiras (BUTLER et al., 1996; BUTLER 2000).

No conjunto, as alterações do balanço energético, do metabolismo de proteínas e dos processos de reação ao estresse térmico, têm sido correlacionadas com a significativa diminuição do desempenho reprodutivo de vacas leiteiras. A prevalência de anestro ao final do período voluntário de espera pode variar de 20 a 38%, com alta incidência de cistos foliculares. Vacas com produção acima de 40 kg/dia apresentam redução de até 6,7 horas na duração do estro e uma taxa de até 50% de duplas ovulações, ocasionando até 20% de partos gemelares (WILTBANK et al., 2004).

Na medida em que aumentam as demandas de nutrientes para síntese de leite, as funções reprodutivas podem ser diminuídas, quando uma ingestão compensatória não é conseguida (SANTOS, 2005), levando à diminuição dos teores de glicose, insulina e IGF-I e ao aumento de AGNE e BHB. Isso afeta a viabilidade dos oócitos e a taxa de fertilização (BRITT, 1992; WEBB et al., 2008).

A IATF é uma importante ferramenta utilizada no manejo reprodutivo de rebanhos leiteiros, visando elevar as taxas de serviço e de concepção (MOREIRA et al., 2001; WILTBANK et al., 2004).

O protocolo ovsynch tem sido muito utilizado em programas de IATF, em rebanhos leiteiros em todo o mundo, levando a taxas de prenhez em torno de 40 a 45% (MOREIRA et al., 2001).

Vacas leiteiras em lactação necessitam de um aporte de P4, que pode ser feito pela utilização de dispositivos intravaginais, que são capazes de induzir até 75% de ciclicidade (WILTBANK et al., 2004).

Altas concentrações plasmáticas de P4 após a primeira injeção de GnRH e no momento da aplicação de PGF2 α , têm aumentado em até 21,2% as taxas de prenhez no protocolo Ovsynch. Essa condição pode ser alcançada pela utilização da pré-sincronização, para que o protocolo se inicie no final do diestro ou início do metaestro (MOREIRA et al., 2001).

O número de variáveis potencialmente mensuráveis, para determinação do perfil metabólico e hormonal em vacas leiteiras é grande, entretanto, uma das maiores dificuldades

da utilização desta ferramenta é sua interpretação correta, devido à falta de valores nacionais adequados de referência (GONZÁLEZ, 1997; GONZÁLEZ et al., 2000).

A composição bioquímica e hormonal do plasma reflete a situação metabólica dos animais, transtornos no funcionamento de órgãos, adaptação do animal diante de desafios nutricionais, fisiológicos e desequilíbrios metabólicos (DUFFIELD et al., 2009). Esta ferramenta, aliada ao exame clínico, apresenta grande utilidade no diagnóstico de casos clínicos não bem evidenciados, que podem ocasionar prejuízos no desempenho produtivo e reprodutivo dos rebanhos leiteiros (GONZÁLEZ, 1997; GONZÁLEZ et al., 2000; CERRI et al., 2009).

Há, portanto, uma grande necessidade de se determinarem os valores de referência, as causas de variação e a relação entre os efeitos destas variações, no comprometimento do desempenho produtivo e reprodutivo (BUTLER, 2004; MATURANA FILHO, 2009; GONZÁLEZ et al., 2000), principalmente em vacas em período de transição.

Para realização destas análises bioquímicas são, muitas vezes, utilizados equipamentos onerosos, com boa eficiência, mas com baixa especificidade quanto a uma possível determinação molecular. Estas técnicas comumente utilizadas baseiam-se em um método de análise quantitativa que compara a cor produzida de uma reação química com uma cor padrão. De acordo com a intensidade desta cor produzida, infere-se a concentração da substância que se quer analisar. O método mais seguro para verificar a coloração de uma reação é através do uso do espectrofotômetro, que compara a intensidade de cor com uma cor padrão. É o procedimento mais usado em análises laboratoriais de bioquímica clínica, como é o caso do método enzimático colorimétrico de ponto final (NAOUM, 2013), sendo a leitura realizada em analisador automático de bioquímica sanguínea como, por exemplo, o Equipamento de bioquímica RX Daytona utilizado nas análises bioquímicas deste experimento.

Por isso, quando se necessita analisar pequenos metabólitos moleculares de sistemas biológicos, a metabolômica fornece respostas mais precisas e consistentes para esse tipo de caracterização. Este estudo pode fornecer uma visão geral do estado metabólico e a presença de possíveis eventos bioquímicos globais associados a um sistema celular ou biológico. Este tipo de pesquisa vem auxiliando setores como a academia, indústria e órgãos governamentais, com mais de 500 artigos sendo publicados ao longo de um ano sobre esse assunto (ZERHOUNI, 2003).

O estudo do metaboloma, conjunto de metabólitos, juntamente com outros estudos nas áreas "ômicas" possibilita identificar alterações nas vias em que se encontram envolvidas, analisar os estados fisiológicos e patológicos e fornecer possíveis recursos para cada caso. O conceito de Biologia de Sistemas une campos como a transcriptômica, proteômica, lipidômica e metabolômica e continua a evoluir a um ritmo acelerado. A evolução da informática, análise de fluxo e modelagem bioquímica vem trazer uma nova dimensão ao campo da metabolômica. Com isso, torna-se capaz a identificação de possíveis perturbações genéticas ou ambientais em um evento bioquímico específico (ZERHOUNI, 2003).

A Metabolômica visa permitir a detecção e progressão de doenças, monitorar a resposta à terapia, estratificar pacientes com base em perfis bioquímicos e destacar mais precisamente possíveis alvos na administração de drogas. Este campo metabolômico baseia-se em uma riqueza de informações bioquímicas que foi criado ao longo de muitos anos (ZERHOUNI, 2003).

4 BEN E METABOLISMO LIPÍDICO (VLDL E FOSFATIDILCOLINA)

Os ajustes metabólicos observados no período de transição envolvem, principalmente, o fígado, o músculo esquelético e o tecido adiposo. Neste último órgão, observa-se grande mobilização de triglicerídeos. Durante os períodos de BEN, os ácidos graxos (AG) são a principal fonte de energia para a maioria dos tecidos. Estes AG são armazenados no tecido adiposo como Triacilgliceróis (TG) (VERNON, 2005). A mobilização das reservas de gordura ocorre por meio de TG em tecido adiposo, em que AGNE e glicerol são produzidos.

A adaptação ao BEN inclui a supressão de lipogênese, aumento da lipólise no tecido adiposo, a gluconeogênese no fígado, devido à diminuição da utilização de glicose no tecido periférico (DRACKLEY et al., 2001). Mesmo antes do parto, AG são mobilizados a partir de tecido adiposo (GERLOFF et al., 1986). Os AGNE liberados através da lipólise são transportados no sangue por ligação à albumina e são absorvidos pelo fígado e outros tecidos. A captação hepática é regulada pela concentração de AGNE no sangue e o fluxo de sangue para o fígado (EMERY et al., 1992).

A concentração de AGNE aumenta demasiadamente devido a taxa de lipólise ser maior que a de lipogênese, e estarão disponibilizados para uso na glândula mamária, fígado e outros órgãos. Durante este processo, o fígado acaba por captar grande quantidade de AGNE, que pode ser completamente oxidados para produção de energia, incompletamente oxidados a corpos cetônicos, esterificados com o glicerol e armazenados como TG ou exportados como lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) (ALVES et al., 2009).

No fígado dos ruminantes, estas lipoproteínas existem em quantidades limitantes fazendo com que os TG sejam mais facilmente depositados neste órgão devido à intensa mobilização lipídica (DRACKLEY, 1999). Segundo Gruffat (1996) e Drackley (2001), esta baixa síntese e secreção hepática de VLDL parece estar relacionada com a pequena concentração de Apolipoproteínas (Apo B) no sangue e no fígado destes animais.

Além das apolipoproteínas, as fosfatidilcolinas constituem o principal bloco de construção de lipoproteínas no sangue. Estas lipoproteínas, principalmente VLDL, são os principais portadores de TG do fígado a outros órgãos do corpo (HERDT et al., 1988), como também as LDL e HDL. É conhecido, que a concentração de VLDL diminui pós-parto, provavelmente devido ao aumento do catabolismo de VLDL no úbere (MOORE; CHRISTIE,

1979). A condução em massa de gordura ao longo de todo o corpo no início da lactação é emparelhado com um aumento da necessidade de fosfolípidos.

Com isso, foi demonstrado em muitas espécies, utilizando uma grande variedade de abordagens experimentais, que a taxa de exportação de VLDL é altamente relacionada com a taxa de síntese de Fosfatidilcolina (PC) hepática (COLE et al., 2011). Curiosamente, não há evidência de que a síntese de qualquer outro fosfolípido seja necessária para a montagem e a secreção hepática de VLDL. Além disso, a síntese direta de PC a partir de colina dietética resulta na síntese hepática endógena de PC através da metilação de Fosfatidiletanolamina (PE) (GRUMMER, 2012).

Além disso, Metionina e Colina podem ser utilizados como doadores de grupo metil. Grupos metils do aminoácido Metionina podem ser utilizados para a síntese endógena de PC a partir de PE. Inclusive, metionina protegida tem sido sugerida como uma possível alternativa em vez de colina protegida para a suplementação de vacas leiteiras no período de transição. Portanto, existe uma base conceitual para a substituição da metionina para colina. Além disso, como um aminoácido, metionina é necessária para a síntese de apolipoproteínas (GRUMMER, 2012).

Fosfatidilcolina hepática ocorre por duas vias distintas. Cerca de 70% da fosfatidilcolina hepática é sintetizada pela via de CDP-colina. Como substrato inicial, a colina é processada por três enzimas: quinase de colina, CTP: Fosfocolina Citidililtransferase (cytidyltransferase fosfocolina) e Colina fosfato transferase. Estudos anteriores têm demonstrado a importância de fontes de colina para a síntese de fosfatidilcolinas através da via CDP-colina. Em experimento, ratos alimentados por 3 dias com uma dieta deficiente em colina continham fosfatidilcolinas hepáticas 25% mais baixas, no entanto, apresentaram 6,5 vezes mais quantidades de TG em comparação aos ratos suplementados com colina (YAO; VANCE, 1990).

Autores relataram um aumento da síntese de fosfatidilcolinas e VLDL acompanhadas por uma redução da infiltração de lípidos do fígado. Os hepatócitos possuem uma capacidade excepcionalmente alta para converter PE em fosfatidilcolina. Cerca de 30% das fosfatidilcolinas hepática são produzidos pela via metiltransferase fosfatidiletanolamina (PEMT) (COLE et al., 2012). Se o abastecimento de colina é limitante para a síntese de fosfatidilcolina através da via de CDP-colina, a via PEMT aumenta a sua atividade. Além disso, uma grande procura de fosfatidilcolinas ocorre devido à produção e secreção de VLDL,

bem como, a secreção de fosfatidilcolina para a bile estimula a via PEMT (VANCE et al., 2007). Esta via, PEMT, converte PC em PE por três reações sequenciais de metilação sobre a amina. Para cada passo da reação, um S-adenosil-L-metionina (SAME) é utilizado como doador de grupo metil. Jacobs et al. (2013) demonstraram em camundongos que altos e baixos níveis anormais de SAME podem levar a lipidose hepática. No entanto, mais estudos são necessários para estabelecer o potencial de uma suplementação alimentar com SAME na síntese de fosfatidilcolina hepática em ruminantes.

Segundo Imhasly (2015), desde a síntese até exportação de VLDL nos hepatócitos são energia e fonte dependentes, qualquer interrupção no fornecimento dos “blocos de construção” ou de ATP pode levar a uma inibição da síntese de lipoproteínas ou na sua secreção. Se a absorção de AGNE no fígado continua, os TG irão acumular-se no citoplasma. Sob condições fisiológicas normais, o fígado começa a acumular TG semanas antes do parto e atinge um pico em torno de uma semana pós-parto, com um teor de gordura de até 20%. Após o parto, o conteúdo de TG diminui novamente a menos de 5%. A concentração de VLDL e, portanto, de TG no sangue pós-parto são reduzidos no BEN. Após um período de jejum ou durante o período de transição, a concentração de TG em VLDL aumenta na veia hepática. Isto indica que a secreção hepática dos TG fica aumentada, a fim de reduzir o seu teor no fígado.

A diferença entre a absorção de AGNE e o gasto de ATP pelo fígado pode ser importante no desenvolvimento de lipidose hepática (VAZQUEZ-ANÓN et al., 1994). Considerando que a absorção de AGNE pelo fígado é de 140mmol/hora ou 928g/dia e que a oxidação de AGNE para suprir a demanda de energia deste órgão é de 60,8 mmol/hora, Drackley et al. (2001) estimaram que 70,2 mmol/hora ou 525 gramas de AGNE/dia estariam disponíveis para ser esterificados no fígado de vacas leiteiras periparturientes com concentração sanguínea de AGNE de 1000 μ M.

No fígado de vacas no pós-parto, a cetogênese (conversão de AGNE a corpos cetônicos) parece ser uma reação compensatória para poupar a baixa taxa de Glicose e o consumo insuficiente de precursores deste carboidrato que ocorre neste período (DRACKLEY et al., 2001).

Segundo Wathes et al. (2007), aproximadamente 50% das vacas leiteiras desenvolvem cetose subclínica no primeiro mês de lactação. Lipidose hepática e cetose estão relacionadas à ocorrência de outras desordens de saúde, redução no CMS, perda de peso corporal, redução na

produção de leite concomitante ao período de ocorrência da doença e ao longo de toda a lactação, além de produzir reflexos negativos no desempenho reprodutivo (WALLACE et al., 1998). Jorritsma et al. (2000) relataram que o acúmulo hepático de triglicerídeos foi associado ao maior intervalo do parto à primeira ovulação e à redução da fertilidade em vacas leiteiras.

Para atender a alta demanda de glicose requisitada pela glândula mamária no pós-parto inicial, o propionato, os aminoácidos, o glicerol e o lactato passam a ser utilizados na gliconeogênese hepática (DRACKLEY et al., 2001). Portanto, aumenta-se utilização de AGNE e corpos cetônicos como fonte de energia para os tecidos periféricos enquanto se diminui o consumo deste carboidrato por estes tecidos (BAUMAN; CURRIE, 1980). Nos quatorze primeiros dias pós-parto, Bell et al., (1995) notaram uma maior disponibilidade de proteínas circulantes destinadas à gliconeogênese provenientes da mobilização das reservas corporais proteicas, principalmente do músculo esquelético.

Durante esse processo, o IGF-1 é secretado pelo fígado em resposta ao GH e exerce *feedback* negativo sobre a secreção de GH pela hipófise. Durante o BEN, a relação entre estes hormônios é alterada devido à redução na expressão de receptores de GH no fígado (LUCY et al. 2001). Como consequência, a concentração sanguínea de IGF-1 é diminuída e a de GH elevada, o que juntamente com a baixa concentração sanguínea de insulina, promove a lipólise no tecido adiposo e a gliconeogênese hepática (WATHES et al., 2007).

Quando as alterações acima referidas ocorrem, o organismo responde com a manifestação do fígado gorduroso, ou comumente conhecido como Lipidose. Isto acontece quando a taxa de síntese de TG no fígado excede a hidrólise de TG, a oxidação AGNE e a secreção de VLDL através TG. O resultado é uma acumulação de marcas no fígado através da qual a função das células do fígado fica afetada pela infiltração de gordura (GRUMMER, 1993; BELL, 1995; VERNON, 2005). Isto demonstra a correlação negativa da capacidade do fígado em exercer a β -oxidação com a concentração de AGNE no plasma e a produção de leite. No entanto, se este resultado é a causa do aumento da concentração de TG no fígado, não é conhecido (GRUM et al., 2002). Além disso, existe evidência de que em vacas com aumento do teor de gordura hepática, a capacidade para a gluconeogênese no fígado e secreção de VLDL ficam reduzidos (GRUMMER, 1993; RUKKWAMSUK et al., 1999b; KUHLE et al., 2009). Estes fatores levam a uma redução da concentração de glicose do sangue, que por sua vez exacerba no BEN e aumenta a mobilização de AGNE (HERDT, 2000).

O aumento da captação de AGNE no fígado resulta no consumo diminuído de ração no animal (EMERY et al., 1992). Simultaneamente, a síntese da ureia fica reduzida em vacas que sofrem de Lipidose, levando a um aumento da concentração amoniacal do sangue (STRANG et al., 1998; ZHU et al., 2000). Este aumento da concentração de amônia inibe a gliconeogênese a partir de propionato e também tem um efeito adverso sobre a reprodução, a imunidade e no sistema nervoso central (DRACKLEY, 1999; OVERTON; WALDRON, 2004).

Uma concentração elevada no sangue de AGNE é acompanhado por um sistema imunitário deficiente, o que torna as vacas susceptíveis à infecção (RUKKWAMSUK et al., 1999a). O comprometimento do sistema imunitário inclui um número reduzido de leucócitos (REID, 1980) e uma diminuição da capacidade de responder a um processo inflamatório (WENSING et al., 1997; BOBE et al., 2004). Outras doenças também levam a uma redução da ingestão de alimentos (RUKKWAMSUK et al., 1999a). As vacas com fígado gorduroso tem fertilidade reduzida (BOBE et al., 2004), e assim, um aumento do teor de TG no fígado que fica associado a um intervalo prolongado desde o nascimento até à primeira ovulação e uma diminuição da taxa de concepção (RUKKWAMSUK et al., 1999a). AGNE no fígado reduzem o apetite e aumentam a síntese de TG. A capacidade para β -oxidação e secreção TG ficam reduzidas, e mais TG são armazenados no fígado, fazendo a síntese de gluconeogênese e ureia reduzidos. Devido ao aumento da concentração de amônia, a gluconeogênese se torna ainda mais inibida. A baixa taxa de gliconeogênese e diminuição do apetite levam a um BEN ainda mais severo.

5 LIPÍDIOS

5.1 INTRODUÇÃO

Os lipídios são metabólitos que desempenham um papel importante em várias vias metabólicas. Eles são os componentes estruturais das membranas celulares, onde estão os complexos proteicos como os canais iônicos, os receptores, e alguns outros importantes complexos (BARRERA et al., 2013), embebidos quer como um substrato, um produto, ou como um co-fator de reações bioquímicas dentro de uma célula.

As análises destes metabólitos são importantes para obter mais informações que possam ser capazes de integrar as funções celulares em nível molecular, e deste modo, poder definir o fenótipo de cada célula ou tecido perante alterações ambientais ou genéticas. Portanto, os lipídios são fundamentais para se definir a função gênica (VANMEER, 2005; VILLAS-BOAS; GOMBERT, 2006). O modo como os lipídios participam das várias reações bioquímicas se integrando às diferentes vias metabólicas, percebe-se que qualquer alteração destes afetará os outros metabólitos que estão direta ou indiretamente ligados. Isto faz com que o tecido celular responda rapidamente a qualquer alteração ambiental ou genética (VILLAS-BOAS; GOMBERT, 2006).

5.2 LIPÍDIOS - CLASSIFICAÇÃO E METABOLISMO

Os lipídios são um grupo heterogêneo de moléculas apolares devido às suas características hidrofóbicas. A *International Lipid Classification* e o *Nomenclature Committee*, conjuntamente com os *Lipids Metabolites* e os *Pathways Strategy Consortium* (LIPID MAPS) definiram oito categorias de lipídios e as dividiram em classes e subclasses. Eles classificaram os lipídios por suas estruturas funcionais e princípios bioquímicos em (a) Ácidos Graxos (AG) e seus conjugados: Octadecanóides, Eicosanóides, Docosanóides, e Álcoois graxos; (b) Glicerolipídios (GL): Mono, Di e Triacilgliceróis; (c) Glicerofosfolipídios (GP): Glicerofosfocolinas, Glicerofosfogliceróis, Glicerofosfoetanolamina, Glicerofosfoglicero

fosfatos, Glicerofosfoserina, Glicerofosfoinositol; (d) Esfingolipídios (SP): Bases Esfingóides, Ceramidas, Fosfoesfingolipídios, Glicosfingolipídios neutros e Glicosfingolipídios ácidos; (e) Lipídios Esteróis (ST): Esteróis; (f) Lipídios Prenol (PR): Isoprenóides; (g) Sacarolipídios (SL): Acrylamínosugars e (h) Polyketide (PK): polyketides lineares (HARKEWICZ; DENNIS, 2011; BRÜGGER, 2014). O número de identificação única de um lipídio pode fornecer informações do tipo: fonte dos dados, categoria, classe, subclasse e os números específicos destas moléculas. O sistema permite o armazenamento e processamento de informações em diferentes unidades biológicas (FAHY et al., 2005; FAHY et al., 2009; YETUKURI et al., 2008; HARKEWICZ; DENNIS, 2011).

Dentre eles, uns dos mais comuns são os ácidos graxos. Eles podem ser saturados, monoinsaturados ou poliinsaturados. Em animais, os ácidos graxos predominantes possuem cadeias de átomos de 16 ou 18 carbonos - o Palmítico e o Esteárico (ácido graxo saturado), e os insaturados: Ácido Oléico ($C18\Delta^9$), Ácido Linoléico ($C18\Delta^{9,12}$) e o ácido linolênico ($C18\Delta^{9,12,15}$). Os dois últimos ácidos são responsáveis pela formação dos ácidos araquidônicos, eicosapentaenóico e docosahexaenóico que são ácidos graxos essenciais aos animais. Os triglicerídeos são a forma mais importante de armazenamento de energia no organismo que consistem em depósitos nos tecidos adiposos e musculares (ROLIM et al., 2015). Além destas características mencionadas, estas moléculas possuem papel ativo nas funções das membranas e podem agir como moléculas mensageiras. Os fosfolipídios, por exemplo, possuem esta função que, entre outras, ajudam a formar a dupla camada que é a estrutura básica de membranas celulares. Os ácidos graxos poliinsaturados são constituintes de uma grande variedade de fosfolipídios e proporcionam várias propriedades importantes, como a fluidez e a flexibilidade das membranas celulares (HARKEWICZ; DENNIS, 2011).

A importância dos lipídios é ampla, pois, envolve o metabolismo do corpo como um todo realizando várias funções no organismo. As espécies moleculares dos lipídios plasmáticos mais importantes, sob o ponto de vista fisiológico e clínico, são os ácidos graxos, triglicerídeos, fosfolipídios e colesterol (SANTANA, 2008). Eles são transportados na corrente sanguínea como macro estruturas moleculares agregados e organizados que são denominadas lipoproteínas (HENRY, 1999; FAHY et al., 2005). A constituição destas lipoproteínas baseia-se em um núcleo lipídico hidrofóbico, que consiste principalmente de ésteres de colesterol e triglicerídeos rodeados por uma camada hidrófila única constituída por fosfolipídios, colesterol e proteínas (EISENBERG; LEVY, 1995; LEE et al., 2003). O transporte de lipídios na circulação sanguínea pode ser conceitualmente dividido em dois

canais principais: o exógeno, que corresponde ao canal transportador de lipídios que vêm da dieta, e o endógeno, que corresponde ao canal de transporte originários dos lipídios do fígado. Além destes, também há o transporte inverso de colesterol que corresponde ao transporte de colesterol dos tecidos extra-hepáticos para o fígado (BROWN et al., 1981; LEE et al., 2003).

No processo de digestão, os enterócitos iniciam a produção das primeiras partículas de quilomicrons. TG, fosfolipídios, éster de colesterol e apolipoproteína B-48 são os principais constituintes dos quilomícrons. Estes realizam o transporte de triglicerídeos re-esterificado no enterócito formando uma mistura de ácidos graxos e monoglicerídeos produzidos a partir de triacilglicerol quando a dieta é hidrolisada pela enzima lipase. Após serem sintetizados estes são secretados em direção ao sistema linfático (HUSSAIN, 2000). Durante a captação hepática, o quilomicon remanescente é decomposto em ácidos graxos, glicerol, aminoácidos e colesterol que podem ser utilizados para produzir os ácidos biliares armazenados na bile ou para integrar as lipoproteínas produzidas e secretadas por hepatócitos. O transporte endógeno começa no fígado através da síntese de VLDL mediada por fatores hormonais e de outros que estão dependentes do equilíbrio energético e metabólico. Após serem lançados na corrente sanguínea, os VLDL entram em contato com outras lipoproteínas, através de colisões, principalmente com a HDL (HAVEL; HAMILTON, 2004).

5.3 CONCEITOS E CAMPOS DE ESTUDO LIPIDÔMICOS

Em ruminantes, o metabolismo lipídico é o principal determinante da fertilidade. Desequilíbrios nesta fisiologia (assim como na homeostase energética sistêmica) podem ocorrer, por exemplo, durante a gestação tardia ou no início da lactação e tornam-se as principais causas de subfertilidade especialmente em vacas de alta produção (THATCHER et al 2011; ROCHE et al., 2013).

Os lipídios são precursores de esteróides sexuais e a suplementação lipídica exerce efeitos positivos sobre as funções reprodutivas de ruminantes em vários tecidos importantes como no hipotálamo, na hipófise anterior, no ovário e útero (FUNSTON 2004; WATERS et al., 2012). Comparando-se os ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) n-6 com o n-3, observou-se que o n-3 apresentou um aumento do número e do tamanho de folículos do ovário, capaz de encurtar o intervalo à primeira ovulação pós-parto, aumentando a taxa de

ovulação e a produção de P4 pelo CL, retardando a luteólise e, conseqüentemente, aumentando-se a duração da gestação e a prevenção do parto prematuro com baixo peso ao nascimento (WATHES et al., 2007; GULLIVER et al., 2012), enquanto que n-6 PUFA demonstrou acelerar a involução uterina pós-parto e interferência da retomada da ciclicidade ovariana (DIRANDEH et al., 2013). Estes efeitos positivos resultam essencialmente no fato de que a relação entre n-6 e n-3 PUFA são precursores das frações eicosanóides divergentes (n-6 PUFA de segunda série e n-3 de terceira série dos eicosanóides), e que o n-3 PUFA limita a biossíntese, bem como os efeitos inflamatórios e luteolíticos, especialmente, os referentes à PGF2 α e o seu produto de oxidação de 8-iso-PGF2 α (OTTO et al., 2014), que é formado sob estresse oxidativo em vacas de alta lactação.

Além disso, os lipídios são parte integrante das membranas dos oócitos e espermatócitos. O aumento da fluidez das membranas ricas em PUFA promove a capacidade de fertilização e o processo de fusão de espermatozóides e oócitos, embora as membranas ricas em PUFA no esperma também têm sido relatadas como sendo altamente susceptíveis a danos oxidativos (WATHES et al., 2007).

Os oócitos armazenam eficientemente os lipídios em gotículas lipídicas celulares que fornecem energia e lipídios para a síntese de membrana durante o desenvolvimento embrionário. A alta qualidade dos oócitos foi correlacionada com a alta quantidade de ácido oléico e linoléico em gotículas lipídicas celulares do que os oócitos de baixa qualidade, e a suplementação com ácido oléico demonstrou beneficiar os depósitos desses lipídios nos oócitos e a sua competência para um bom desenvolvimento (AARDEMA et al., 2011). No entanto, o excesso no acúmulo de lipídios ou a má distribuição de gotículas lipídicas no oócito os tornam vulneráveis ao estresse oxidativo, fazendo com que haja uma disfunção mitocondrial e uma redução na qualidade do embrião e na taxa de sobrevivência (AWASTHI et al., 2010; WATHES et al., 2013)..

As adipocinas derivadas de tecido adiposo, especialmente, a leptina, adiponectina e a resistina afetam significativamente a fertilidade. A leptina, por exemplo, suporta o funcionamento do ovário e do endométrio, interage com a liberação e atividade das gonadotrofinas e estimula a maturação dos oócitos e o desenvolvimento inicial do embrião (CLEMPSON et al., 2011). Giblin et al. (2010) também relataram as associações de polimorfismos de leptina e distocia, duração do tempo de gestação e em relação a mortalidade do bezerro perinatal. A adiponectina foi encontrada no envolvimento com a esteroidogênese das células da granulosa em função de células da teca, na maturação dos oócitos e no

desenvolvimento embrionário (MAILLARD et al., 2010). Segundo Spicer (2011), a resistina inibe a esteroidogênese na indiferenciação das células da granulosa e na mitogênese das células diferenciadas da granulosa.

Por fim, os polimorfismos de muitos genes associados ao metabolismo lipídico que, por exemplo, afetam a homeostase sistêmica lipídica e energética (CBFA2T1, LEP), a lipogênese (DGAT1 e SCD1), a oxidação lipídica (DECR1, CRH), a regulação do apetite (LEP, NPY e CRH) e a composição corporal (LEP, GH) foram encontrados por estarem relacionados às características de fertilidade de vacas leiteiras, embora haja ainda necessidade de se estabelecerem as associações diretas ou indiretas mediadas por seus efeitos sobre o metabolismo lipídico e a energia sistêmica (WATHES et al., 2013).

Assim como os lipídios apresentados acima fazem parte de uma gama de diferentes e importantes funções no organismo, torna-se claro e de forma convincente que as análises lipidômicas dispõem uma percepção aprofundada na compreensão dos mecanismos de várias doenças, identificação de alvos moleculares, que, posteriormente, podem exercer papel fundamental na realização de tratamentos eficazes (HILLER et al., 2014). No entanto, as modernas tecnologias atuais ainda não são capazes de mapear os lipidomas completamente. Novas moléculas lipídicas, adicionando novas funcionalidades para os lipídios naturais, são de grande interesse tecnológico e médico.

Dentre estas novas moléculas destinadas a ser mais profundamente estudado, um grupo torna-se ainda mais relevante para o presente estudo, os glicerofosfolipídios. Estas moléculas tornam-se importantes, principalmente, por serem componentes de muitas membranas celulares, atuarem em locais de ligação para proteínas celulares e extracelulares e também funcionarem como mensageiros secundários envolvidos na proliferação e apoptose (CRONAN, 2003; PERETO et al., 2004). Dependendo do grupo constituinte da cabeça polar sobre o esqueleto de glicerol, os glicerofosfolipídios são agrupados, principalmente, nas seguintes classes: glicerofosfocolina, glicerofosfoetanolamina, glicerofosfoserina, glicerofosfoinositol, glicerofosfoglicerol e cardiolipina. As subclasses são ainda diferenciadas com base nos diferentes substituintes do esqueleto de glicerol.

6 ÔMICS

Segundo Gibney (2005), metabolômica é um meio de determinar um parâmetro biológico, ou impressão digital metabólica, que reflete o equilíbrio de todas essas forças sobre o metabolismo de um indivíduo.

Com isso, a espectrometria de massas (MS) torna-se uma técnica analítica esclarecedora já que é considerada como uma das mais versáteis e sensíveis, valiosa em diversos estudos nas áreas de Biologia, de Ciências Médicas e de Ciências Tecnológicas. Por MS é possível determinar a massa molecular e quantificar biomoléculas, tais como proteínas, carboidratos, lipídios e oligonucleotídeos, e também fragmentá-las, de forma a elucidar sua estrutura e confirmar sua identificação. O potencial de aplicação da MS, em estudos biológicos, tem sido bastante amplo em razão dos avanços observados nos últimos anos nas áreas de genômica, transcriptômica, metabolômica, proteômica, lipidômica e de outras plataformas “omics”, e do desenvolvimento de equipamentos (FENG et al., 2008).

O princípio básico da MS consiste em gerar íons a partir de compostos (orgânicos ou inorgânicos) por meio de um método de ionização apropriado. Após serem gerados, os íons são separados pela relação m/z em um analisador de massas. Um detector conta os íons de interesse, transformando o sinal em corrente elétrica. A magnitude desse sinal elétrico, em função desta relação, é convertida por um processador de dados que gera o espectro de massas correspondente (GROSS, 2004). Análises quantitativas também podem ser realizadas, utilizando-se os padrões comerciais dos compostos a serem analisados, uma vez que o número de íons formados e detectados é proporcional à concentração do analito na amostra.

Espectrômetros de massas são utilizados como verdadeiras “balanças moleculares” para “pesar” moléculas. Após a determinação inicial da massa, íons específicos podem ser selecionados e submetidos a uma fragmentação através de uma cela de colisão. Estes experimentos são conhecidos como “espectrometria de massas em Tandem” (MS/MS), e permitem que características detalhadas da estrutura de moléculas possam ser inferidas a partir da análise das massas dos fragmentos resultantes do íon precursor.

Um espectrômetro de massas pode também, além de separar o íon de um determinado composto, fragmentar esse íon e analisar, separar e quantificar esses fragmentos. Ao fazer isso, o espectrômetro estará identificando (e quantificando, se for o caso) uma transição do

composto precursor para um fragmento. Este experimento é do tipo MS/MS, já que há duas seleções da razão m/z , uma para o precursor e outra para o fragmento.

Um espectrômetro de massas também pode ser acoplado a técnicas cromatográficas como cromatografia líquida de alta e ultra performance (HPLC e UPLC, respectivamente) e cromatografia gasosa (GC). A técnica baseada em LC-MS/MS (cromatografia líquida acoplada à MS/MS) é considerada uma técnica autoconfirmativa, já que um analito, com tempo de retenção característico, pode ser identificado por sua relação m/z , ser fragmentado e ter também seus fragmentos identificados. Sendo assim, esta técnica mostra-se potencialmente vantajosa para o estudo de substâncias como esteroides e muitos metabólitos.

A utilização da espectrometria como ferramenta torna possível o estudo da metabolômica que procura descrever analiticamente amostras biológicas e complexas, além de caracterizar e quantificar muitas micromoléculas de certos compostos. A metabolômica se encaixa adequadamente com a filosofia biológica dos sistemas, pois fornece uma visão integrada da bioquímica nos organismos complexos, ao contrário das técnicas tradicionais que investigam as redes de interações entre genes, proteínas e metabólitos em células individuais. Com isso, ela procura solucionar problemas biológicos de diversos sistemas quanto aos quesitos organização e controle (JEREMY, 2008).

Além disso, este estudo pode ser utilizado como biomarcadores de diagnóstico para eventos biológicos, pois permitem praticidade e utilidade no mundo real como observações médicas relacionadas aos dados de outras tecnologias que são menos diretamente relacionados com o real evento biológico do que em relação ao metabolismo. Outra facilidade, é a aquisição de fluidos biológicos, geralmente urina e/ou sangue, que podem ser recolhidos facilmente. Com isso, podem-se analisar metabólitos em resposta à doença, efeitos de drogas ou de outros estímulos que podem ser detalhadamente e facilmente estudadas (JEREMY, 2008).

Na medicina veterinária, especificamente na área reprodutiva, a lipidômica, tem influenciado muitos estudos, por exemplo, referentes à composição do soro fetal bovino (SFB) por MS. O SFB é um suplemento comumente utilizado para a produção de embrião *in vitro*. Além de riscos sanitários, sabe-se que o SFB influencia a velocidade do desenvolvimento, a expressão gênica e a composição lipídica de embriões (RIZOS et al., 2003; WRENZYCKI et al., 2005). A utilização da MS para caracterização da composição do SFB pode trazer informações importantes sobre o desenvolvimento de um substituto sintético

de SFB, de composição definida e adequada para o uso na produção *in vitro* comercial e acadêmica de embriões de ruminantes. Estudos iniciais proporcionaram dados sobre a composição lipídica do SFB por MALDI-TOF/MS (GARCIA et al., 2009) e sobre a quantificação de estradiol por LC-MS/MS com limite de detecção de 0,08 pg/mL e limite de quantificação de 0,25 pg/mL, em diferentes partidas de SFB, assim como em soro ovino e em soro caprino (MARTINS-JÚNIOR et al., 2009). Estudos futuros serão conduzidos para a quantificação de aminoácidos e de vitaminas.

Outros estudos sobre lipidoma de oócitos e de embriões objetivam analisar a composição dos gametas e embriões de mamíferos. Observou-se que a composição de ácidos graxos influencia a maturação oocitária, a fertilidade e o desenvolvimento embrionário *in vitro* (KHANDOKER; TSUJII, 1999). A técnica de MS tem sido utilizada com sucesso em estudos de lipidoma e da análise de fosfolipídios em membranas celulares, até mesmo de células-tronco (SCHILLER et al., 2004, 2007; FUCHS; SCHILLER, 2008; FUCHS et al., 2008b,c).

Segundo Ferreira et al. (2010), técnica como MALDI-MS demonstrou-se eficaz no estudo da lipidômica quando identificou que lipídios de oócitos e embriões bovinos possuem perfis distintos. A obtenção deste perfil diretamente de um único embrião sem pré-tratamentos proporciona informações do tipo estrutural e individual de oócitos e embriões de forma rápida e direta, eliminando etapas complexas como a extração lipídica.

A diversidade destinada às estruturas lipídicas faz com que suas características permitam que estes compostos executem muitas funções biológicas. Com essa complexidade os desafios se tornam aumentados para se tentar caracterizar, identificar e quantificar essa classe diversa de moléculas (MEIKLE et al., 2009; YETUKURI et al., 2008). Com o início dos estudos ômicos permitiu-se estimular a determinação conceitual do perfil molecular destes lipídios em sistemas biológicos (SEPPÄNEN-LAAKSO; ORESIC, 2009), e o esforço que visa incentivar os cientistas a explorar este campo dentro dos sistemas biológicos tem sido grande e constante (RAPAKA, 2005). Mesmo com o desenvolvimento da ciência *ômica* com suas técnicas estratégicas, o estudo da metabolômica, especialmente lipidômica ainda é muito escasso (GERMAN et al., 2007). Este fato acaba sendo preocupante principalmente devido à importância que os lipídios possuem em relação à manutenção da homeostase, bem como da fisiopatologia de várias doenças. Além disso, a compreensão do complexo sistema de lipídios em sistemas biológicos (juntamente com os avanços nas áreas de genômica, proteômica e metabolômica), poderá permitir uma melhor compreensão dos mecanismos

envolvidos na administração de drogas, bem como proporcionar o conhecimento necessário para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos (RAPAKA, 2005; BEH et al., 2012).

O conceito de lipidômica funcional foi citado pela primeira vez na literatura em 2002, para definir "o estudo dos papéis desempenhados pelas membranas lipídicas" (RILFORS; LINDBLOM, 2002). Gross et al. (2005) completaram: "são as atribuições dos lipídios específicos sobre o funcionamento celular e os mecanismos químicos que carregam completamente as suas funções biológicas". Este ramo de estudos lipídicos tem desempenhado papéis importantes na tentativa de elucidar o desempenho dos lipídios específicos como mensageiros celulares, as possíveis fusões entre a sinalização metabólica e os processos dentro das células (IVANOVA et al., 2009). Estes estudos também implicam a determinação quantitativa de lipídios em espaço e tempo e que, atualmente, pode ser realizado devido à tecnologia voltada para este tipo de verificação (ROLIM et al., 2015) com o aperfeiçoamento da sensibilidade e da resolução da MS e da ascensão de técnicas mais modernas de ionização (HARKEWICZ; DENNIS, 2011). Esta evolução acaba tornando reais análises quantitativas ou semi-quantitativas com um melhor mapeamento lipídico dos sistemas biológicos, concedendo mais informações para os bancos de dados existentes (VAN MEER, 2005), e contribuindo para o desenvolvimento do conhecimento de sua real finalidade.

6.1 MÉTODOS DE ANÁLISE DOS LIPÍDIOS

Antes de se iniciar a análise dos metabólitos é necessário realizar o preparo das amostras, para isso, o metabolismo celular é interrompido, por alterar drasticamente a temperatura ou o pH; chamado de célula têmpera. Este procedimento é necessário, pois os níveis metabólicos variam a uma velocidade bastante rápida, por alterações no ambiente celular como, por exemplo, uma variação do nível de oxigênio dissolvido ou de luz, no caso de organismos fotossintetizantes (VILLAS-BOAS; GOMBERT, 2006; SEPPÄNEN-LAAKSO; ORESIC, 2009). No passo seguinte separa-se a biomassa do ambiente extracelular dos metabólitos intracelulares, de modo que eles se tornem acessíveis para os diferentes métodos de análise. Se o objetivo do estudo são os metabólitos intracelulares, alguns

solventes orgânicos apolares são utilizados a fim de extrair os compostos lipofílicos como o Clorofórmio e Etil Acetato (ROLIM et al., 2015). Como última etapa, baseia-se em concentrar a amostra obtida através de liofilização ou evaporação dos solventes para se obter, em seguida, a amostra (VILAS-BOAS; GOMBERT, 2006; SEPPÄNEN-LAAKSO; ORESIC, 2009).

A retirada das proteínas, ou desproteínização é utilizada para preparar uma amostra para a análise de metabólitos provenientes do sangue. Solventes orgânicos como a Acetonitrila, Acetona, Metanol, Etanol ou Diclorometano são utilizados a fim de remover as proteínas, quebrando as ligações entre os metabólitos e as proteínas em solução (TRIFONOVA et al., 2013).

Vários métodos, além de MS, podem ser utilizados para análise de metabólitos em uma amostra como para a detecção: a ressonância magnética nuclear (RMN) e a ionização por electropulverização (ESI), GC e LC (GIOVANE et al., 2008; VIANI; SOMMER, 2013). MS e RMN são os métodos mais utilizados para a detecção e análise dos metabólitos, principalmente MS para lipídeos que possui alta sensibilidade e seletividade (principalmente quando associada com outros métodos de separação, como a cromatografia), além de possuir característica não destrutiva (GOODACRE et al., 2004; VAN DER GREEF et al., 2004; HAN, 2009; NAVAS-IGLESIAS et al., 2009; BRUGGER, 2014; LI et al., 2014; ROLIM et al., 2015; GIOVANE et al., 2008).

A GC-MS, por muito tempo, foi a técnica de predileção utilizada para análise de lipídios, especialmente devido ao seu alto poder de resolução na identificação de TG, Ácidos graxos e Ésteres. Esta técnica possuía a grande qualidade de não alterar a estrutura molecular das moléculas. A associação desses tipos de métodos é frequentemente utilizada na análise dos subconjuntos de lipídios (FIEHN, 2008; GIOVANE et al., 2008).

Já o LC-MS é frequentemente utilizado para se obter a maior quantidade possível de informações sobre o perfil dos subconjuntos bioquímicos. Ele se revela um instrumento com alta sensibilidade e que pode ser utilizado para caracterizar, identificar e quantificar um grande número de compostos em uma amostra biológica em que a concentração do metabólito pode mostrar uma disposição de informações sobre a fisiopatologia de uma doença (KATAJAMAA ORESIC, 2005; FIEHN, 2008; KADDURAH-DAOUK; KRISHNAN, 2009).

De acordo com Han e Gross (2005), ESI-MS começou a ser amplamente utilizado a partir de uma única amostra, devido a sua rapidez e sensibilidade de identificação e quantificação de centenas de moléculas de lipídios, principalmente, os Glicerofosfolipídios. Estas duas análises são sensíveis quando usadas em extratos totais de lipídios e sua identificação é gerada a partir de fragmentos de íons por espectros de massa (Figura 4).

Muito sobre o perfil lipídico, como sua bioquímica e enzimas, foram obtidos inicialmente entre os anos de 1950 e 1970, em uma época onde a real caracterização detalhada dessas moléculas ainda não era tão conhecida (ROLIM et al., 2015). Atualmente, a Enciclopédia de Kyoto possui banco de dados de Genes e Genomas ainda limitados quanto a representações genéricas das classes dos lipídios; ou seja, eles incluem dados limitados sobre o grupo de lipídios e uma falta de informação sobre as cadeias laterais dos ácidos graxos. Portanto, neste contexto, as novas ferramentas tecnológicas da computação se tornam necessárias a fim de lidar com os dados do perfil lipídico em nível molecular (YETUKURI et al., 2008; ORESIC, 2009). Com isso, o grupo LIPID MAPS (<http://www.lipidmaps.org>) propôs um novo sistema de lipídios criado anteriormente (FAHY et al., 2005; YETUKURI et al., 2008; MEIKLE et al., 2009; HARKEWICZ; DENNIS, 2011). Cada uma dessas classes é suficientemente original e complexa, um pré-requisito que permite um conhecimento especializado para o estudo destes compostos, o que justifica a necessidade de uma abordagem multi-institucional (BYRNES et al., 2007). Uma série de websites (Lipid Biblioteca-<http://lipidlibrary.co.uk>; Lipid Bank-<http://lipidbank.jp>; Cyberlipids-<http://www.cyberlipid.org>; LIPIDAT-www.lipidat.chemistry.ohio-state.edu/home.stm; Lipidomics Expertise de plataforma www.lipidomics-especialização). Estes sites geram informações úteis sobre a estrutura lipídica e suas funções, bem como protocolos detalhados para extrair e separar os lipídios (YETUKURI et al., 2008; NAVAS-IGLESIAS et al., 2009; MEIKLE et al., 2009).

Para o processamento atual dos dados de identificação a partir da LC-MS há softwares disponíveis, como o Analyst® Software, LipidProfiler® eMZmine®. Portanto, estes softwares têm sido utilizados em vários estudos da lipidômica, bem como a ser usado no grupo LipidMaps (KATAJAMAA; ORESIC, 2005; YETUKURI et al., 2008; HARKEWICZ; DENNIS, 2011). Embora o real conhecimento pela identificação dessa diversidade de lipídios estruturalmente complexos continua a ser um desafio, o deciframento de centenas destes metabólitos, ao mesmo tempo, exige novas ferramentas, tais como as matrizes lipídicas e algoritmos computacionais estatísticos. Em breve, o mapeamento estatístico dessas

modificações fornecerá novas perspectivas sobre a dinâmica celular dessas moléculas (YETUKURI et al., 2008).

6.2 ATUAÇÃO DA LIPIDÔMICA EM HUMANOS

Para os lipídios as funções biológicas são compreendidas pelas funções específicas dos lipídios na fisiologia celular e nos mecanismos químicos e moleculares. Os processos anabólicos e catabólicos lipídicos são chaves moleculares integradoras essenciais da homeostase energética. O estudo dos lipídios é importante para entender as mudanças (estruturais e funcionais) em mecanismos biológicos, em estados normais e patológicos, bem como orientar na condução de um melhor tratamento (ROLIM et al., 2015). Os metabólitos são considerados assinaturas diretas de atividade bioquímica, e, conseqüentemente, mais facilmente se correlacionam com o fenótipo. A metabolômica e seu derivado, a lipidômica, fazem parte do arsenal adotado para diagnósticos clínicos, pois elas são consideradas abordagens bastante apropriadas para o efeito e investigam, a fim de elucidar, o mecanismo bioquímico referente ao fenótipo celular (HU et al., 2009 ; PATTI et al., 2012).

Em humanos, já se sabe que os estudos lipidômicos concentraram esforços em entender os diferentes aspectos da síndrome metabólica e da obesidade proporcionando uma compreensão mais profunda das mudanças metabólicas observadas nestas afecções (ROLIM et al., 2015). Nesse aspecto, estes estudos expandiram e puderam servir como uma ferramenta poderosa para o estudo do metabolismo de lipoproteínas (LOIZIDES-MANGOLD, 2013).

A Dislipidemia humana, por exemplo, é uma característica importante, que normalmente precede o aparecimento clínico de uma doença (MEIKLE et al., 2009). A pesquisa sobre metabólitos lipídicos correlaciona o fenótipo ao genótipo. Neste sentido, a nutrigenômica procura caracterizar a obesidade, relacionando-o com a esteatose hepática. Outra área de pesquisa é a relação entre nutrição e envelhecimento, onde as mudanças em ácidos graxos poliinsaturados foram verificadas (NAVAS-IGLESIAS et al., 2009). Além disso, em estudos experimentais, foi identificada a associação entre a peroxidação de ácidos graxos com as alterações nos lipídios de membranas neuronais correlacionados com a senescência. No hipocampo de ratos mais velhos, as proporções de DHA (ácido

docosahexaenóico) na fosfatidilserina e de ácido araquidônico na fosfatidilcolina e no fosfatidilinositol foram maiores do que nos ratos jovens (PÉTURSDÓTTIR et al., 2007).

Também em humanos, foi encontrada na diabetes a presença de ceramidas tóxicas acumuladas nas ilhas pancreáticas, nos músculos esqueléticos e no fígado. Há uma diminuição de fosfolípidios antioxidantes nas ilhas pancreáticas e um perfil distinto de triacilglicerol no fígado (WENK, 2005). A correlação dos lipídios com o envelhecimento, como a prole de meia idade de nonagenários, em comparação com seus cônjuges (controles), mostrou um metabolismo lipídico favorável, marcado por um tamanho de partícula LDL maior em homens, e um total reduzido de triglicérides, em mulheres. Além disso, a longevidade associada ao perfil lipídico foi caracterizada por uma maior proporção de espécies de lipídios monoinsaturados sobre poliinsaturados, sugerindo que a descendência feminina tem um lipidoma plasmático menos propenso ao stress oxidativo. Vários lipídios correlacionados com a longevidade foram associados com um menor risco de hipertensão e diabetes (GONZALEZ-COVARRUBIAS et al., 2013).

7 MATERIAL E MÉTODOS

7.1 CARACTERIZAÇÃO DOS ANIMAIS E MANEJO NUTRICIONAL

As fases 1 (inverno) e 2 (verão) deste experimento foram realizadas em granja leiteira comercial (Fazenda Colorado, rodovia Anhanguera, Km 177,5 município de Araras – SP, CEP 13600-000) com 245 vacas leiteiras, multíparas (entre 2 e 4 lactações), da raça Holandesa, com parto previsto para 21 dias após o início do período de avaliação experimental. O experimento foi realizado entre Maio de 2011 a Junho de 2012. Todas as vacas utilizadas foram monitoradas durante o período de transição e início de lactação até o terceiro serviço (com IA em tempo fixo – IATF e ressincronizações), em pontos de relevância biológica, conforme a figura 2.

Os animais foram distribuídos, de forma retrospectiva, de acordo com a produção média de todas as vacas do experimento, durante o pico de lactação (da 4^a a 8^a semanas). A média geral foi de 45,9 kg leite/dia. Posteriormente, as vacas foram alocadas dentro dos grupos experimentais de Alta Produção ($\geq 45,9$ kg/leite no Pico de lactação) e Média Produção (30-45,8kg/leite no Pico de lactação) para análises da primeira fase do experimento.

As vacas entraram no galpão com ventilação cruzada a partir de 35 dias da data de parto prevista, para adaptação antes do período de avaliação. O início do fornecimento das rações de transição ocorreu no 35º dia, em relação à data prevista de parto, para que as vacas fossem alimentadas com as rações experimentais no mínimo 21 dias antes do parto, na eventualidade de algum parto ser antecipado. Na média, as vacas pariram com cinco dias de antecedência em relação à data prevista, de forma que todas as vacas foram adaptadas ao manejo experimental no mínimo três semanas antes do parto.

As rações foram formuladas de acordo com o NRC (2001) para os períodos pré e pós-parto. A ração de transição foi utilizada durante o período pré-parto até 30 dias pós-parto. Após esse período, os animais foram alocados em outros galpões, de acordo com número de partos, produção e doenças ocorridas no período de transição; entretanto, a ração era a mesma, com a mesma concentração de extrato etéreo, mudando somente a quantidade oferecida, de acordo com o CMS por lote.

Os volumosos utilizados durante todo o período experimental foram silagem de milho e Azevém pré-secado e as rações foram fornecidas duas vezes ao dia, na forma de ração completa, com o concentrado misturado ao volumoso. As respectivas rações e água foram fornecidas *ad libitum* durante todo período experimental. A ração total, a proporção dos ingredientes e o valor nutricional do concentrado são mostrados nas tabelas (1,2 e 3) abaixo.

Diariamente, foram feitas pesagens das quantidades dos volumosos e concentrados fornecidos e das sobras para estimativa do consumo em grupo. Os animais foram arraçoados de acordo com o CMS do grupo no dia anterior, de forma a ser mantido porcentual de sobras das dietas, diariamente, entre 5 e 10% do fornecido para não haver limitação de consumo.

As variáveis utilizadas para a seleção dos animais foram: ordem de partos (2 a 5 partos) e produção de leite na lactação anterior (≥ 7.000 kg). Antes do parto previsto, até 35 dias de lactação, os animais selecionados foram manejados em sistema *freestall*, com ventilação cruzada, e posterior a este período, em sistema *freestall*, sem ventilação cruzada, até o final do experimento. Este manejo foi adotado, para oferecer condições climáticas mais favoráveis, durante esta fase de maior risco de doenças para as vacas.

Tabela 1 - Composição da ração total no período de transição e início de lactação

Ingredientes	Pré Parto		Pós Parto	
	Inverno	Verão	Inverno	Verão
	Kg/MS			
Silagem de Milho 33% MS 43% FDN	7.36	7.28	6.4	6.44
Pre secado ¹ 2 PB 70 FDN 68 MS	1.125	1.4	-	-
Pré secado de Azevém	-	-	3.12	1.575
Caroço de Algodão	0.46	0.46	1.38	1.38
Polpa Cítrica	0.455	0.46	2.276	2.73
Milho grão úmido 68%	0.93	0.93	0.931	2.294
Milho moído 9% FDN	-	-	1.32	-
Farelo de soja 44% PB	2.2	1.76	3.52	3.96
Megalac	-	-	0.098	0.098
Água	-	-	0.01	-
Núcleo Vitamínico ¹	-	-	0.94	1.128
Núcleo Mineral ²	0.285	0.598	0.286	0.285

¹Nutron vitmin - Composição do produto por Kg: Vit. A- 8000UI; vit E – 50000mg; vit D – 2300UI. ²Nutron vitabov - Composição do produto por Kg: Mg-10g; S-9g; Zn-23,750mg; Cu-5625mg; Mn-18125mg; Fe-5,000mg; Co-125mg; I-312mg; Se-144mg; F (max.) 900mg; vit. A- 2000UI; vit E – 12500mg; vit D – 5000UI; MS – Matéria seca; FDN – fibra em detergente neutro; PB – proteína bruta;

Fonte: (MATURANA FILHO, 2013)

Tabela 2 - Proporção de ingredientes e composição nutricional da ração oferecida durante o período de transição e início de lactação

Ingredientes	Pré Parto		Pós Parto	
	Inverno	Verão	Inverno	Verão
	% da MS			
Silagem de Milho 33% MS 43% FDN	57.4	56.5	31.6	32.4
Pre secado 12 PB 70 FDN 68 MS	8.8	10.9	-	-
Pré secado de Azevém	-	-	15.4	7.9
Caroço de Algodão	3.6	3.6	6.8	6.9
Polpa Cítrica	3.6	3.6	11.2	13.7
Milho grão úmido 68%	7.3	7.2	4.6	11.5
Milho moído 9% FDN	-	-	6.5	-
Farelo de soja 44% PB	17.2	13.7	17.4	19.9
Megalac	-	-	0.5	0.5
Água	-	-	0.04	-
Núcleo Vitamínico 1	-	-	4.6	5.7
Núcleo Mineral ²	2.2	4.6	1.4	1.4
	Nutrientes %			
Matéria Seca	43	37	51	48
Matéria orgânica	92.4	92.2	92.8	92.7
Matéria Mineral	7.6	7.8	7.2	7.3
Proteína Bruta	15.3	15.6	17.5	18.3
Extrato etéreo	2.8	2.8	4.4	4.5
FDN	46.9	46.6	35.7	35.7
FDA	29.7	29.5	21.2	21.1

¹Nutron vitmin - Composição do produto por Kg: Vit, A- 8000UI; vit E – 50000mg; vit D – 2300UI. ²Nutron vitabov - Composição do produto por Kg: Mg-10g; S-9g; Zn-23,750mg; Cu-5625mg; Mn-18125mg; Fe-5,000mg; Co-125mg; I-312mg; Se-144mg; F (max.) 900mg; vit, A- 2000UI; vit E – 12500mg; vit D – 5000UI; MS – Matéria seca; FDN – fibra em detergente neutro; FDA – fibra em detergente ácido; PB – proteína bruta;

Fonte: (MATURANA FILHO, 2013)

Tabela 3 - Parâmetros nutricionais da ração durante o período de transição (D-21±3 a D21±3) e no início de lactação (depois do período de transição até D150±3)

Parâmetros Nutricionais	Período de transição		Início de lactação	
	Inverno	Verão	Inverno	Verão
PM Bacteria: (g/dia)	853	820	1255	1229
PM não degradável rúmen: (g/dia)	362	529	1020	997
PM% - Bacteriana: (%)	70.2	60.8	55.2	55.2
Metionina (%PM): (%)	2.2	1.8	1.9	1.9
Lisina (%PM): (%)	7.1	6.1	6.4	6.5
Balanço de N ruminal: (g/dia)	54	42	100	125
Balanço de Peptídeos: (g/dia)	38	29	72	84
NDT: (%MS)	78	75	78	79
EM: (Mcal/kg MS)	2.5	2.4	2.7	2.7
EL: (Mcal/kg MS)	1.6	1.5	1.7	1.75
Elm: (Mcal/kg MS)	1.6	1.55	1.7	1.75
peFDN: (%MS)	30	32	25	24
Forragem na ração: (%MS)	66	67	44	40
Total CNF: %	41	37	39	40
Cálcio: % MS	0.55	0.8	0.8	0.9
Fósforo: % MS	0.4	0.4	0.4	0.5
Magnésio: % MS	0.3	0.4	0.3	0.45
Potássio: % MS	1.2	1.5	1.3	1.5
Sódio: % MS	0.1	0.1	0.2	0.3
Cloro: % MS	0.2	0.9	0.1	0.2
Enxofre: % MS	0.1	0.4	0.1	0.2
Cobalto: PPM	1	1.04	0.9	1.04
Cobre: PPM	17.8	17.6	19.7	21.7
Iodo: PPM	0.4	0.5	0.7	0.8
Manganês: PPM	55.6	46.4	76.7	86.5
Selênio: PPM	0.3	0.3	0.4	0.5
Zinco: PPM	55.6	46.4	81.2	92.1
Vitamina A: UIK/d	143	150	227	243
Vitamina D: UIK/d	41	42	63	68
Vitamina E: UI/d	1853	1993	2308	2391

G – gramas; MS – Matéria seca; FDN – fibra em detergente neutro; FDA – fibra em detergente ácido; PB – proteína bruta; PM – proteína metabolizável; N – nitrogênio; NDT – nutrientes digestíveis totais; EM – energia metabolizável; EL – energia líquida; ELm – energia líquida metabolizável; peFDN – pectina proveniente de FDN; CNF – carboidratos não fibrosos; PPM – partes por milhão; UI – unidades internacionais; UIK – UI por quilo.

Fonte: (MATURANA FILHO, 2013)

7.2 MANEJO REPRODUTIVO

Decorridos 40 ± 3 dias após o parto, foram aplicadas 2 doses de PGF2 α (0,5 mg de cloprostenol sódico; Sincrocio®; Ouro Fino Saúde Animal, Cravinhos, SP Brasil), com intervalo de 14 dias. Onze dias após a segunda aplicação de PGF2 α , foi iniciado o protocolo de IATF, de sorte que todas as vacas receberam o primeiro serviço por volta de 75 ± 3 dias pós-parto. O protocolo empregado está descrito na figura 2:

Figura 2 - Caracterização do protocolo de IATF e dos manejos reprodutivos subsequentes (ressincronizações)

Fonte: (MATURANA FILHO, 2013).

Nota: Diagrama dos protocolos de IATF e ressincronização. D0 – Colocação do dispositivo intravaginal (Sincrogest®, contendo 1 g de P4; Ouro-Fino Saúde Animal) e aplicação IM de GnRH (Sincroforte®, 2 mL, contendo 5 μ g de acetato de buserelina/mL; Ouro-Fino Saúde Animal); D7- retirada do implante e aplicação IM de PGF2 α ; D8 - aplicação IM de benzoato de estradiol (Sincrodiol®, 1 mL, contendo 1 mg de benzoato de estradiol/mL; Ouro-Fino Saúde Animal) D9 IATF, 30 h após a aplicação de benzoato de estradiol. Para as ressincronizações foi adotado o seguinte procedimento: no D26 após a IATF, foi iniciado um novo protocolo de IATF, com a colocação do implante vaginal e aplicação de GnRH. No dia da retirada do implante, as vacas estavam no D33 de uma provável gestação e a aplicação de PGF2 α estará condicionada ao diagnóstico negativo de prenhez, realizado por ultrassonografia, imediatamente após a retirada do implante. Portanto, as vacas detectadas vazias, receberam uma dose de PGF2 α , seguida da aplicação de benzoato de estradiol e 24 horas após foram reinseminadas completando 30 h pós-aplicação de benzoato de estradiol. Este procedimento de ressincronização repetiu-se uma vez mais, de modo que as avaliações do desempenho reprodutivo, para efeito deste estudo, foram realizadas após todas as vacas terem recebido 3 serviços.

Todas as gestações diagnosticadas aos 30 dias foram confirmadas aos 60 dias, para mensurar as perdas de gestação, segundo a produção de leite, estação do ano e variáveis metabólicas e hormonais.

7.3 COLETA DE AMOSTRAS

Nos períodos de Inverno e Verão, a amostra de sangue colhida no D21 após o parto foi considerada como representativa do final do período de transição.

Como período do ano (Inverno e Verão) e produção de leite (Alta e Média) são variáveis independentes do projeto, das 245 vacas do experimento inicial, foram selecionadas 40 vacas que conceberam à primeira IATF (n=20) ou encontravam-se não prenhes, mesmo após a terceira IATF (n=20), segundo período do ano e produção. Assim, 5 vacas pertencentes a cada um dos seguintes fatoriais: Inverno/Verão x Média/Alta lactação x vacas prenhes na 1ª IATF e vacas vazias após a terceira IATF, tiveram a amostra de plasma, colhida no D21 após o parto, submetida à lipidômica, figura 3. Foram escolhidas as vacas que não tiveram distocia grave, nem problemas clínicos pós-parto, entretanto, permitiram-se vacas acometidas por retenção de placenta e metrite de grau leve.

As amostras foram coletadas em tubos tipo Vacutainer de 10 mL, contendo solução anticoagulante (Heparina ou EDTA), por punção dos vasos da veia mamária ou veia/artéria coccígea. Imediatamente após coleta, as amostras foram refrigeradas e centrifugadas à 2000x g, durante 15 minutos, para a separação do plasma. O centrifugado obtido foi transferido para tubetes plásticos, identificados e armazenados à -20°C, até o procedimento das análises laboratoriais.

7.4 ESQUEMA DE DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS INDIVIDUAIS

Figura 3 - Distribuição esquemática das amostras individuais do experimento

Fonte: (NAVES, 2015)

Legenda: Esquema realizado com as 40 amostras individuais sendo 5 amostras de cada grupo constituído pelos seguintes fatores: Inverno/Verão, Média/Alta lactação, vacas prenhes na 1ª IATF e vacas vazias após a terceira IATF.

7.5 ANÁLISES DOS METABÓLITOS PLASMÁTICOS

As análises laboratoriais dos metabólitos plasmáticos (Proteína total, Albumina, GGT, AST, CK, Glicose, Colesterol total, TG, Colesterol HDL, Colesterol LDL, Ureia, Nitrogênio ureico no sangue (NUS), Creatinina, β -hidróxibutirato (BHB), Ácidos graxos não-esterificados (AGNE)) foram realizados no laboratório de Análises Clínicas Veterinárias, FZEA/USP – Pirassununga/SP.

7.5.1 Avaliação da função hepática

7.5.1.1 Determinação dos teores séricos de Proteína total

A determinação dos teores séricos de proteína total foi feita pelo método do biureto, de acordo com a técnica preconizada por Gornall et al. (1949) e modificada por Strufaldi (1987), com leitura da coloração da reação utilizando-se comprimento de onda de 550nm em Analisador Bioquímico Automático da marca Randox Daytona® - Randox Laboratories, Reino Unido utilizando-se kit comercial da marca Randox® referência TP4001. O princípio desta técnica baseia-se na reação entre os tripeptídeos, polipeptídeos e proteínas existentes no soro sanguíneo com íons de cobre presentes no reativo de biureto, em meio alcalino, formando um complexo de coloração violeta, cuja intensidade é diretamente proporcional à concentração de proteína presente na amostra, sendo os resultados expressos em g/L.

7.5.1.2 Determinação dos teores séricos de Albumina

A determinação dos teores séricos de albumina foi feita pelo método do verde de bromocresol em analisador bioquímico automático da marca Randox Daytona® - Randox Laboratories, Reino Unido utilizando-se kit comercial da marca Randox® referência AB3800, de acordo com a técnica preconizada por Doumas et al. (1971), sendo a leitura da coloração da reação realizada utilizando-se comprimento de onda de 630nm. O princípio desta técnica baseia-se na reação entre a albumina, presente na amostra, e o verde de bromocresol, em meio ácido, originando um complexo cuja intensidade de coloração é diretamente proporcional à concentração de albumina presente na amostra e os resultados expressos em g/L.

7.5.1.3 Determinação da atividade sérica da Aspartato-aminotransferase (AST)

A atividade enzimática sérica da AST foi determinada segundo metodologia cinética otimizada em conformidade com o European Comitee for Clinical Laboratory Standards

(ECCLS), em Analisador Bioquímico Automático da marca RX Daytona® - Randox Laboratories, Reino Unido, utilizando-se kit comercial da marca Randox® referência AS3804.

O princípio do método está baseado na ação catalítica da AST sobre o 2-oxoglutarato, originando glutamato e oxalacetato, sendo este último convertido a L-malato pela enzima malato-desidrogenase e, nesta reação acoplada, ocorre simultaneamente, a oxidação de NADH para NAD⁺, ocasionando diminuição na quantidade de NADH e o desenvolvimento de coloração quantificada em 340nm a uma temperatura igual a 25°C, cuja intensidade é diretamente proporcional à atividade de AST presente na amostra (SCHIMID; FOSTNER, 1986) e expressas em U/L.

7.5.1.4 Determinação da atividade sérica da Gama glutamiltransferase (GGT)

A atividade enzimática sérica da GGT foi determinada segundo metodologia cinética otimizada em conformidade com o European Comitee for Clinical Laboratory Standards (ECCLS), em Analisador Bioquímico Automático da marca RX Daytona® - Randox Laboratories, Reino Unido, utilizando-se kit comercial da marca Randox® referência GT3817.

Segundo essa técnica, a enzima gama-glutamiltransferase cataliza a transferência do resíduo gama-glutamil da L-gama-glutamil-3-carboxi-4-nitrobenzoato para glicilglicina e a quantidade de 3-carboxi-4nitroanilina formada na reação é diretamente proporcional à atividade enzimática existente na amostra. Na realização desta prova quantificou-se o aumento da densidade óptica em 405nm, sendo os resultados expressos em U/L e considerando a temperatura de reação para expressão dos valores igual a 25°C.

7.5.1.5 Determinação da atividade sérica da Creatina quinase (CK)

A atividade enzimática sérica da CK foi determinada segundo metodologia cinética otimizada preconizada pelo Deutsche Gesellschaft fur Klinische Chemie, em Analisador Bioquímico Automático da marca RX Daytona® - Randox Laboratories, Reino Unido, utilizando-se kit comercial da marca Randox® referência CK NAC 110.

O princípio do método está baseado na ação catalítica da CK sobre a creatina fosfato e ADP, originando creatina e ATP; durante a ocorrência desta reação outras duas reações ocorrem simultaneamente, dando origem a NADPH que confere cor ao composto, cuja intensidade, determinada utilizando-se comprimento de onda igual a 340nm, é diretamente proporcional a atividade de CK existente na amostra (SCHIMID; FOSTNER, 1986), sendo os resultados expressos em U/L e a temperatura de reação considerada para a expressão deste valor igual a 25°C.

7.5.2 Avaliação do lipidograma

7.5.2.1 Determinação dos teores séricos de Colesterol

A determinação dos teores séricos de colesterol foi quantificada por metodologia enzimática colorimétrica em Analisador Bioquímico Automático da marca RX Daytona® - Randox Laboratories, Reino Unido, utilizando-se kit comercial da marca Randox® referência CH3810, conforme método descrito por Allain et al. (1974).

O princípio do método está baseado na ação das enzimas colesterol-esterase e colesterol-oxidase sobre o colesterol, originando um composto intermediário e água oxigenada. Na presença de peroxidase, a água oxigenada formada na reação anterior, reage com 4-arnino-antipirina e fenol dando origem a um complexo que desenvolve coloração, cuja intensidade medida em comprimento de onda igual a 500nm mantém relação direta com a quantidade de colesterol presente na amostra, sendo os resultados expressos em mmol/L.

7.5.2.2 Determinação dos teores séricos de HDL e LDL

A determinação dos teores séricos de HDL foi realizada através do Analisador Bioquímico Automático da marca RX Daytona® - Randox Laboratories, Reino Unido, utilizando-se kit comercial da marca Randox® referência CH3811. O princípio do método está baseado na eliminação de quilomicrons de VLDL e LDL através do enzima colesterol esterase, colesterol oxidase e posteriormente pelo enzima catalase. Após esta etapa, ocorre a mensuração específica do HDL após a liberação deste por detergentes contidos no kit.

As concentrações de colesterol-LDL e colesterol-VLDL foram determinadas indiretamente, por meio de fórmulas, onde: VLDL colesterol (mg/dl) = (concentração de triglicérides/5) e LDL colesterol (mg/dl) = Colesterol Total - (HDL Colesterol + VLDL Colesterol) (FRIEDEWALD; LEVY; FREDRICKSON, 1972). Sendo os resultados expressos em mmol/L.

7.5.2.3 Determinação dos teores séricos de Triacilgliceróis

A determinação dos teores séricos de triglicérides foi quantificada por metodologia enzimática colorimétrica em Analisador Bioquímico Automático da marca RX Daytona® - Randox Laboratories, Reino Unido, utilizando-se kit comercial da marca Randox® referência TR3823, conforme técnica descrita por Fossati et al. (1982).

O princípio do método está baseado na hidrólise dos triglicérides pela ação da enzima lipase liberando glicerol; a ação da enzima glicerol-quinase e glicerol-fosfato-oxidase sob o glicerol formado na reação anterior, promove a formação de peróxido de hidrogênio e este por sua vez, sofre ação da peroxidase, produzindo quinolaimina que desenvolve coloração, cuja intensidade medida em comprimento de onda igual a 500nm, mantém relação direta com a quantidade de triglicérides presente na amostra, sendo os resultados expressos em mmol/L.

7.5.2.4 Determinação dos teores séricos de Ácidos graxos não-esterificados (AGNE)

A determinação dos teores séricos de AGNE foi quantificada por metodologia enzimática colorimétrica em Analisador Bioquímico Automático da marca RX Daytona® - Randox Laboratories, Reino Unido, utilizando-se kit comercial da marca Randox® referência FA115.

O princípio do método está baseado na ação das enzimas acil-CoA-sintetase na presença de ATP e cofatores sobre os AGNE, originando acil-CoA, AMP e Ppi; a acil-CoA é oxidada dando origem a peróxido de hidrogênio que age favorecendo a reação de N-etil-N-(2hidroxi-3-sulfopropil)-m-tosluidina com 4-aminoantipirina, presentes no reagente, dando origem a um complexo que desenvolve coloração púrpura, cuja intensidade medida em comprimento de onda igual a 550nm mantém relação direta com a quantidade de AGNE presente na amostra, sendo os resultados expressos em mmol/L.

7.5.2.5 Determinação dos teores séricos de β -hidroxibutirato

A determinação dos teores séricos de β HBA foi quantificada por metodologia enzimática colorimétrica em Analisador Bioquímico Automático da marca RX Daytona®- Randox Laboratories, Reino Unido, utilizando-se kit comercial da marca Randox® referência RB 1007.

O princípio do método está baseado na oxidação de D-3-hidroxibutirato em acetoacetato pela enzima desidrogenase 3-Hidroxibutirato. Concomitantemente com esta oxidação o cofator NAD^+ é reduzido a NADH dando origem a coloração, cuja intensidade medida em comprimento de onda igual a 340nm mantém relação direta com a quantidade de β HBA presente na amostra, sendo os resultados expressos em mmol/L.

7.5.3 Determinação dos teores plasmáticos de Glicose

Para a determinação dos teores plasmáticos de glicose foi utilizado o método descrito por Barhan et al. (1972), em Analisador Bioquímico Automático da marca RX Daytona® - Randox Laboratories, Reino Unido, utilizando-se kit comercial da marca Randox® referência GL3815.

O princípio do método está baseado na oxidação da glicose em ácido glicurônico e peróxido de hidrogênio pela enzima glicose-oxidase; na presença de peroxidase o peróxido de hidrogênio, formado na reação anterior, reage com a 4-aminofenazona e com o 2,4-diclofenol, produzindo um corante quinoneiminico de coloração rósea, cuja intensidade mantém relação direta com a quantidade de glicose presente na amostra, sendo a leitura da coloração realizada utilizando comprimento de onda igual a 505nm e os resultados expressos em mmol/L.

7.5.4 Avaliação da função renal

7.5.4.1 Determinação dos teores séricos de Ureia

A determinação dos teores séricos de ureia foi realizada por meio de método cinético enzimático, sendo a leitura da reação obtida pelo analisador bioquímico automático RX Daytona ® - Randox Laboratories, Reino Unido utilizando-se kit comercial da marca Randox® referência UR3825.

A ureia da amostra é hidrolisada pela enzima urease com produção de gás carbônico e íons amônio. Estes são captados por uma segunda enzima, a glutamato desidrogenase, a qual em presença de outros substratos como o NADH₂ e α -cetoglutarato, produz NAD e glutamato. A diminuição da concentração de NADH₂ pode ser medida por espectrofotometria utilizando comprimento de onda igual a 340 nm, sendo sua diminuição proporcional à concentração de uréia na amostra. Os resultados foram expressos em mmol/L.

7.5.4.2 Determinação dos teores de Nitrogênio Ureico no sangue

As concentrações de nitrogênio ureico no plasma foram obtidas através da multiplicação dos valores de ureia pelo fator de 0,466. Os resultados foram expressos em mmol/L.

7.5.4.3 Determinação dos teores séricos de Creatinina

A determinação dos teores séricos de creatinina foi realizada por método colorimétrico e sua intensidade de cor processada pelo Analisador Bioquímico Automático da marca RX Daytona® - Randox Laboratories, Reino Unido, utilizando kit comercial da marca Randox® referência CR3814.

A reação da creatinina em solução alcalina com o picrato, origina um complexo de cor, cuja intensidade, determinada utilizando-se comprimento de onda igual a 340nm, é diretamente proporcional a atividade de creatinina existente na amostra, sendo os resultados expressos em $\mu\text{mol/L}$.

7.5.4.4 Determinação dos teores séricos da enzima superóxido dismutase

Para as amostras que foram destinadas as análises dos teores da enzima superóxido dismutase, preparou-se uma solução de eritrócitos com uma solução tampão. Para isso, centrifugou-se o plasma heparinizado a 4 ° C, 2000 g durante 15 minutos. As hemácias foram separadas em duas alíquotas e o restante da amostra foi descartado juntamente com os leucócitos. Após essa etapa, estas hemácias foram adicionadas aos tubos tampão, homogeneizadas e identificadas. Depois disso, foi centrifugado novamente com solução tampão de plasma e este procedimento foi repetido por mais 2 ou 3 vezes, até que a amostra

não apresentasse mais leucócitos na placa. Estas amostras foram aliquotadas em frascos âmbar e armazenadas em congelador com temperatura Àa - 80 ° C, durante um período máximo de 35 dias.

Para avaliar o perfil oxidativo foram determinadas as concentrações séricas da enzima superóxido dismutase (SOD) com o kit de diagnóstico Randox (SD125 pelo método colorimétrico descrito por Beutler et al. (1963), no Laboratório de Doenças Nutricionais, Departamento de Medicina Clínica FMVZ / USP.

7.6 ANÁLISES ÔMICAS

7.6.1 Protocolo utilizado para o preparo das amostras

As amostras foram levadas para o Laboratório ThoMSon, de Espectrometria de Massas do IQ/Unicamp, para ser realizada a etapa de extração lipídica em solução pela metodologia *Bligh & Dyer*.

7.6.1.1 Extração de lipídios em solução pelo método *Bligh & Dyer*

Para cada 1mL de amostra foram adicionados 3,75 mL de 1:2(v/v) de CHCl_3 :MeOH, agitando-se, em seguida, em Vórtex. No caso de submissão de lipídios para análise CG, este solvente foi incluído ao montante final de padrão interno (por exemplo, 5 µg b-sitosterol). Em seguida foram adicionados 1,25 mL de CHCl_3 com posterior agitação em Vórtex. Finalmente, adicionaram-se 1,25 mL de dH_2O com subsequente agitação em Vórtex. Após estas etapas, foi centrifugado a 1000 rpm em IEC-centrífuga de bancada, durante 5 min, à temperatura ambiente, para se obter um sistema de duas fases (aquosa superior, inferior orgânico).

A recuperação da fase de fundo seguiu-se da seguinte forma: Foi inserida uma pipeta de Pasteur na fase superior gentilmente com pressão positiva suave (como um borbulhamento suave) de modo que a fase superior não entrasse na ponta da pipeta. Quando a ponta da pipeta estava na parte inferior do tubo, retirou-se cuidadosamente a fase inferior por meio da pipeta certificando-se evitar interface ou face superior, tentando-se recuperar aproximadamente 90% da fase inferior e não toda ela.

Quadro 3 - No gráfico abaixo são mostradas as proporções para os diferentes volumes de amostra

Sample	0.2 ml	0.5 ml	1 ml	1.5 ml	2 ml	3.5 ml
1:2 CHCl ₃ :MeOH	0.750	1.9	3.75	5.7	7.5	13.125
CHCl ₃	0.250	0.625	1.25	1.875	2.5	4.375
dH ₂ O	0.250	0.625	1.25	1.875	2.5	4.375
Total volume	1.45	3.65	7.25	10.95	14.50	25.375

Nota: 1:2(v/v) de CHCl₃:MeOH- Proporção em volume (1:2) de Clorofórmio e metanol.

Lavou-se a fase de fundo a fim de se recuperar uma "autêntica fase superior" da seguinte forma:

Em um tubo de vidro grande ou em vários de tamanhos normais, executou-se o procedimento acima em vários tubos usando dH₂O em vez da amostra. Foi transferida a fase superior e armazenada em tubo. Após esta etapa, foi adicionada a sua fase de fundo recuperada da última etapa citada acima (anterior a tabela) para um tubo e, em seguida, adicionada a quantidade adequada (amostra + volume de dH₂O) da "autêntica fase superior." Por exemplo, ao preparar amostras de 1 ml, foram adicionados aproximadamente 2,25 mL da "autêntica fase superior." Por fim, levou-se à agitação em Vórtex e após centrifugação, recolheu-se a fase inferior como citado acima.

7.6.1.2 Análises, identificação e quantificação dos lipídios

Após extração dos lipídios, foram realizadas as análises lipidômicas, em um espectrômetro de massas híbrido quadrupolo/tempo-de-vôo TripleTOF 5600 (AB SCIEX, Concord, Canadá), de alta resolução e exatidão de massa, instalado na empresa AB SCIEX,

situada no endereço Rua Verbo Divino, 1488, 6º andar, Conj. 64D, CEP 04719-002 – Chácara Santo Antônio, São Paulo.

Os compostos foram analisados com ionização por *electrospray*, nos modos positivo e negativo, empregando a fonte de ionização *DuoSpray*. Esta fonte de ionização foi utilizada com temperatura de dessolvatação de 250°C e voltagem de ionização de 5 kV e -4,5 kV, para os modos positivo e negativo, respectivamente. Ar ultrapuro foi utilizado como gás nebulizante (GS1) e gás secante (GS2), ambos à pressão de 20 psi. O Nitrogênio foi utilizado como cortina de gás de dessolvatação (*Curtain Gas*) à pressão de 15 psi e como gás de colisão na célula de colisão (Q2).

As análises foram realizadas em modo de varredura MS, com aquisição dependente (IDA – *Information Dependent Acquisition*) de varredura MS/MS de íons produtos. Os experimentos de varredura MS (TOFMS) foram realizados no intervalo de m/z 200 a 1200, com tempo de acúmulo de sinal de 250 ms. Os experimentos dependentes de varredura de íons produto (MS/MS) foram configurados para os 20 sinais mais abundantes nos espectros de MS, com varredura de m/z 100 a 1500 e tempo de acúmulo de sinal de 30 ms. Os experimentos de dissociação induzida por colisão (CID) foram adquiridos com rampeamento da energia de colisão de 20 a 80 eV, para obtenção do padrão de fragmentação dos lipídios em diferentes energias de colisão. Empregou-se um tempo de exclusão de íons precursores de 42,5 ms, para os experimentos de aquisição dependente. O espectrômetro de massas foi calibrado com uma mistura comercial de compostos conhecidos, a fim de manter o erro de massas igual ou inferior a 2 ppm em ambos modos, MS e MS/MS.

As amostras foram analisadas por injeção em fluxo (FIA – *Flow Injection Analysis*), utilizando um sistema de cromatografia em fase líquida de alta performance (HPLC) *Agilent* 1260. As amostras foram injetadas sob vazão de fase móvel de 50 $\mu\text{L min}^{-1}$ e tempo total de corrida de 3,5 minutos por polaridade (Figura 4). A fase móvel foi constituída de metanol/água (95/05, v/v) com 5 mmol L^{-1} de acetato de amônio. Um volume final de 40 μL de amostra foi injetado em ambos os métodos de ionização (positivo e negativo). Injeções de isopropanol (50 μL) foram intercaladas com as amostras para limpeza do sistema de injeção e tubulação do sistema HPLC.

A aquisição dos dados foi realizada com o software AnalystTF (versão 1.5.2). A identificação e busca de dados de lipídios foi realizada com o software LipidView (versão 1.2). Detalhes sobre o software: <http://sciex.com/products/software/lipidview-software>.

Figura 4 - Diagrama de íons totais representativo de aquisição MS (azul) com aquisição dependente MS/MS (rosa)

Fonte: (AB SCIEX)

7.6.2 Análise estatística dos dados

Os espectros foram processados no programa Analyst® Software v 1.5 (Applied BioSystems™). Os dados obtidos das diferentes plataformas foram analisados por estatística multivariável utilizando o programa SIMCA P+12 (Unimetrics, Lund, Suécia). Métodos como análise de componente principal (PCA, principal component analysis) e projeção ortogonal em estruturas latentes (OPLS, orthogonal projections on latent structures) foram utilizados com a finalidade de identificar quais espécies proteicas, lipídicas ou qualquer outra variável mensurada a mais se diferenciava entre os grupos experimentais ou apresentasse maior correlação com a produção leiteira e desempenho reprodutivo dos animais.

8 RESULTADOS

A seguir são apresentadas as projeções ortogonais em estruturas latentes (OPLS, Orthogonal Projections on Latent Structures) que foram utilizados com a finalidade de identificar quais espécies lipídicas ou, qualquer outra variável mensurada, que mais se diferenciaram entre os grupos experimentais ou apresentaram maior correlação com a produção leiteira (Alta e Média), o período (Inverno e Verão) e o desempenho reprodutivo dos animais. Foram considerados valores de Q^2 acima de 0,30, como modelos significativos de acordo com a variável adotada no eixo y.

Gráfico 1 - OPLS com prenhez como variável Y com dados da lipidômica e metabólitos (Q^2 : 0,62)

Legenda: Produtividade: A= Alta produção e B=Baixa produção (equivalente às vacas de Média lactação); Período: I=Inverno e V=Verão; Prenhez: N=Vacas não prenhes e P= Vacas prenhes. Se for o gráfico 1 deve ser mencionado o grafico 1

No gráfico 1, são apresentadas 31 amostras individuais (9 outliers retirados) de vacas do D21 sendo constituídos por vacas prenhes ou vazias, de alta ou média produção, no inverno ou verão com dados de lipidômica, produção, problemas pós-parto (Metrite, Retenção de Placenta e Distocia), ECC (D21, D104 e D150) e metabólitos (gráfico 2). O valor de $Q^2=0,62$ resulta em uma boa separação entre os grupos de vacas prenhes ou não até 150 dias pós-parto. Portanto, independente do período e produtividade, o perfil lipídico destes grupos

são distintos e específicos capazes de separar, retrospectivamente, vacas que ficaram prenhes à primeira IATF e não prenhes após 3 IATF, conforme mostrado na gráfico 2.

Gráfico 2 - OPLS com prenhez como variável Y com dados da lipidômica e metabólitos (Q2: 0,62)

Legenda: X: Lipídios (em anexo), produção, problemas pós-parto (Metrite, Retenção de Placenta e Distocia), ECC (D21, D104 e D150) e metabólitos (PT-Proteína plasmática; ALB-Albumina; GGT; AST; CK-Creatina quinase; Glicose-GLI; COLTOTAL-Colesterol total; TG-Triacilgliceróis; HDL Colesterol -HDL; LDL Colesterol-LDL; VLDL Colesterol -VLDL; UREIA; CREA-Creatinina; BHB-β-hidróxibutirato; AGNE-Ácidos graxos não-esterificados e Enzima Superóxido Dismutase –SOD). Y: P150 (0) = representativo das vacas não prenhes e P150(1) = representativo das vacas prenhes à primeira IATF.

Gráfico 3 - OPLS (Q2: 0,62)

Legenda: Apresentação das principais subclasses de lipídios representativos da figura 8.2: PC: Phosphatidylcholine; LPC: Lysophosphatidylcholine; SM: Sphingomyelin; produção, problemas pós-parto (Metrite, Retenção de Placenta e Distocia) com (0) e sem (1), ECC (D21, D104 e D150) e metabólitos (Figura 8.2)

Nos gráficos 2 e 3, são apresentados os principais lipídios (maiores informações em anexo) e variáveis responsáveis pela separação das amostras individuais (gráfico 1) de vacas do D21 segundo prenhez, alta ou média produção, no inverno ou verão com $Q^2=0,62$. Valores em barras apresentados inicialmente no gráfico 3 são representativos em quantidade e/ou importância (dados qualitativos), e seus respectivos desvios padrões, do modelo apresentado no gráfico 2. Sendo observada maior influência das Fosfatidilcolinas (36:2; 34:2 e 38:4) e ECC 104 para a separação no modelo (gráfico1).

Gráfico 4 - OPLS com prenhez como variável Y com apenas dados da lipidômica (Q2:0,76)

Legenda: Produtividade: A= Alta produção e B=Baixa produção (equivalente às vacas de Média lactação); Período: I=Inverno e V=Verão; Prenhez: N=Vacas não prenhes e P= Vacas prenhes.

No gráfico 4, são apresentadas 31 amostras individuais (9 *outliers* retirados) de vacas do D21 sendo constituídos por vacas prenhes ou vazias, de alta ou média produção, no inverno ou verão com significativo $Q^2=0,76$, resultando em uma boa separação entre os grupos de vacas prenhes ou não. Portanto, independente do período e produtividade, o perfil lipídico destes grupos são distintos e específicos capazes de separar, retrospectivamente, vacas que se tornaram prenhes à primeira IATF ou não após 3 IATF, conforme mostrado no gráfico 5.

Fosfatidilcolinas (36:2; 34:2 e 38:4) para a separação dos grupos de vacas que se tornaram prenhes ou não até 150 dias de experimento referente ao gráfico 4.

Gráfico 7 - OPLS com prenhez como variável Y com apenas dados da lipidômica (Q2:0,76)

Legenda: Produtividade: A= Alta produção e B=Baixa produção (equivalente às vacas de Média lactação); Período: I=Inverno e V=Verão; Prenhez: N=Vacas não prenhes e P= Vacas prenhes.

No gráfico 7, são apresentadas as 31 amostras individuais (9 *outliers* retirados) de vacas do D21 sendo constituídos por vacas prenhes ou vazias, de alta ou média produção, no inverno ou verão com significativo Q2=0,76. O gráfico 4 e 7 equivalem-se, no entanto, no último é identificado o grupo dos possíveis fatoriais adotados no experimento perante a separação das vacas que ficaram prenhes (lado direito) ou não (lado esquerdo).

Tabela 4 - Coeficiente de correlação de Pearson e valores de p significativos ($p < 0,05$) entre as principais Fosfatidilcolinas analisadas pela Lipidômica, PC 36:2 e PC 34:2, em relação às principais variáveis metabólicas selecionadas pelo processo *stepwise*

Metabólitos	Fosfatidilcolinas			
	PC 36:2	p	PC 34:2	p
PC 34:2	0.8503*	0,0001	1	-
SOD	0.54*	0.0017	0.389*	0.0305
AGNE	0.0095	0.9595	-0.1123	0.5476
VLDL	0.5737*	0.0007	0.5019*	0.004
CK	0.2447	0.1857	0.0781	0.6763
COLT	0.0338	0.8567	-0.1022	0.5843

Legenda: Valores significativos para $p < 0,05$; PC: Phosphatidylcholine; SOD: Enzima Superóxido Dismutase; AGNE-Ácidos graxos não esterificados; VLDL Colesterol –VLDL; CK-Creatina quinase; COLTOTAL-Colesterol total.

Na tabela 4, é mostrada a análise da matriz de correlação dos dados com processo de seleção realizado por regressão *stepwise*. Nesta análise, observaram-se uma alta correlação e significância entre os principais lipídios apresentados pela análise lipidômica, PC 36:2 e PC 34:2. Além disso, a enzima Superóxido Dismutase e a lipoproteína VLDL também apresentaram este mesmo comportamento em relação a cada Fosfatidilcolina analisada. Os modelos ajustados por *stepwise* apresentaram boas estatísticas de ajuste.

Gráfico 8 - OPLS com Período como variável Y com apenas dados da lipidômica (Q2:-0,234)

Legenda: Produtividade: A= Alta produção e B=Baixa produção (equivalente às vacas de Média lactação); Período: I=Inverno e V=Verão; Prenhez: N=Vacas não prenhes e P= Vacas prenhes.

No gráfico 8, são apresentadas 31 amostras individuais (9 *outliers* retirados) de vacas no D21 sendo constituídos por vacas prenhes ou vazias, de alta ou média produção, no inverno ou verão com $Q^2 = -0,234$ resultando em um modelo não significativo. Portanto, no período não houve diferença significativa no perfil lipidômico das vacas apresentadas no experimento de acordo com os fatoriais propostos (período, produtividade e prenhez).

Gráfico 9 - OPLS com Grupo de produtividade como variável Y com apenas dados da lipidômica ($Q^2: -0,157$)

Legenda: Produtividade: A= Alta produção e B=Baixa produção (equivalente às vacas de Média lactação); Período: I=Inverno e V=Verão; Prenhez: N=Vacas não prenhes e P= Vacas prenhes.

No gráfico 9, estão representadas as 31 amostras (9 *outliers* retirados) de vacas do D21 sendo constituídos por vacas prenhes ou vazias, de alta ou média produção, no inverno ou verão com $Q^2: -0,157$ resultando em um modelo não significativo. Portanto, a produção de leite não influenciou significativamente o perfil lipidômico das vacas no D21 pós-parto.

Gráfico 10 - OPLS com Prenhez e Grupo de produtividade como variáveis Y, apenas dados da lipidômica (Q2: 0,525)

Legenda: Produtividade: A= Alta produção e B=Baixa produção (equivalente às vacas de Média lactação); Período: I=Inverno e V=Verão; Prenhez: N=Vacas não prenhes e P= Vacas prenhes.

No gráfico 10, são apresentadas 31 amostras individuais (9 *outliers* retirados) de vacas do D21 sendo constituídos por vacas prenhes ou vazias, de alta ou média produção, no inverno ou verão, com significativo Q2=0,525 resultando em uma boa separação entre os grupos fatoriais. Portanto, há um perfil lipídico (gráfico 11) diferenciado entre os grupos fatoriais (vacas de alta lactação prenhes (AP) x vacas de baixa (= média) lactação prenhes (BP) x vacas de alta lactação não prenhes (AN) x vacas de baixa (= média) lactação não prenhes (BN)) capaz de separar os grupos representados no gráfico 10.

Gráfico 11 - OPLS com Prenhez e Grupo de produtividade como variáveis Y, apenas dados da lipidômica (Q2: 0,525)

Legenda: X: Lipídios; PC: Phosphatidylcholine; LPC: Lysophosphatidylcholine; SM: Sphingomyelin; CE: colesterol ester. Y1: P150 (0) = representativo das vacas não prenhes e P150(1) = representativo das vacas prenhes à primeira IATF; Y2: Produtividade: Grupo (A): Alta lactação; Grupo(B): Média lactação.

Gráfico 12 - VIP (Q2: 0,525)

Legenda: Apresentação das principais subclasses de lipídios representativos da figura 8.11: PC: Phosphatidylcholine; LPC: Lysophosphatidylcholine; SM: Sphingomyelin; CE: cholesterol ester.

Nos gráficos 11 e 12, são apresentados os principais lipídios (próximos ao eixo y e à variável P150(1) no gráfico 11) responsáveis pela separação das 31 amostras (gráfico 10) de vacas do D21 sendo constituídos por vacas prenhes ou vazias, de alta ou média produção, no inverno ou verão com significativo Q2: 0,525. No gráfico 12, as principais variáveis lipídicas analisadas são representadas por barras indicando valores quantitativos, e seus respectivos desvios padrões, sendo observada maior influência das Fosfatidilcolinas (36:2 e 34:2) para a separação dos grupos de vacas que se tornaram prenhes ou não até 150 dias de experimento referente ao gráfico 10.

Gráfico 13 - OPLS com Prenhez e Período como variáveis Y, apenas dados da lipidômica (Q2: 0,367)

Legenda: Produtividade: A= Alta produção e B=Baixa produção (equivalente às vacas de Média lactação); Período: I=Inverno e V=Verão; Prenhez: N=Vacas não prenhes e P= Vacas prenhes.

No gráfico 13 são apresentadas 31 amostras (9 *outliers* retirados) de vacas do D21 sendo constituídos por vacas prenhes ou vazias, de alta ou média produção, no inverno ou verão com significativo $Q^2=0,367$, resultando em uma boa separação entre os grupos fatoriais. Portanto, há um perfil lipídico (gráfico 14) diferenciado entre os grupos fatoriais: vacas prenhes de Inverno (PI) x vacas prenhes de Verão (PV) x vacas não prenhes de Inverno (NI) x vacas não prenhes de Verão (NV).

9 DISCUSSÃO

No gráfico 1, objetivou-se analisar a influência de outras variáveis, além dos lipídios, na separação de vacas que se tornaram prenhes ou não até 150 dias de experimento referentes aos principais grupos experimentais (vacas prenhes ou vazias x de alta ou média produção x no inverno ou verão), portanto, um conjunto representado pelos: dados quantitativos - lipídios (em anexo), produção total e parâmetros bioquímicos (Proteína plasmática; Albumina; GGT; AST; Creatina quinase; Glicose; Colesterol total; Triacilgliceróis; Colesterol-HDL; Colesterol-LDL; Colesterol -VLDL; UREIA; Creatinina; β -hidróxibutirato; Ácidos graxos não-esterificados e a Enzima Superóxido Dismutase) e pelos dados qualitativos - período, problemas pós-parto (Metrite, Retenção de Placenta e Distocia) e ECC (D21, D104 e D150)).

Entre os resultados apresentados nos gráficos 2 e 3, observou-se que os lipídios referentes às fosfatidilcolinas 36:2 e 34:2 foram as variáveis quantitativas que mais influenciaram o significativo ($Q^2=0,62$) processo de separação dos grupos das vacas (gráfico 1) que ficaram prenhes à primeira IATF em relação às não prenhes após 3 IATF. Nestes mesmos gráficos, 2 e 3, quando observados os efeitos diretos e isolados dos parâmetros qualitativos, o escore corporal aos 104 dias de experimento, ECC (104), parece influenciar, conjuntamente com o perfil lipídico, no processo de separação destes grupos de vacas que se tornaram ou não prenhes. No entanto, vale registrar que a média do ECC (104) das vacas prenhas (2,52; $n=15$) foram menores do que as das vacas vazias (3,22; $n=16$), o que aparentemente causou um contrassenso. Devido a essas dúvidas, foi proposto analisar apenas o perfil lipídico, isento de outras variáveis que não as dos grupos experimentais, a fim de se observar exclusivamente o poder de influência destes lipídios (Q^2) no processo de separação das vacas que se tornaram prenhes à primeira IATF ou não após 3 IATF.

Assim, no gráfico 4 obteve-se o melhor Q^2 (0,76) dentre todos os modelos analisados. Com isso, observa-se, novamente, uma significativa separação dos grupos de vacas que se tornaram prenhes ou não ao longo de todo o experimento, concluindo-se que o perfil lipídico entre esses grupos realmente diferiu-se. A presença e concentração desses lipídios podem ser observadas nos gráficos OPLS 5 e 6, sendo eles: PC 36:2, PC 34:2, PC 38:4, LPC 18:2 e SM 32:3,4.

Estes resultados estão de acordo com Imhasly (2015) que afirma haver um perfil lipídico diferente em vacas que apresentam diferentes níveis de lipidose hepática. Este autor observou que as concentrações de PC eram menores em vacas que apresentavam fígado gorduroso no pós-parto, devido principalmente à redução de VLDL, neste período, devido ao alto catabolismo mamário desta lipoproteína (MOORE; CHRISTIE, 1979).

O transporte em massa de gordura ao longo de todo o corpo no início da lactação é simultâneo a um aumento da necessidade de fosfolípidos. Provou-se que uma diminuição da biossíntese de fosfatidilcolina tem um impacto sobre a secreção de VLDL nos hepatócitos após o parto (COLE et al., 2012). Portanto, neste primeiro estudo Imhasly (2015) permitiu provar a hipótese de que as vacas que sofrem de fígado gorduroso tem uma reduzida biossíntese de fosfatidilcolina e, por conseguinte, não são capazes de sintetizar VLDL suficientes, capazes de exportar os TG necessários a partir do fígado.

Complementando este mesmo estudo, Imhasly (2015) avaliou, em outro experimento, no intuito de entender a relação causal entre as concentrações reduzidas de fosfatidilcolinas e a ocorrência de lipidose em vacas leiteiras, em um amplo perfil lipidômico. Para isso, e com o objetivo de revelar mais alterações metabólicas durante o período de transição, doze vacas leiteiras de uma mesma fazenda foram monitorados ao longo do periparto. As amostras de sangue foram coletadas nos dias -14, -7, 0, 7, 14, 21, e 28 em relação ao parto. Foi realizada biópsia hepática no dia 28 pós-parto. Este autor observou que as concentrações plasmáticas de TGs diminuíram abruptamente no dia do parto e, em seguida, mantiveram-se constantes em mesmo nível reduzido até o final do estudo. Esta observação reflete o aumento repentino do consumo de energia para o início da lactação (VAN DEN TOP et al., 2005). Além disso, a concentração da maioria dos fosfolípidos aumentou de forma constante no pós-parto. Quatro fosfatidilcolinas, cinco lysophosphatidylcholines e duas esfingomielinas foram aumentadas após o parto. Com este estudo, Imhasly (2015) pode apoiar a hipótese de que a biossíntese de fosfatidilcolina tem um impacto no balanço lipídico e desempenha um papel importante nas alterações metabólicas no início da lactação. Nestes estudos foram encontradas várias fosfatidilcolinas que puderam ser identificadas como biomarcadores de plasma potenciais para a ocorrência de fígado gorduroso.

No presente estudo, maiores concentrações de PCs, SMs e LPCs, no grupo de vacas que ficaram prenhes à primeira IATF, estão ligadas ao fato desses animais não possuírem uma condição metabólica severa desfavorável, típica de um possível BEN pós-parto, principalmente quando devido à presença de lipidose. Além disso, em casos opostos, estudos

anteriores têm demonstrado a importância de fontes de colina para a síntese de fosfatidilcolinas, pela via de CDP-colina (GRUMMER, 2012), que pode significar a necessidade de estudos complementares, para que sejam investigadas vias metabólicas correlacionadas que possam, futuramente, elucidar a real ligação destes lipídios na síntese de lipoproteínas e, dentro de um contexto reprodutivo, o transporte de colesterol por elas na síntese de esteroides, durante foliculogênese, interferindo, assim, no período da primeira ovulação pós-parto. Além disso, sabe-se que fluido antral é um compartimento complexo de fonte de substâncias regulatórias ou inibitórias que chegam da corrente sanguínea ou de secreções das células foliculares, como as gonadotrofinas, esteroides, fatores de crescimento, enzimas, proteoglicanos e as lipoproteínas. Durante o desenvolvimento folicular, a produção do fluido antral é intensificada pelo aumento da vascularização folicular e permeabilidade de vasos sanguíneos, que acompanham um grande aumento de tamanho dos folículos antrais. Os sinais para a formação do antro ainda não estão totalmente elucidados (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Segundo McEvoy et al. (2000) o enriquecimento em fosfolipídios e colesterol durante a maturação do oócito é crucial para formar as membranas durante as divisões celulares rápidas após a fecundação dos oócitos.

Na tabela 4, foi realizada a correlação dos dados (quantitativos e qualitativos) e seleção por regressão pelo processo *stepwise*. Nesta análise, observou-se uma alta correlação e significância entre os principais lipídios apresentados pela análise lipídômica, PC 36:2 e PC 34:2. Além disso, a enzima Superóxido Dismutase e a lipoproteína VLDL também apresentaram este mesmo comportamento em relação a cada fosfatidilcolina analisada. Segundo Maturana Filho (2013), o organismo possui sistemas de defesa antioxidante contra pequenas quantidades de espécies reativas de oxigênio (EROS). Durante os processos metabólicos, na proliferação celular e na defesa contra agentes agressores, principalmente durante o BEN, são produzidos estes radicais livres. Devido a isso, o organismo possui sistemas de defesa antioxidante, sendo a SOD responsável pela atuação, juntamente com a catalase e a Glutadiona Peroxidase, na prevenção e na inativação de EROS, antes destas oxidarem os lipídios (RIVERA et al., 2002; PEETERS et al., 2005). Com isso, observa-se que a presença de significativa correlação positiva entre a SOD e as fosfatidilcolinas, 36:2 e 36:4, representa um indicativo de um estado geral metabólico pós-parto eficientemente compensador perante um possível BEN, podendo ser representado pelo grupo das vacas que se tornaram prenhes ao longo do experimento. Esta dedução pode ser utilizada desta mesma

forma sabendo-se o papel das fosfatidilcolinas em relação às lipoproteínas VLDL, mencionado acima.

Os modelos apresentados nos gráficos 8 e 9 (Q^2 :- 0,234 Q^2 :- 0,157) foram analisados de acordo com o período (inverno e verão) e a produção (alta e média lactação), respectivamente, no eixo y; a fim de se analisar a influência individual de cada um desses fatores sobre o perfil lipídico. Devido aos baixos valores de Q^2 observados, conclui-se que estas variáveis por si só não interferem no perfil lipídico de vacas no D21.

No entanto, no gráfico 10 ao se correlacionar prenhez e produção obteve-se um Q^2 : 0,525, que permite dizer que estas duas variáveis juntas conseguem gerar um lipidograma capaz de separar o grupo, de vacas que ficaram prenhes ou não, segundo a produção. Segundo Goselink (2013), a expressão e secreção aumentadas de colina (precursor de PC) e de genes envolvidos na montagem de VLDL são correlacionadas com menor teor de TG no fígado. A alteração desses genes envolvidos no metabolismo de carboidratos se correlaciona com o maior teor de glicogênio no fígado e a produção de leite aumentada. Segundo os gráficos 11 e 12, a presença aumentada de PC 36:2 e PC 34:2 corroboram com a eficiência destes lipídios na síntese de VLDL proporcionando uma devida distribuição de TG do fígado para os tecidos necessários das vacas no pós-parto. Com isso, evita-se a ocorrência de lipídose hepática, principalmente durante o fim do período de transição, representado pelo D21, dia da coleta das amostras neste experimento. O mesmo pode ser observado nos gráficos 13 e 14 onde prenhez e período estão correlacionados (Q^2 : 0,367), mas com menor poder de significância, quando comparado com o gráfico 10.

Portanto, maiores quantidades de fosfatidilcolinas, em vacas pós-parto, podem ser considerados bons biomarcadores lipídicos, indicativos de ausência ou menores graus de lipídose hepática nestes animais e, portanto, pode auxiliar no monitoramento e controle de parâmetros metabólicos alterados, normalmente observados durante o BEN.

10 CONCLUSÃO

Concluí-se que no final do período de transição (D21 do atual experimento), o plasma de vacas pós-parto que contenham maiores quantidades de fosfatidilcolinas, principalmente 36:2 e 36:4, podem obter melhores chances de se tornarem prenhes à 11ATF. Estas fosfatidilcolinas podem ser consideradas como bons biomarcadores lipídicos devido à sua interferência com a maior síntese de lipoproteínas VLDL, evitando assim, a ocorrência de fígado gorduroso, característico desse período. Além disso, estas moléculas podem auxiliar no processo de monitoramento de alguns parâmetros metabólicos alterados, normalmente observados durante o BEN. Como estudos futuros, propõem-se a necessidade de investigações voltadas ao esclarecimento de questionamentos relacionados à causa e efeito destas moléculas em vias metabólicas específicas, a fim de se obter um mapeamento lipídico das principais vias bioquímicas envolvidas no período de transição de vacas leiteiras.

REFERÊNCIAS

- AARDEMA, H.; VOS, P. L.; LOLICATO, F.; ROELEN, B. A.; KNIJN, H. M.; VAANDRAGER, A. B.; HELMS, J. B.; GADELLA, B. M. Oleic acid prevents detrimental effects of saturated fatty acids on bovine oocyte developmental competence. **Biology of Reproduction**, v. 85, p. 62–69, 2011.
- ALLAIN, C. C.; POON, L. S.; CHAN, C. S. G.; RICHMOND, W.; FU, P. C., Enzymatic determination of total serum cholesterol. **Clinical cheminstry**, v. 20, p. 470-475, 1974.
- ALVES, N. G.; PEREIRA, M. .N.; COELHO, R. M. Nutrição e reprodução em vacas leiteiras. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, supl., n. 6, p.118-124, 2009.
- AWASTHI, H., SARAVIA, F., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H., BÅGER. Do cytoplasmic lipid droplets accumulate in immature oocytes from over-conditioned repeat breeder dairy heifers? **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45,p. 194–19, 2010.
- BÅGE, R. Conception rates after AI in Swedish red and white dairy heifers: relationship with progesterone concentrations at AI. **Reproduction in Domestic Animals**, v.38, p. 199-203, 2003.
- BARHAN, D.; TRINDER, P. An improved color reagent for the determination of blood glucose by oxidase system. **Analyst**, v. 97, p. 142-145, 1972.
- BARRERA, N. P., ZHOU, M., ROBINSONET, C. V. The role of lipids in defining membrane protein interactions: insights from mass spectrometry. **Trends Cell Biology**, v. 23, p. 1–8, 2013.
- BARROS, L. **Transtornos metabólicos que afetam a qualidade do leite**. In: GONZÁLEZ, F. H. D.; DÜRR, J. W.; FONTANELI, R. S. (Ed.). *Uso do leite para monitorar a nutrição e metabolismo de vacas leiteiras*. Porto Alegre: UFRGS, p.44-57. 2001.
- BEAM, S. W. BUTLER, W. R. Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in postpartum dairy cows. **J. Reprod. Fertil**, Suppl, v. 54, p. 411–424, 1999.
- 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.
- BEH, C. C., MAMMUCARI, R., FOSTER, N. R. Lipids-based drug carrier systems by dense gas technology: a review. **Chem. Eng. J**, v. 188, p. 1–14, 2012.

BEKER, A. R. C. L., COLENBRANDER, B., BEVERS, M. M. Effect of 17β -estradiol on the in vitro maturation of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 58, p. 163-1673, 2002.

BEKER-VAN WOUDEBERG A. R., VAN TOL H. T. A., ROELEN B. A. J., COLENBRANDER B., BEVERS M. M. Estradiol and its membrane-impermeable conjugate (estradiolbovine serum albumin) during in vitro maturation of bovine oocytes: effects on nuclear and cytoplasmic maturation, cytoskeleton, and embryo quality. **Biol. Reprod.**, v.70, p. 1465–1474, 2004.

BELL, A. W. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. **J Anim Sci**, v.73, p.2804-2819, 1995.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **Journal Laboratory Clinical Medicine**, v. 61, n. 5, p. 882-888, 1963.

BILODEAU-GOESEELS, S.; PANICH, P. Effects of quality on development and transcriptional activity in early bovine embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 71, p. 143–155, 2002.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method for total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol**, v. 37, p. 911-917, 1959.

BLOCK, S. S., BUTLER, W. R., EHRHARDT, R. A., BELL, A. W.; VAN AMBURGH M. E., AND Y. R. BOISCLAIR. Decreased concentration of plasma leptin in periparturient dairy cows is caused by negative energy balance. **J. Endocrinol**, v. 171, p. 339-348, 2001.

BOBE, G., YOUNG, J. W., AND BEITZ, D. C. Invited review: pathology, etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 10, p. 3105-3124, 2004.

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

BRITT, J.H., Impacts of early postpartum metabolism on follicular development and fertility. Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Bovine Practitioners v.24, p.39-43, 1992.

BROWN, M. S.; KOVANEM, P. T.; GOLDSTEIN, J. L. Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. **Science**, v. 212, p. 628–635, 1981.

BRÜGGER, B.; LIPIDOMICS: analysis of the lipid composition of cells and subcellular organelles by electrospray ionization mass spectrometry. **Annu. Rev. Biochem**, v. 83, p. 79–98, 2014.

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

- BUTLER, S. T.; PELTON, S. H.; BUTLER, W.R.; Energy balance, metabolic status, and the first postpartum ovarian follicle wave in cows administered propylene glycol. **J Dairy Sci**, v. 89, p. 2938, 2951, 2006.
- BUTLER, W. R; SMITH, R. D. Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. **J. Dairy Sci.**, v. 72, p. 767-783, 1989.
- BUTLER, W. R. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle, **Animal Reproduction**, Sci, 60–61:449–457, 2000.
- BUTLER, W. R. Energy balance relationship with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. **Livestock Production Science**. 83: 211-218. 2003.
- BUTLER, W.R. Nutritional effects on resumption of ovarian cyclicity and conception rate in postpartum dairy cows. **Anim Sci Occas Publ**, v. 26, p. 133-145, 2001.
- BYRNES, R. W., FAHY, E., SUBRAMANIAM, S.A. Minimal Information Required for the Analysis of Lipidomics Experiments (MIALE). **JALA**. v.12, p. 230–238, 2007.
- CERRI, R. L. A.; JUCHEM, S. O. ; CHEBEL, R. C.; RUTIGLIANO, H. M. BRUNO, R. G. S.; GALVÃO, K. N.; THATCHER, W. W.; SANTOS, J. E. P. Effect of fat source differing in fatty acid profile on metabolic parameters, fertilization, and embryo quality in high-producing dairy cows, **J. Dairy Sci**, v. 92, p.1520-1531, 2009.
- CLEMPSON A. M.; POLLOTT G. E., BRICKELL J. S., BOURNE N. E., MUNCE N., WATHES D. C. Evidence that leptin genotype is associated with fertility, growth, and milk production in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**. v. 94, p. 3618–3628, 2011.
- COLE, L. K., J. E. VANCE, AND D. E. VANCE. Phosphatidylcholine biosynthesis and lipoprotein metabolism. *Biochim. Biophys. Acta*. 1821:754-761. 2011.
- COLE, L. K., VANCE, J. E., AND VANCE, D. E. Phosphatidylcholine biosynthesis and lipoprotein metabolism. *Biochimica et biophysica acta*, 1821(5):754–761. 2012.
- CONTRERAS G.A., MATTMILLER S.A., RAPHAEL W., GANDY GULLIVER C.E., FRIEND M.A., KING B.J., CLAYTON E.H. The role of omega-3 polyunsaturated fatty acids in reproduction of sheep and cattle. *Animal Reproduction Science*. 131, 9–22. 2012.
- DIRANDEH E., TOWHIDI A., PIRSARAEI Z.A., HASHEMI F.A., GANJKHANLOU M., ZEINOALDINI S., ROODBARI A.R., SABERIFAR T., PETIT H.V., Plasma concentrations of PGFM and uterine and ovarian responses in early lactation dairy cows fed omega-3 and omega-6 fatty acids. *Theriogenology*. 80, 131–137. 2013.
- DIRKSEN, G.; BREITNER, W. New quick-test for semi quantitative determinations of beta-hydroxybutyric acid in bovine milk. *Journal Veterinary Medical Animal Physiology Pathology Clinical Medical*, v.40, p.779-784, 1993.

DOUMAS, B.T.; BIGGS, H.G.; WATSON, W., Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clinica chimica acta*, 31, 87-96. 1971.

DRACKLEY JK, OVERTON TR, NEIL DOUGLAS G. Adaptations of glucose and long-chain fatty acid metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period. *J. Dairy Sci.*, v.84, suppl E, p.100-110, 2001.

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

DUCKER, M. J., MORANT, S. V., FISHER, W. J., HAGGETT, R. A. Nutrition and reproductive performance of dairy cattle. *Animal Production* 41: 13-22. 1985.

DUFFIELD, T. F., LISSEMORE, K. D., MCBRIDE, B. W., LESLIE, K.E. Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production, *J. Dairy Sci*, v, 92, p.571-580, 2009.

EISENBERG, S., LEVY, R.L., Lipoprotein metabolism. *J. Lipid Res.* 13, 1-89. 1995.

EMERY, R. S; LIESMAN, J. S.; HERDT, T. H. Metabolism of long chain fatty acids by ruminant liver. *Journal of Nutrition*, v. 122, p. 832-839, 1992.

FAHY, E., SUBRAMANIAM, S., BROWN, H.A., GLASS, C.K., MERRILL JR., A.H., MURPHY, R.C., RAETZ, C.R., RUSSELL, D.W., SEYAMA, Y., SHAW, W., SHIMIZU, T., SPENER, F., VAN MEER, G., VANNIEUWENHZE, M.S., WHITE, S.H., WITZTUM, J.L., DENNIS, E.A. A comprehensive classification system for lipids. **J. Lipid Res.** v. 46, p. 839-862, 2005.

FAHY, E., SUBRAMANIAM, S., MURPHY, R.C., NISHIJIMA, N., RAETZ, C.R.H., SHIMIZU, T., SPENER, F., VAN MEER, G., WAKELAM, M.J.O., DENNIS, E.A., Update of the LIPIDMAPS comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res.* 9, 14. 2009.

FENG X.; LIU X., LUO, Q, LIU B.F., Mass spectrometry in systems biology: an overview, **Mass Spectrometry Reviews.** v. 27, p. 635-660, 2008.

FERREIRA, C. R.; SARAIVA, S. A. ; CATHARINO, R. R. ; GARCIA, J. S.; GOZZO, F. C. ; SANVIDO, G. B. ; SANTOS, L. F. A. ; TURCO, E.G. LO ; PONTES, J. H. F. ; BASSO, A. C. ; BERTOLLA, R.P. ; SARTORI, R. ; GUARDIEIRIO, M. M. ; PERECIN, F. ; MEIRELLES, F.V.; SANGALLI, J. R. ; EBERLIN, M.N., Rápido, direto e informativo: perfil de lipídios de oócitos e embriões bovinos individuais por espectrometria de massas. **O Embrião.** p. 24 - 31, 2010.

FIEHN, O. Extending the breadth of metabolite profiling by gas chromatography coupled to mass spectrometry. **Trends Anal. Chem.** v. 27, p. 261-269. 2008.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. L.; FREDRICKSON, D. L. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clinical Chemistry.** v.18, p. 499-502, 1972.

FUNSTON, R. N. **FAT: supplementation and reproduction in beef females**. 2004

GERLOFF, B. J., HERDT, T. H., AND EMERY, R. S. Relationship of hepatic lipidoses to health and performance in dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 188:845–850. 1986.

GERMAN, J.B., GILLIES, L.A., SMILOWITZ, J.T., ZIVKOVIC, A.M., WATKINS, S.M., Lipidomics and lipid profiling in metabolomics. *Curr. Opin. Lipidol.* 18, 66–71. 2007.

GIBLIN L., BUTLER S.T., KEARNEY B.M., WATERS S.M., CALLANAN M.J., BERRY D.P., Association of bovine leptin polymorphisms with energy output and energy storage traits in progeny tested Holstein–Friesian dairy cattle sires. *BMC Genetics*. 11, 73–82. 2010.

GIBNEY M.J., WALSH M., BRENNAN L., ROCHE H.M., GERMAN B., VAN OMMEN B. "Metabolomics in human nutrition: opportunities and challenges". **Am. J. Clin. Nutr.** v. 82, p.497–503, 2005.

GIOVANE, A., BALESTRIERI, A., NAPOLI, C., New insights into cardiovascular and lipid metabolomics. **J. Cell. Biochem.** v.105, p. 648–654, 2008.

GONZÁLEZ F.H.D. CONCEIÇÃO T.R., SIQUEIRA A.J.S., LA ROSA, V.L. Variações sanguíneas de uréia, creatinina, albumina e fósforo em bovinos de corte no rio grande do sul, **A Hora Veterinária**, v. 20, p. 59-62, 2000.

GONZÁLEZ F.H.D., HAIDA, K., ZANELLA, R., FIGUR, K., **Influência Da Época Do Ano No Perfil Metabólico Em Gado Leiteiro No Sul Do Brasil**. Arquivos Da Faculdade De Veterinária Da UFRGS, v. 24, p. 11-24, 1996.

GONZÁLEZ, F. H. D.; DÜRR, J. W.; FONTANELI, R. S. (Ed.). **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras**. Porto alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011. 77 p. Apostila.

GONZÁLEZ, F.H.D., ROCHA, J.A., Metabolic profile variations and reproduction performance in holstein cows of different milk yields in southern brazil. *Arquivos Da Faculdade De Veterinária Da UFRGS*, v. 26, p. 52-64, 1998.

GONZALEZ-COVARRUBIAS, V., BEEKMAN, M., UH, H.W., DANE, A., TROOST, J., PALIUKHOVICH, I., VAN DER KLOET, F.M., HOUWING-DUISTERMAAT, J., VREEKEN, R.J., HANKEMEIER, T., SLAGBOOM, E.P. **Lipidomics of familial longevity**. *Aging Cell* v.12, p. 426–434. 2013.

GOODACRE, R., VAIDYANATHAN, S., DUNN, W.B., HARRIGAN, G.G., KELL, D.B., 2004. Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. **Trends Biotechnol.** v.22, p. 245–252, 2008.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M., Determination of serum proteins by means of biuret reaction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 177, p. 751-766, 1949.

GOSELINK, R.M.A. et al. Effect of rumen-protected choline supplementation on liver and adipose gene expression during the transition period in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 2, 1102 – 1116, 2013.

GROSS, J.H., **Mass Spectrometry – A Textbook**, Berlin: Springer, 2004.

GROSS, R.W., JENKINS, C. M., YANG, J., MANCUSO, D. J., HAN, X. Functional lipidomics: the roles of specialized lipids and lipid-protein interactions in modulating neuronal function. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.** v.77, p. 52–64, 2005.

GRUFFAT, D., DURAND, D., GRAULET, B., AND BAUCHART, D. Regulation of VLDL synthesis and secretion in the liver. **Reproduction Nutrition Development**, 36(4):375–389. 1996.

GRUM, D. E., DRACKLEY, J. K., AND CLARK, J. H. Fatty acid metabolism in liver of dairy cows fed supplemental fat and nicotinic acid during an entire lactation. **Journal of dairy science**, v.85, n.11, p. 3026–3034. 2002.

GRUMMER, R. R. Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows, **J. Dairy Sci**, v.76, p.3882-3893, 1993.

GRUMMER, R. R. Impact in changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition cow. **J. Anim. Sci.** v.73, p. 2820- 2833, 1995.

GRUMMER, R. R.. CHOLINE: A limiting nutrient for transition dairy cows. Pages 22-27 in Proc. Cornell Nutr. Conf. Cornell University, Syracuse, NY. 2012.

HAN, X., **Lipidomics: developments and applications**. J. Chromatogr. v. 877, p. 2663, 2009.

HARKEWICZ, R., DENNIS, E.A., Applications of mass spectrometry to lipids and membranes. **Annual. Rev. Biochem.** v.80, p. 301–325, 2011.

HAVEL, R.J., HAMILTON, R.L., Hepatic catabolism of remnant lipoproteins: where the action is. *Arterioscler.. Thromb. Vasc Biol.* 24, 213–215. 2004.

HEAD, H.H, GULAY, M.S. Recentes avanços na nutrição de vacas no período de transição. In: SINLEITE – Simpósio Internacional de Bovinocultura de Leite, 2, 2001, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, p.121-137, 2001.

HENRY, J. B., Diagnósticos clínicos e tratamentos por métodos laboratoriais, 2nd ed. Manole, São Paulo. 1999.

HERDT, T, H, Ruminant adaptation to negative energy balance, **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.**, v. 16, p. 215-230, 2000.

HERDT, T. H. Fatty liver in dairy cows. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, v.4, n.2, p. 269–287. 1988.

HUMBLLOT, P., HOLM, P., LONERGAN, P., WRENZYCKI, C., LEQUARRE, A. S., JOLY, C.G., HERMANN, D., LOPES, A., RIZOS, D., NIEMANN, H., CALLESEN, H. Effect of stage of follicular growth during superovulation on developmental competence of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.63, p.1149-1166, 2005.

HUSSAIN, M. M., A proposed model for the assembly of chylomicrons. **Atherosclerosis**, v.148, p.1–15, 2000.

IMHASLY, S. **Blood plasma biomarkers correlating with hepatic lipidosis in dairy cows**. 2015. 110 f. Tese (Doutorado) - ETH Zurich - Swiss Federal Institute of Technology, Suíça, 2015.

IVANOVA, P. T., MILNE, S. B., MYERS, D. S., BROWN, H. A. Lipidomics: a mass spectrometry based systems level analysis of cellular lipids. **Curr. Opin. Chem. Biol.** 13, 526–531. 2009.

KATAJAMAA, M., ORESIC, M., Processing methods for differential analysis of LC/MS profile data. **BMC Bioinforma.** v. 6, p. 179–190, 2005.

IZADYAR, F.; VANTOL, H.T.A.; COLENBRANDER, B. et al. Stimulatory effect of growth hormone on in vitro maturation of bovine oocytes is exerted through cumulus cells and not mediated by IGF-I. **Molecular Reproduction and Development**, v.47, p.175-180, 1997.

JACOBS, R. L., VAN DER VEEN, J. N., AND VANCE, D. E. Finding the balance: the role of S-adenosylmethionine and phosphatidylcholine metabolism in development of nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, 58(4):1207–1209. 2013.

JEREMY K. N., JOHN C., Systems **Biology**. Metabonomics; Lindon; 455-423. 2008.

JORRITSMA R, JORRITSMA H, SCHUKKEN YH, WENTINK GH. Relationships between fatty liver and fertility and some periparturient diseases in commercial Dutch dairy herds. **Theriogenology**, v.54, p.1065-1074, 2000. **Journal of Animal Science**. 82, 154–161. 2004.

KADDURAH-DAOUK, R., KRISHNAN, R.R.K., Metabolomics: a global biochemical approach to the study of central nervous system diseases. **Neuropsychopharmacol. Rev.** 34, 173–186. 2009.

KENNY, D.A.; HUMPHERSON, P.G., LEESE, H.J., MORRIS, D.G., TOMOS, A.D., DISKIN, M.G. Effect of elevated systemic concentrations of ammonia and urea on the metabolite and ionic composition of oviductal fluid in cattle. **Biology of reproduction** 66 (6), 1797-1804, 2002b.

KNIJN H.M., WRENZYCKI C., HENDRIKSEN P.J., VOS P.L., HERRMANN D., VAN DER WEIJDEN C.G., NIEMANN H.; DIELEMAN S.J. Effects of oocyte maturation regimen on the relative abundance of gene transcripts in bovine blastocysts derived in vitro or in vivo. **Reproduction**. 124(3): 365-375. 2002.

- KRISHER, R.L.; BAVISTER, B.D. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. *Theriogenology* 49: 103-114. 1998.
- KRUIP, T.A.M., KEMP, B. Voeding en vruchtbaarheid bij landbouwhuisdieren. **Tijdschr. Diergeneeskd.**;124:462–467, 1999.
- KUHLA, B., ALBRECHT, D., KUHLA, S., AND METGES, C. C. Proteome analysis of fatty liver in feed-deprived dairy cows reveals interaction of fuel sensing, calcium, fatty acid, and glycogen metabolism. **Physiological genomics**, 37(2):88–98. 2009.
- LANDAU, S., BRAW-TAL, R., KAIM, M., BORA,BRUCKENTAL, I. Preovulatory follicular status and diet affect the insulin and glucose content of follicles in high-yielding dairy cows. **Anim Reprod Sci**, 64:181-197, 2000.
- LEE, C.H., OLSON, P., EVANS, R.M., Minireview: lipid metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferator-activated receptors. *Endocrinology* 144, 2201–2207. 2003.
- LEROY, J.; UGENT, A. V. S., OPSOMER, G. U.; UGENT, A.DE K. **Metabolic changes in high producing dairy cows and the consequences on oocyte and embryo quality.** Livro.2005.
- LI, M., YANG, L., BAI, Y., LIU, H., Analytical methods in lipidomics and their applications. **Anal. Chem.** 86, 161–175. 2014.
- LIEFERS, S.C., VEERKAMP, R.F., TE PAS, M.F.W., DELAVAUD, C., CHILLIARD, Y.; VAN DER LENDE, T.; Leptin concentrations in relation to energy balance, milk yield, intake, live weight, and oestrus in dairy cows. **Journal of Dairy Science** 86 799–807, 2003.
- LOEPEZ, H., L. D. SATTER AND M. C. WILTBANK, Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 81: 209-223. 2004.
- LOIZIDES-MANGOLD, U., On the future of mass-spectrometry-based lipidomics. **FEBS J.** 280, 2817–2829. 2013.
- LONERGAN P., RIZOS D., WARD F. & BOLAND M.P. Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. **Reproduction Nutrition Development.** 41: 427-437. 2001.
- LUCY MC, JIANG H, KOBAYASHI Y. Changes in the somatotrophic axis associated with the initiation of lactation. **J Dairy Sci**, v.84, Suppl. E, p.113-119, 2001.
- LUCY, M. C. Mechanisms linking nutrition and reproduction in postpartum cows. *Reproduction in Domestic Ruminants V.* **Reproduction**, Suppl. 61, 415–427.2003.
- LUCY, M. C. Regulation of ovarian follicular growth by somatotropins and insulin-like growth factors in cattle. **Journal of Dairy Science**, 83,1635–1647. 2000.

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

MAILLARD V., UZBEKOVA S., GUIGNOT F., PERREAU C., RAMÉ C., COYRAL-CASTEL S., DUPONT J., Effect of adiponectin on bovine granulosa cell steroidogenesis, oocyte maturation and embryo development. **Reproductive Biology and Endocrinology**. 8, 23. 2010.

MATURANA FILHO, M, **Desempenho produtivo e reprodutivo e parâmetros sanguíneos de vacas leiteiras alimentadas com diferentes fontes de gordura durante o período de transição e início de lactação**, 2009, 102 f, Dissertação (mestrado) - Faculdade De Medicina Veterinária E Zootecnia Da Universidade De São Paulo, São Paulo, 2009.

MATURANA FILHO, M. (2013). **Tese de doutorado Efeitos das condições metabólicas de vacas leiteiras durante o período de transição e início de lactação sobre a saúde e fertilidade no inverno e no verão**. - Faculdade De Medicina Veterinária E Zootecnia Da Universidade De São Paulo, São Paulo, 2013

MCEVOY, T.G., COULL, G. D., BROADBENT, P. J., HUTCHINSON, J. S. M., E SPEAKE, B. K, "Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida," **Journal of Reproduction and Fertility**, vol. 118, no. 1, pp. 163–170, 2000.

MCEVOY, T.G., ROBINSON, J.J., ASHOWORTH, J.A., ROOKE, J.A., SINCLAIR, K.D. Feed and forage toxicants affecting embryo survival and fetal development. **Theriogenology**. 55: 113-129. 2001.

MEIKLE, P., BARLOW, C., WEIR, J., Lipidomics and lipid biomarker discovery. **Aust. Biochem**. 40, 12–16. 2009.

MOORBY, J.M., DEWHURST, R.J.,TWEED, J.K.S, DHANOA, M.S., BECK, N.F.G. Effects of altering the energy and protein supply to dairy cows during the dry period. 2. Metabolic and hormonal responses. **J Dairy Sci**, v.83, p.1795-1805, 2000.

MOORE, J. AND CHRISTIE, W. Lipid metabolism in the mammary gland of ruminant animals. **Progress in Lipid Research**, 17(4):347–395. 1979.

MOREIRA, F.; ORLANDI, C.; RISCO, C. A.; MATTOS, R.; LOPES, F.; THATCHER, W. W. Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows, **J. Dairy Sci**, v, 84, p, 1646-1659, 2001.

NAOUM. P, F. **Métodos de avaliação laboratorial Academia de Ciencias e tecnologia**. 2013.

NAVAS-IGLESIAS, N., CARRASCO-PANCORBO, A., CUADROS-RODRÍGUEZ, L. From lipids analysis towards lipidomics, a new challenge for the analytical chemistry of the 21st century. Part II: analytical lipidomics. **Trends Anal. Chem**. 28, 393–403. 2009.

NICHI, M. **Sistemas de proteção enzimática e níveis de peroxidação espontânea dos lipídios seminais de touros zebuínos e taurinos criados a campo na região de Dourados, MS.** 2003. 101 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

NSON, D. Delayed effect of heat stress on steroid production in medium-sized and preovulatory bovine follicles. *Reproduction.* ;121:745–751. 2001.

OPSOMER, G., CORYN, M., DELUYKER, H., de KRUIT, A., An analysis of ovarian dysfunction in high yielding dairy cow after calving based on progesterone profiles. **Reproduction in Domestic Animals.** 33: 193-204. 1998.

ORESIC, M., METABOLOMICS, a novel tool for studies of nutrition, metabolism and lipid dysfunction. **Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.** 19, 816–824. 2009.

OTTO J.R., FREEMAN M.J., MALAU-ADULI B.S., NICHOLS P.D., LANE P.A., MALAU-ADULI A.E.O., Reproduction and fertility parameters of dairy cows supplemented with n-3 fatty acid-rich canola oil. **Annual Research & Review in Biology.** 4, 1611–1636. 2014.

OVERTON, T. AND WALDRON, M. Nutritional Management of Transition Dairy Cows: Strategies to Optimize Metabolic Health. **Journal of Dairy Science**, 87(E. Suppl):E105 E119. 2004.

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

PATTI, G.J., YANES, O., SIUZDAK, G., Innovation: metabolomics: the apogee of the omics trilogy. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 13, 263–269. 2012.

PAWSHE, C.H., APPA RAO, K.B.C. AND 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 cells and granulosa cells in buffalo. **Molecular Reproduction and Development** 49 277–285, 1998.

PEETERS, E.; NEYT, A.; BECKERS, F.; DE SMET, S.; AUBERT, A.E.; GEERS, R. Influence of supplemental magnesium, tryptophan, vitamin C, and vitamin E on stress. v.83,p.1568-1580, 2005.

PETURSDOTTIR, A.L., FARR, S.A., MORLEY, J.E., BANKS, W.A., SKULADOTTIR, G.V. Lipid peroxidation in brain during aging in the senescence-accelerated mouse (sam). **Neurobiol. Aging.** 28, 1170–1178. 2007.

RABIEE, AR; MACMILLAN, KL; SCHWARZENBERGER, F.; Plasma, milk and faecal progesterone concentrations during the oestrous cycle of lactating dairy cows with different milk yields. **Anim Reprod Sci.** 2002; 74(3-4):121-131, 2002.

RAPAKA, R.S. Targeted lipidomics and drug abuse research. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 77, 219–222. 2005.

REIS, A., STAINES, M.E., WATT, R.G., DOLMAN, D.F. AND MCEVOY, T.G. Embryo production using defined oocyte maturation and zygote culture following repeated ovum pick-up (OPU) from FSH-stimulated Simmental heifers. **Animal Reproduction Science** 72:137–151, 2002.

RILFORS, L., LINDBLOM, G. Regulation of lipids and lipid synthesizing enzymes. Colloids Surf. B: **Biointerfaces**. 26, 112–124. 2002.

RIVERA, J. D.; DUFF, G.C.; GALYEAN, M.L.; WALKER, D.A.; NUNNERY, G.A. Efeitos of supplemental vitamin E on performance, health, and humoral immune response of beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.80, p.933–941, 2002.

RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P. et al. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Mol. Repr. Development**, v.61, p.234–248, 2002.

ROCHE J.R., BELL A.W., OVERTON T.R., LOOR J.J., Nutritional management of the transition cow in the 21st century – a paradigm shift in thinking. **Animal Production Science** 53, 1000–1023. 2013.

ROLIM A.E.H.; ROLIMA, A. E. H., HENRIQUE-ARAÚJO, R., FERRAZ, E. G., DULTRA, F. K. A. A., FERNANDEZ, L. G. Lipidomics in the study of lipid metabolism: Current perspectives in the omic sciences. **Gene** 554 131–139. 2015.

ROTH, Z., MEIDAN, R., SHAHAM-ALBALANCY, A., BRAW-TAL, R., WOLFE RUKKWAMSUK, T., WENSING, T., AND GEELLEN, M. J. Effect of overfeeding during the dry period on regulation of adipose tissue metabolism in dairy cows during the periparturient period. **Journal of dairy science**, 81(11):2904–2911. 1998.

RUKKWAMSUK, T., WENSING, T., AND GEELLEN, M. J. Effect of overfeeding during the dry period on regulation of adipose tissue metabolism in dairy cows during the periparturient period. **Journal of dairy science**, 81(11):2904–2911. 1998.

SANGSRITAVONG, S., COMBS, D.K., SARTORI, R., ARMENTANO, L.E., WILTBANK, M.C. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 beta in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 85:2831–2842. 2002.

SANTOS, J. E. P. Efeitos da nutrição e do manejo periparto na eficiência reprodutiva de vacas de leite, In: curso de novos enfoques na produção e reprodução de bovinos, 2005, Uberlândia, *Anais*, P, 29–44, 2005.

SARTORI, R., HAUGHIAN, J.M., SHAVER, R.D., ROSA, G.J.M. AND WILTBANK, M.C. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. **Journal of Dairy Science** 87: 905–920, 2004.

- SARTORI, R., SARTORBERGFELT, R., MERTENS, S. A., GUENTHER, J. N., PARRISH, J. J., WILTBANK, M. C. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. **Journal of Dairy Science**. 85, 2803-2812. 2002.
- SCHMID, M.; FOSTNER, L. A. Laboratorie Testing In Veterinary Medicine Diagnosis In The Clinical Monitoring. Mannheim: boehringer,. 253. 1986 Seppänen-Laakso, T., Oresic, M., How to study lipidomes. **J. Mol. Endocrinol.** 42, 185–190. 2009.
- SCHMID, M.; FOSTNER,. Laboratorie testing in veterinary medicine diagnosis in the clinical monitoring. **Mannheim: Boehringer**,. 253. 1986.
- SILVA, C. C., KNIGHT, P. G. Effects of androgens, progesterone and their antagonists on the development competence of in vitro matured bovine oocytes. **J. Reprod. Fertil**; 119:261-269. 2000.
- SIRISATHIEN, S. AND BRACKETT, B. G. TUNEL analyses of bovine blastocysts after culture with EGF and IGF-I. **Molecular Reproduction Development**, 65, 51-56. doi:10.1002/mrd.10263. 2003.
- SNIJDERS, S. E. M.; DILON, P. G.; O'FARREL, K. J.; DISKIN, M.; WYLIE, A. R. G.; O'CALLAGAN, D. RATH, M.; BOLAND, M. P.; et al. Genetic merit for milk production and reproductive success in dairy cows **Animal Reproduction Science** , Volume 65 , Issue 1 , 17 – 31. 2001.
- SPENER, F., VAN MEER, G., VANNIEUWENHZE, M. S., WHITE, S. H., WITZTUM, J. L., DENNIS, E. A., A comprehensive classification system for lipids. **J. Lipid Res.** 46, 839–862. 2005.
- SPICER L. J., SCHREIBER N. B., LAGALY D. V., AAD P. Y., DOUTHIT L. B., GRADO-AHUIR J. A. Effect of resistin on granulosa and theca cell function in cattle. **Animal Reproduction Science**. 124, 19–27. 2011.
- STEVENSON, J. S. D. E., TENHOUSE, R. L. KRISHER, G. C. LAMB, J. E. LARSON, C. R. DAHLEN, J. R. PURSLEY, N. M., BELLO, P. M. FRICKE, M. C. WILTBANK, D. J. BRUSVEEN, M. BURKHART, R. S. YOUNGQUIST, and GARVERICK, H. A. Detection of an ovulation by heatmount detectors and transrectal ultrasonography before treatment with progesterone in a timed insemination protocol, **Journal of Dairy Science**. 91:2901–2915, 2008.
- STRANG, B. D., BERTICS, S. J., GRUMMER, R. R., AND ARMENTANO, L. E. Effect of long-chain fatty acids on triglyceride accumulation, gluconeogenesis, and ureagenesis in bovine hepatocytes. **Journal of dairy science**, 81(3):728–739. 1998.
- STRUFALDI, B. Prática de bioquímica clínica. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 1987.

SUTTON, M.L.; GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. Effects of invivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulusoocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Human Reproduction*, 9: 35-48. 2003.

SUTTON-MCDOWALL, M., GILCHRIST, R., AND THOMPSON, J. Cumulus expansion and glucose utilization by bovine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation: the influence of glucosamine and follicle-stimulating hormone. *Reprod dev.* 128, 313–319, 2004.

THATCHER W., SANTOS J.E.P., STAPLES C.R. Dietary manipulations to improve embryonic survival in cattle. *Theriogenology*. 76, 1619–1631. 2011.

TRIFONOVA, O., LOKHOV, P., ARCHAKOV, A. Postgenomics diagnostics:metabolomics approaches to human blood profiling. *OMICS* 17, 550–559. 2013.

TRIPP. M.W.; JU, J.C.; HOAGLAND, T.A. et al. Influence of somatotropin and nutrition on bovine oocyte retrieval and in vitro development. *Theriogenology*, v.53, p.1581-1590, 2000.

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

VAN DEN TOP, a. M., Van Tol, A., Jansen, H., Geelen, M. J., and Beynen, A. C. Fatty liver in dairy cows post partum is associated with decreased concentration of plasma triacylglycerols and decreased activity of lipoprotein lipase in adipocytes. *Journal of Dairy Research*, 72(2):129–137. 2005.

VAN DER GREEF, J., STROOBANT, P., VAN DER HEIJDEN, R., The role of analytical sciences in medical systems biology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8, 559–565. 2004.

VAN MEER, G. Cellular lipidomics. *EMBO J.* 24, 3159–3165. 2005.

VAN SOOM, A., MATEUSEN, B., LEROY, J., DE KRUIF, A.; Assessment of mammalian embryo quality: what can we learn from embryo morphology? *Reproductive BioMedicine Online* 7 664-670. 2003.

VANCE, D. E., LI, Z., AND JACOBS, R. L. Hepatic phosphatidylethanolamine N-methyltransferase, unexpected roles in animal biochemistry and physiology. *The Journal of biological chemistry*, 282(46):33237–33241. 2007.

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* 60 (5), 795-807, 2003.

VAZQUEZ-AÑÓN M, BERTICS S, LUCK M, GRUMMER RR, PINHEIRO J. Peripartum liver triglyceride and plasma metabolites in dairy cows. *J Dairy Sci*, v.77, p.1521-1528, 1994.

VERNON, R. G. Lipid metabolism during lactation: a review of adipose tissue-liver interactions and the development of fatty liver. **The Journal of Dairy Research**, 72(4):460-469. 2005.

VIAANT, M.R., SOMMER, U., Mass spectrometry based environmental metabolomics: a primer and review. **Metabolomics** 9, 144–158. 2013.

VILLAS-BOAS, S.G., GOMBERT, A.K. Análise do Metaboloma — Uma ferramenta biotecnológica emergente na era pós — genômica. **Biotechnol. Cienc. Desenvolv.** 36, 58–69. 2006.

VOS, P.L.A.M. et al. Postponement of the preovulatory LH surge does not impair the developmental potential of in vivo matured oocytes from eCG/PG-superovulated heifers **Theriogenology** , Volume 45 , Issue 1 , 329, 1996.

WALDMANN, A., REKSEN, O., LANDSVERK, K., KOMMISRUDE, E., DAHL, E., REFSDAL, A.O. & ROPSTAD, E. Progesterone concentrations in milk fat at first insemination – effects on non-return and repeat-breeding. *Animal Reproduction Science* .65, 33-41. 2001.

WALLACE RL, MCCOY GC, OVERTON TR, CLARK JH. **Effect of metabolic diseases on dry matter consumption and production parameters.** Disponível em: <http://www.livestocktrail.uiuc.edu/dairynet/paperDisplay.cfm?ContentID=240>. Acessado em: 13/04/2009. 1998.

WALSH, R. B.; KELTON, D.F.; DUFFIELD, T.F.;LESLIE, K.E., WALTON, J.S.; LEBLANC, S.J. Prevalence and risk factors for postpartum anovulatory condition in dairy cows, **J. Dairy Sci**, v, 90, no, 1, 2007.

WATERS S.M., COYNE G.S., KENNY D.A., MACHUGH D.E., MORRIS D.G. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation alters the expression of genes involved in the control of fertility in the bovine uterine endometrium. **Physiological Genomics**. 44, 878–888. 2012.

WATHES D.C., ABAYASEKARA D.R.E., AITKEN R.J., Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. **Biology of Reproduction**. 77, 190–201. 2007.

WATHES D.C., CLEMPSON A.M., POLLOTT G.E. Associations between lipid metabolism and fertility in the dairy cow. **Reproduction, Fertility and Development**. 25, 48–61. 2013.

WATHES DC, FENWICK M, CHENG Z, BOURNE N, LLEWELLYN S, MORRIS DG, KENNY D, MURPHY J. FITZPATRICK R. Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow. **Theriogenology**, v.68, (Suppl.1), p.232-241, 2007.

WATSON, A.J., DE SOUSA, .P, CAVENEY, A., BARCROFT, L.C., NATALE, D., URQUHART, J.; AND WESTHUSIN, M.E. Impact of bovine oocyte maturation media on

oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. **Biology of Reproduction** 62 355–364, 2000.

WEBB, R., GARNSWORTHY, P.C., GONG, J.G., ARMSTRONG, D.G. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. **Journal Animal Science**. 82 E-Suppl:E63-74. 2004.

WEBB, R.; Garnsworthy, P, C.; Campbell, B, K.; Hunter, M, G, Intra-ovarian regulation of follicular development and oocyte competence in farm animals, **Theriogenology**, v, 68s, p, S22–S29, 2008.

WENK, M.R. Lipidomics: new tools and applications. **Cell**. 143, 888–895. 2010.

WENSING, T., KRUIP, T., GEELLEN, M. J. H., WENTINK, G. H., AND VAN DEN TOP, A. M. Postpartum Fatty Liver in High-Producing Dairy Cows in Practice and in Animal Studies. **The Connection with Health, Production and Reproduction Problems**. Comp. Haematol. Int., 7(3):167–171. 1997.

WILTBANK MC, SARTORI R, SANGSRITAVONG S, LOPEZ H, HAUGHIAN JM, FRICKE PM, GUMEN A, Novel effects of nutrition on reproduction in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science** Suppl 84, 32 (abstract). 2001.

WILTBANK, MILO. Novos estudos sobre cistos foliculares e outras condições anovulatórias, Novos Enfoques Na Produção E Reprodução De Bovinos, 8, Uberlândia, **Anais**, 2004.

YAO, Z. ; VANCE, D. E. Reduction in VLDL, but not HDL, in plasma of rats deficient 1990

YETUKURI, L., EKROOS, K., VIDAL-PUIG, A., ORESIC, M., Informatics and computational strategies for the study of lipids. **Mol. BioSyst**. 4, 121–127. 2008.

ZAMBONI, L. Fine morphology of the follicle cell-oocyte association. **Biology of Reproduction** 10: 125-149. 1974.

ZERHOUNI E. Medicine. The NIH Roadmap. **Science**. Oct 3; 302(5642):63-72. 2003.

ZHU, L. H., ARMENTANO, L. E., BREMMER, D. R., GRUMMER, R. R., AND BERTICS, S. J. Plasma concentration of urea, ammonia, glutamine around calving, and the relation of hepatic triglyceride, to plasma ammonia removal and blood acid-base balance. **Journal of dairy science**, 83(4):734–740. 110. 2000.

Principais Perfis Lipídicos por amostra (220 tests)

Lipídio		Classificação
CE 16:0+NH4	CE 18:2+NH4	Colesterol Ester
CE 16:1+NH4	CE 18:3+NH4	
CE 18:0+NH4	CE 20:1+NH4	
CE 18:1+NH4	CE 20:3+NH4	
	CE 20:4+NH4	
DAG 40:0+NH4		Diacylgliceróis
GlcE 10:3		Lysolphosphatidilcoline
Hex2Cer 40:1;2		
LPC 16:0	LPC 20:3	
LPC 16:1	LPC 20:4	
LPC 18:0	LPC 20:5	
LPC 18:1	LPC 28:6	
LPC 18:2	LPC 30:6	
LPC 18:3	LPS 26:0	
	LPS 28:6	
MADAG 46:1+NH4		Monoacildiacilglicerol
MADAG 48:0+NH4		
MADAG 52:7+NH4		
MADAG 52:8+NH4		
MADAG 54:8+NH4		
MADAG 70:5+NH4		
MAG 20:0+NH4		Monoacilglicerol
MAG 22:0+NH4		
MGMG 22:6+NH4		Mannosyl-inositol phosphoceramide
MIPC 32:0;3		
MIPC 32:1;3		
NAPE 38:0+NH4	NAPE 58:7+NH4	N-Acilfosfatidiletanolaminas
NAPE 40:0+NH4	NAPE 60:4+NH4	
NAPE 50:1+NH4	NAPE 60:6+NH4	
NAPE 52:1+NH4	NAPE 60:7+NH4	
NAPE 52:6+NH4	NAPE 60:8+NH4	
NAPE 54:0+NH4	NAPE 60:9+NH4	
NAPE 54:1+NH4	NAPE 62:10+NH4	
NAPE 54:6+NH4	NAPE 62:11+NH4	
NAPE 56:0+NH4	NAPE 62:12+NH4	
NAPE 56:1+NH4	NAPE 62:4+NH4	
NAPE 56:2+NH4	NAPE 62:9+NH4	
NAPE 56:6+NH4	NAPE 64:0+NH4	
NAPE 56:7+NH4	NAPE 64:1+NH4	

NAPE 56:8+NH4	NAPE 64:2+NH4	
NAPE 58:1+NH4	NAPE 66:2+NH4	
NAPE 58:6+NH4	NAPE 66:3+NH4	
PC 24:7	PC 36:1	Phosphatidilcoline
PC 26:0	PC 36:10	
PC 28:0	PC 36:2	
PC 28:1	PC 36:3	
PC 28:6	PC 36:4	
PC 30:0	PC 36:5	
PC 30:1	PC 36:7	
PC 30:2	PC 36:8	
PC 30:7	PC 36:9	
PC 30:8	PC 38:0	
PC 32:0	PC 38:1	
PC 32:1	PC 38:10	
PC 32:10	PC 38:2	
PC 32:2	PC 38:3	
PC 32:3	PC 38:4	
PC 32:4	PC 38:5	
PC 32:7	PC 38:6	
PC 32:8	PC 38:7	
PC 32:9	PC 38:8	
PC 34:0	PC 38:9	
PC 34:1	PC 40:10	
PC 34:10	PC 40:2	
PC 34:2	PC 40:3	
PC 34:3	PC 40:4	
PC 34:4	PC 40:5	
PC 34:5	PC 40:6	
PC 34:7	PC 40:8	
PC 34:8	PC 40:9	
PC 34:9	PC 42:9	
PC 36:0	PC 46:10	
	PC 48:10	
PE 36:2		Fosfatidiletanolaminas
PE 36:3		
PE 36:4		
PE 38:4		
PG 28:2+NH4		
PS 28:0		
PS 36:5		
PS 38:5		
SM 30:2;4	SM 38:2;4	Sphingomieline

SM 30:3;4	SM 38:3;2	
SM 32:1;3	SM 38:3;3	
SM 32:2;3	SM 38:3;4	
SM 32:2;4	SM 38:4;2	
SM 32:3;4	SM 38:4;3	
SM 32:4;4	SM 38:4;4	
SM 34:0;3	SM 40:0;2	
SM 34:1;4	SM 40:0;3	
SM 34:2;3	SM 40:1;3	
SM 34:2;4	SM 40:1;4	
SM 34:3;3	SM 40:2;3	
SM 34:3;4	SM 40:2;4	
SM 34:4;4	SM 40:3;2	
SM 36:0;3	SM 40:3;3	
SM 36:1;3	SM 40:3;4	
SM 36:1;4	SM 40:4;2	
SM 36:2;3	SM 40:4;3	
SM 36:2;4	SM 40:4;4	
SM 36:3;2	SM 42:0;3	
SM 36:3;3	SM 42:1;3	
SM 36:3;4	SM 42:2;3	
SM 36:4;3	SM 42:3;2	
SM 36:4;4	SM 42:3;3	
SM 38:0;3	SM 42:3;4	
SM 38:0;4	SM 42:4;2	
SM 38:1;3	SM 42:4;3	
SM 38:1;4	SM 44:3;2	
SM 38:2;3	SM 44:4;2	
TAG 38:2+NH4	TAG 62:1+NH4	Triglicerídeos
TAG 42:0+NH4	TAG 62:2+NH4	
TAG 44:0+NH4	TAG 64:0+NH4	
TAG 44:5+NH4	TAG 64:1+NH4	
TAG 50:7+NH4	TAG 64:2+NH4	
TAG 52:0+NH4	TAG 66:0+NH4	
TAG 52:2+NH4	TAG 66:1+NH4	
TAG 52:7+NH4	TAG 66:8+NH4	
TAG 54:0+NH4	TAG 68:1+NH4	
TAG 54:1+NH4	TAG 68:2+NH4	
TAG 54:2+NH4	TAG 68:3+NH4	
TAG 60:1+NH4	TAG 70:3+NH4	
	TAG 70:4+NH4	
CL 48:2		Cholesterol
CL 60:6		

CL 64:6	
CL 68:6	
CL 82:8	
CL 82:9	
CL 88:2	
LDMPE 22:5	
NAPE 40:0	N-Acilfosfatidiletanolaminas
NAPE 42:0	
NAPE 42:1	
OAFA 18:1/ 18:1	
PIP3 34:1	Fosfatidilinositol tri fosfato
SM 36:1;4	Sphingomielina