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

**Influência da alta ou baixa ingestão de matéria seca e/ou energia na
produção *in vitro* de embriões bovinos**

Alexandre Barbieri Prata

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência
Animal e Pastagens

**Piracicaba
2013**

Alexandre Barbieri Prata
Médico Veterinário

**Influência da alta ou baixa ingestão de matéria seca e/ou energia na produção
in vitro de embriões bovinos**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **ROBERTO SARTORI FILHO**

Dissertação apresentada para obtenção do
título de Mestre em Ciências. Área de
concentração: Ciência Animal e Pastagens

**Piracicaba
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP

Prata, Alexandre Barbieri

Influência da alta ou baixa ingestão de matéria seca e/ou energia na produção *in vitro* de embriões bovinos / Alexandre Barbieri Prata.- - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2013.
71 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. Bovinos 2. Concepção 3. Dieta animal 4. Fertilização "in vitro" animal 5. Ingestão alimentar 5. Matéria seca do alimento 6. Oócitos I. Título

CDD 636.2084
P912i

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Aos meus pais, Luiz Francisco Prata e Alda Maria Barbieri Prata, por serem meus exemplos de vida, meu porto seguro e pela fé que em mim depositam. Amo vocês.

Aos meus queridos irmãos Camila Barbieri Prata e Bruno Barbieri Prata que me ajudaram e torceram muito para a realização deste objetivo.

Aos amigos pelo amor, carinho, paciência e conhecimento em todos os momentos.

À minha paixão maior, meu filho Pedro, por me oferecer o melhor momento da minha vida.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e ao Departamento de Zootecnia pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

Ao meu orientador Prof. Dr. Roberto Sartori Filho pela oportunidade dada, confiança, amizade, companheirismo, apoio e GRANDES ensinamentos. Tenho certeza que aprendi muito durante esse período, e muito desse conhecimento devo ao senhor. Muito obrigado Professor.

Aos funcionários do Departamento de Zootecnia da ESALQ, que sempre nos ajudaram com os vários problemas que surgiram. Muito obrigado.

Aos amigos e companheiros do grupo de trabalho: Fernanda Zinsly de Mattos, Amanda Prudêncio Lemes, Michele Ricieri Bastos, Monique Guardieiro, José Carvalho Neto, Maria Clara Mattos, Murillo Meschiatti, Igor Sokoloski, Fernanda Moura, Pedro Leopoldo Jerônimo Monteiro Jr, Aníbal Ballarotti, Louise Oliveira e Guilherme Pontes pela grande amizade demonstrada, pelo ombro amigo nos momentos de dificuldade, pelos momentos felizes que me proporcionaram. Aprendi muito com vocês! Muito obrigado.

Aos companheiros de experimento um agradecimento especial: Ricardo da Silva Surjus, Marta Borsatto e Mariana Curci, sem vocês tudo seria muito mais difícil, MUITO OBRIGADO pela ajuda, amizade e apoio.

Aos ilustres professores do Departamento de Zootecnia por contribuírem direta ou indiretamente para minha formação.

Ao Prof. Dr. Milo Wiltbank que com muita simpatia e paciência nos ajudou muito, passando conhecimentos fundamentais e ajudando incansavelmente nos experimentos.

Ao pessoal da In Vitro Brasil, em especial ao Dr. José Henrique Pontes e Dra. Andréa Basso que nos receberam de portas abertas para a realização desta parceria que foi fundamental para a execução do experimento. Muito obrigado.

Ao pessoal da Fazenda Figueira, em especial ao Eng. Agrônomo José Renato Silva Gonçalves e a Eng. Agrônoma Laísse Garcia de Lima que nos ajudaram com a disponibilização dos animais e da mão de obra dos funcionários que foi de fundamental importância para a realização das sincronizações e TEs do experimento. Muito obrigado.

Aos amigos de Jaboticabal que são como irmãos para mim! Muito obrigado por todos esses anos de grande amizade!

Aos meus pais e irmãos muito obrigado pelo carinho, amor, ensinamentos, dedicação e apoio nesta etapa da minha vida! Sem vocês nada disso teria acontecido! Um eterno OBRIGADO! AMO VOCÊS!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

À Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão do auxílio à pesquisa.

Finalmente, agradeço a Deus por me proporcionar mais esta etapa e estar ao lado de pessoas muito especiais!

Muito obrigado!

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos”.

Marcel Proust

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	12
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS	15
LISTA DE ABREVIATURAS	17
1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Influência da nutrição na reprodução	21
2.2 Influência da nutrição na recuperação e qualidade do ovócito	26
2.3 Influência da nutrição na produção e qualidade do embrião	28
3 OBJETIVO.....	33
4 HIPÓTESES.....	35
5 MATERIAL E MÉTODOS	37
5.1 Animais.....	37
5.2 Dietas e grupos experimentais	37
5.3 Aspiração folicular guiada por ultrassonografia	39
5.4 Produção <i>in vitro</i> de embriões.....	41
5.4.1 Maturação <i>in vitro</i>	41
5.4.2 Fecundação <i>in vitro</i>	41
5.4.3 Cultivo <i>in vitro</i>	41
5.4.4 Vitrificação e desvitrificação	42
5.5 Inovulação dos embriões e Diagnóstico de gestação.....	42
5.6 Análise Estatística	43
6 RESULTADOS	45
6.1 Avaliação do peso e ECC.....	45
6.2 Avaliação da quantidade e qualidade ovocitária	45
6.3 Avaliação da produção <i>in vitro</i> de embriões.....	47
6.4 Taxa de concepção aos 30 e 60 dias	49
7 DISCUSSÃO	53
8 CONCLUSÕES	59
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES.....	61
REFERÊNCIAS.....	63

RESUMO

Influência da alta ou baixa ingestão de matéria seca e/ou energia na produção *in vitro* de embriões bovinos

Objetivou-se no presente estudo avaliar a influência da alta ou baixa ingestão de matéria seca e/ou energia na qualidade ovocitária, produção *in vitro* de embriões e taxa de concepção. Foram utilizadas 33 vacas Nelores não lactantes, idade entre 4 e 10 anos, peso corporal (PC) de $489,5 \pm 11,3$ kg e escore de condição corporal (ECC) de 3,25. As vacas foram mantidas confinadas em baias, sem acesso a pastagem, com dois animais por baia. Sal mineral foi fornecido na dieta e água à vontade. Após 15 dias de adaptação, os animais foram agrupados de acordo com o PC e divididos aleatoriamente em quatro grupos. As vacas do grupo manutenção (M) receberam dieta de manutenção do PC consumindo 1,2% de MS por kg de PC. O grupo restrição (0,7M) recebeu o equivalente a 70% do fornecido ao grupo M, ou seja, 0,84% de MS por kg de PC. O grupo alta ingestão (1,5M) recebeu o equivalente a 150% do oferecido ao grupo M, ou seja, 1,8% de MS por kg de PC. O grupo energia (E) recebeu uma dieta com quantidade de MS semelhante ao grupo M, porém, com níveis energéticos equivalentes ao grupo 1,5M. O delineamento foi em quadrado latino, portanto, os animais passaram por todas as dietas. Foram realizadas quatro seções de OPU com 37 dias de intervalo. Os ovócitos recuperados foram classificados e levados ao laboratório da In Vitro Brasil, onde, os procedimentos da PIVE foram realizados. Os embriões foram vitrificados/desvitrificados e inovulados em receptoras sincronizadas na Fazenda Figueira, Londrina, PR. Os dados foram analisados por meio do PROC GLIMMIX do SAS e as médias apresentadas na forma de quadrados mínimos $\pm$ EP, seguindo a ordem dos grupos M, 0,7M, 1,5M e E. Observou-se efeito de grupo ($P=0,008$) no número de ovócitos viáveis, sendo que as vacas do grupo 0,7M produziram mais ovócitos viáveis do que os grupos M e E ($14,4 \pm 1,6^b$; $17,0 \pm 1,9^a$; $15,7 \pm 1,7^{ab}$ e $14,1 \pm 1,6^b$). No total de ovócitos recuperados, o grupo 0,7M diferiu ($P=0,02$) dos grupos M e E ($20,2 \pm 2,0^b$; $23,0 \pm 2,3^a$; $21,5 \pm 2,2^{ab}$ e $20,1 \pm 2,0^b$). Em relação aos clivados o grupo 0,7M diferiu ($P=0,04$) do grupo M ($10,7 \pm 1,4^b$; $13,4 \pm 1,7^a$; $12,6 \pm 1,6^{ab}$ e $11,7 \pm 1,5^{ab}$). O número de blastocistos foi similar ($P=0,15$) entre os grupos ($5,4 \pm 0,8$; $6,9 \pm 0,9$; $5,9 \pm 0,8$; $6,6 \pm 0,9$). Com relação à porcentagem de ovócitos viáveis sobre o total não houve diferença ($P=0,41$) entre os grupos ($72,8 \pm 0,02\%$; $75,4 \pm 0,02\%$; $72,9 \pm 0,02\%$ e $71,7 \pm 0,02\%$). Não se observou diferença ($P=0,67$) na porcentagem de blastocistos sobre o total de ovócitos ($31,9 \pm 0,04\%$; $30,6 \pm 0,04\%$; $31,1 \pm 0,04\%$ e $34,0 \pm 0,04\%$). A taxa de concepção aos 30 ($30,3 \pm 0,06\%$; $34,4 \pm 0,06\%$; $26,3 \pm 0,06\%$ e $30,5 \pm 0,06\%$; $P=0,49$) e aos 60 dias ($20,8 \pm 0,05\%$; $26,3 \pm 0,05\%$; $18,1 \pm 0,05\%$ e $22,0 \pm 0,05\%$; $P=0,43$) não diferiu entre os tratamentos. Com relação à perda gestacional, não houve diferença ($P=0,84$) entre os grupos ($20,0 \pm 0,05\%$; $13,3 \pm 0,05\%$; $18,0 \pm 0,05\%$ e $16,0 \pm 0,05\%$). Apesar de ter havido uma discreta vantagem do grupo 0,7M no número de ovócitos viáveis, totais e na clivagem em relação aos demais grupos, isso não refletiu na produção de blastocistos. Da mesma forma, contrariando a hipótese inicial a alta IMS ou energia por um período de 30 dias não parece ter comprometido a PIVE e a taxa de concepção.

Palavras-chave: Ingestão alimentar; Ovócitos; PIVE; Concepção

ABSTRACT

Influence of high or low intake of dry matter/energy on *in vitro* production of bovine embryos

The aim of this study was to evaluate the influence of high or low dry matter intake and/or energy on oocyte quality and embryo production *in vitro*. 33 non lactating Nellore cows, aged between 4 and 10 years, body weight (BW) of 489.5 ± 11.3 kg and body condition score (BCS) 3.25 were used. The cows were confined without access to pasture, with two animals per stall. Mineral salt was provided in the diet and water *ad libitum*. After 15 days on the adaptation diet, cows were blocked by initial weight and randomly allocated in four experimental groups. The maintenance group (M) received a diet of weight maintenance consuming 1.2% of DM per kg of BW. The restriction group (0,7M) received the equivalent of 70% of the group M diet consuming 0.84% of DM per kg of BW. High intake group (1,5M) received the equivalent of 150% of the M group offered. Since the energy group (E) received a diet with DM similar to M group, however, with energy level equivalent to 1,5M. The cows received all the diets in a latin-square design. There were four sessions of ovum pick up (OPU), 37 days apart. The oocytes were classified and taken to the In Vitro Brazil laboratory, where all procedures of *in vitro* production were realized. The embryos were vitrified and then thawed and transferred to synchronized recipients at Figueira Farm, Londrina, PR. Data were analyzed by PROC GLIMMIX of SAS and the results were presented as least squares means $\pm$ SE following the order of treatments M, 0,7M, 1,5M and E. Treatment effect was observed ($P=0.008$) in the number of viable oocytes. The group 0,7M showed better results compared to groups M and E (14.4 ± 1.6^b ; 17.0 ± 1.9^a ; 15.7 ± 1.7^{ab} and 14.1 ± 1.6^b). In the total number of recovered oocytes, the group 0,7M ($P=0.02$) differed from groups M and E, but did not differ from group 1,5M (20.2 ± 2.0^b ; 23.0 ± 2.3^a ; 21.5 ± 2.2^{ab} and 20.1 ± 2.0^b). In the analyses of cleaved the group 0,7M was different from group M (10.7 ± 1.4^b ; 13.4 ± 1.7^a ; 12.6 ± 1.6^{ab} and 11.7 ± 1.5^{ab}). The number of blastocysts was similar ($P=0.15$) between treatments (5.4 ± 0.8 ; 6.9 ± 0.9 ; 5.9 ± 0.8 and 6.6 ± 0.9). The percentage of viable oocytes was not different ($P=0.41$) between groups ($72.8 \pm 0.02\%$, $75.4 \pm 0.02\%$, $72.9 \pm 0.02\%$ and $71.7 \pm 0.02\%$). There was also no difference in the percentage of blastocysts among groups ($31.9 \pm 0.04\%$; $30.6 \pm 0.04\%$; $31.1 \pm 0.04\%$ and $34.0 \pm 0.04\%$). The conception rate at 30 days ($30.3 \pm 0.06\%$; $34.4 \pm 0.06\%$; $26.3 \pm 0.06\%$ and $30.5 \pm 0.06\%$; $P=0.49$) and at 60 days ($20.8 \pm 0.05\%$; $26.3 \pm 0.05\%$; $18.1 \pm 0.05\%$ and $22.0 \pm 0.05\%$; $P=0.43$) did not differ among treatments. Pregnancy loss also did not differ ($P=0.84$) among groups ($20.0 \pm 0.05\%$; $13.3 \pm 0.05\%$; $18.0 \pm 0.05\%$ e $16.0 \pm 0.05\%$). Although there was an apparent advantage of food restriction on the number of viable, total oocytes and cleavage compared to other groups, this did not reflect in the blastocyst production. Likewise, contrasting with the initial hypothesis high DMI or energy intake for a period of 30 days does not seem to have compromised the IVP and conception rate following the transfer of these embryos.

Keywords: Dietary intake; Oocyte; IVP; Conception

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Confinamento da área experimental da ESALQ-USP, vacas utilizadas no experimento, disposição de duas vacas por baia e divididas de acordo com o peso corporal depois do período de adaptação na primeira réplica do experimento.....37
- Figura 2 – Cronograma Experimental. As vacas passaram por um período de adaptação de 15 dias e posteriormente foram alocados em um dos quatro tratamentos, sendo que, após 30 dias do início da dieta todos os animais passaram por uma seção de aspiração folicular (OPU).39
- Figura 3 – Ilustração esquemática do protocolo de sincronização para receptoras de embrião. D0: inserção de um dispositivo de liberação de P4 e 2 mg de Benzoato de Estradiol (BE). D8: aplicação de 0,6 mg de Cipionato de Estradiol (ECP), 0,5 mg de Cloprostenol sódico (PGF2_α) e 300 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG). D16 e 17: inovulação dos embriões.....43
- Figura 4 – Porcentagem de ovócitos viáveis sobre o total de ovócitos recuperados de acordo com os tratamentos M (manutenção), 0,7M (restrição alimentar), 1,5M (alta ingestão de MS) e E (alta ingestão de energia) após 4 sessões de aspiração folicular ($P = 0,41$).47
- Figura 5 – Taxa de clivagem (clivados/total de ovócitos recuperados) de acordo com os tratamentos M (manutenção), 0,7M (restrição alimentar), 1,5M (alta ingestão de MS) e E (alta ingestão de energia) após 4 sessões de aspiração folicular ($P = 0,25$).....48
- Figura 6 – Taxa de blastocisto (blastocistos/total de ovócitos recuperados) de acordo com os tratamentos M (manutenção), 0,7M (restrição alimentar), 1,5M (alta ingestão de MS) e E (alta ingestão de energia) após 4 sessões de aspiração folicular ($P = 0,67$).....48
- Figura 7 – Porcentagem de blastocistos sobre o total de clivados de acordo com os tratamentos M (manutenção), 0,7M (restrição alimentar), 1,5M (alta ingestão de MS) e E (alta ingestão de energia) após 4 sessões de aspiração folicular ($P = 0,14$)49
- Figura 8 – Taxa de concepção aos 30 ($P = 0,49$) e 60 ($P = 0,43$) dias de gestação de receptoras previamente sincronizadas que receberam embriões

produzidos *in vitro* de vacas ingerindo dietas de manutenção (M), restrição alimentar (0,7M), alta ingestão de MS (1,5M) e alta ingestão de energia (E) após 4 sessões de aspiração folicular..... 50

Figura 9 – Perda gestacional (%) entre 30 e 60 dias de gestação de receptoras reviamamente sincronizadas que receberam embriões produzidos *in vitro* de vacas ingerindo dietas de manutenção (M), restrição alimentar (0,7M), alta ingestão de MS (1,5M) e alta ingestão de energia (E) após 4 sessões de aspiração folicular (P = 0,84)..... 51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Porcentagem dos componentes, nutrientes digestíveis totais (NDT) e proteína bruta (PB) das dietas experimentais.....	38
Tabela 2 - Índices corporais (média $\pm$ EP) em vacas ingerindo dietas de manutenção (M), restrição alimentar (0,7M), alta ingestão de MS (1,5M) e alta ingestão de energia (E) durante períodos de 45 dias.....	45
Tabela 3 - Quantidade e qualidade ovocitária (média $\pm$ EP) em vacas ingerindo dietas de manutenção (M), restrição alimentar (0,7M), alta ingestão de MS (1,5M) e alta ingestão de energia (E) submetidas a 4 sessões de aspiração folicular.	46
Tabela 4 - Número de estruturas clivadas e de blastocistos (média $\pm$ EP) em vacas ingerindo dietas de manutenção (M), restrição alimentar (0,7M), alta ingestão de MS (1,5M) e alta ingestão de energia (E) submetidas a 4 sessões de aspiração folicular.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS

AIMS	- Alta ingestão de matéria seca
BE	- Benzoato de estradiol
BEN	- Balanço Energético Negativo
CCO	- Complexo-cúmulus-ovócito
CL	- Corpo lúteo
D	- Dia
E2	- Estradiol
ECC	- Escore de condição corporal
eCG	- Gonadotrofina coriônica equina
ECP	- Cipionato de estradiol
FSH	- Hormônio folículo estimulante
G	- Grama
GH	- Hormônio do crescimento
GLUT	- Transportador de glicose dependente de insulina
GnRH	- Hormônio liberador de gonadotrofinas
hCG	- Gonadotrofina coriônica humana
Hg	- Mercúrio
IA	- Inseminação artificial
IATF	- Inseminação artificial em tempo fixo
IBGE	- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFN- τ	- Interferon-tau
IGF	- Fator de crescimento semelhante a insulina
IGF-I	- Fator de crescimento semelhante a insulina I
IGFBP	- Proteína ligadora ao fator de crescimento semelhante a insulina
IGF-IR	- Receptor para o fator de crescimento semelhante a insulina
LH	- Hormônio luteinizante
mL	- mililitros
mm	- milímetros
μ g	- micrograma
μ L	- microlitro

µm	- micrometro
MS	- Matéria seca
NDT	- Nutrientes digestíveis totais
NPY	- Neuropeptídio Y
OPU	- Ovum pick up
P4	- Progesterona
PB	- Proteína bruta
PC	- Peso corporal
PGF2α	- Prostaglandina F2alfa
PIVE	- Produção <i>in vitro</i> de embriões
rpm	- rotações por minuto
SFB	- Soro fetal bovino
TE	- Transferência de embrião
UI	- Unidade Internacional

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a pecuária brasileira conta com um dos maiores rebanhos comerciais do mundo, cerca de 209.541 milhões de cabeças (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2010) e produziu 9,03 milhões de toneladas de carne bovina em 2011, representando 15,9% do total mundial, ficando apenas atrás dos Estados Unidos. No entanto, quando se verifica a produção mundial de carne bovina nos últimos 20 anos, observa-se que a produção no mundo aumentou cerca de 13%, enquanto que a brasileira foi de 65%. Com relação à exportação, nos mesmos 20 anos, o volume exportado aumentou 295,5%, representando 16,8% do total exportado, ficando atrás somente da Índia (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA, 2012)

Neste contexto, pode-se notar um grande aumento na produtividade da pecuária nacional, e este avanço é devido a melhorias no manejo, na sanidade, na nutrição e reprodução. Com relação à reprodução algumas medidas podem ser citadas para exemplificar este aumento na produção, como, a inseminação artificial (IA), inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e a produção *in vitro* de embriões (PIVE). Estas biotecnologias reprodutivas estão sendo amplamente utilizadas e desenvolvidas para aumentar a eficiência reprodutiva, aumentando a produção de animais geneticamente superiores e no caso da PIVE a obtenção de um maior número de descendentes, em um curto período de tempo.

Dentre as biotecnologias associadas à reprodução citadas acima, a PIVE tem tido uma participação importante, principalmente na raça Nelore, que é a raça predominante do rebanho nacional. Deste modo, o Brasil se tornou o maior produtor de embriões *in vitro* com mais de 270.000 embriões transferíveis produzidos em 2010, sendo responsável por mais de 80% da produção mundial (STRAUD; CALLESEN, 2012). Esses números só foram possíveis de serem alcançados devido à grande população folicular das vacas zebuínas, à grande quantidade de laboratórios particulares com domínio da técnica, pela possibilidade de se repetir a técnica em um menor período de tempo, além de ser viável em doadoras com infertilidade extra ovariana.

Porém, esta biotecnologia ainda apresenta resultados variáveis e aquém do ideal (THIBIER, 2006). Uma das razões para isso é o inadequado manejo nutricional das doadoras de ovócitos. Estudo realizado por Greer, Staigmiller e Parrish (1992)

mostra que a dieta oferecida antes da aspiração folicular pode influenciar e gerar alta variabilidade nas taxas de desenvolvimento *in vitro* de embriões. Frequentemente é observado excesso de alimentação para estes animais. Isto é devido ao atual padrão estabelecido para se avaliar bovinos de alto mérito genético e zootécnico, que estimula criadores a promover excesso de peso nesses animais. Alguns estudos já demonstraram que a alimentação excessiva, acima das exigências de manutenção, produção e crescimento pode ocasionar problemas reprodutivos e menor desempenho nas biotecnologias como a PIVE (ARSMSTRONG; GONG; WEBB, 2003; ADAMIAK et al., 2005).

Além disso, já foi observado que animais com alta ingestão alimentar possuem um maior metabolismo hepático levando a diminuição das concentrações circulantes de hormônios esteróides, como estradiol (E2) e progesterona (P4). Esta queda nas concentrações circulantes, se deve a maior taxa de degradação hepática desses hormônios (SANGSRITAVONG et al., 2002; VASCONCELOS et al., 2003), podendo levar a diminuição da eficiência reprodutiva.

Associado a alta ingestão alimentar outro ponto importante é a densidade energética da dieta, que a curto e em longo prazo podem provocar alterações na reprodução. Estudo recente de Sales et al. (2011) mostrou que vacas *Bos indicus* submetidas a altos níveis de energia na dieta tiveram a produção *in vitro* de embriões prejudicada após 60 dias de fornecimento da dieta.

Diante destas informações sobre o efeito da nutrição na reprodução, é importante um conhecimento mais profundo da influência da alta ou baixa ingestão de matéria seca ou energia na produção *in vitro* de embriões em vacas Nelore e posterior taxa de concepção destes embriões submetidos à transferência de embrião (TE). Este bom entendimento se torna necessário devido ao Brasil ocupar lugar de destaque neste segmento e para que os resultados desta biotecnologia reprodutiva sejam melhorados e menos variáveis.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Influência da nutrição na reprodução

A nutrição é um dos fatores que mais afetam a eficiência reprodutiva de fêmeas bovinas, mas os mecanismos específicos pelos quais a dieta influencia a reprodução ainda permanecem pouco entendidos e precisam ser elucidados.

A ingestão de nutrientes age em vários níveis do eixo hipotálamo-hipófise-gônada e afeta fatores de crescimento de origem sistêmica ou local que controlam direta ou indiretamente a função ovariana e a produção embrionária (ARMSTRONG et al., 2001; GONG et al., 2002a). Isto se deve a participação da nutrição no desenvolvimento folicular, através de mecanismos de sinalização metabólica (SCARAMUZZI et al., 2006) e alteração no metabolismo de alguns hormônios como E2 e P4 devido a mudanças no fluxo sanguíneo hepático (SANGSRITAVONG et al., 2002). Assim, uma dieta de alta ingestão alimentar induziria ao aumento do fluxo sanguíneo hepático, e conseqüentemente a um maior metabolismo e taxa de degradação de E2 e P4 culminando com uma reduzida concentração circulante desses hormônios. Nolan et al. (1998) e Santos (2005) relatam uma maior concentração sérica de P4 em novilhas ou vacas recebendo dietas de restrição comparadas às de maior ingestão. Resultado semelhante foi descrito por Martins et al. (2007), que observaram maiores concentrações de E2 em vacas zebuínas não lactantes submetidas à restrição alimentar em comparação com as vacas que estavam em alta ingestão.

O desenvolvimento folicular pode ser influenciado tanto pelo excesso quanto pela escassez de nutrientes disponíveis para a ingestão. Alguns autores relatam que grandes quantidades de energia na dieta podem aumentar o número de folículos recrutados na onda folicular (GUTIERREZ et al., 1997; GONG et al., 2002b) e com isso melhorar a resposta superovulatória para colheita de embriões *in vivo* e também para aumentar o número de folículos aspirados para a produção de embriões *in vitro*. Este aumento de energia na dieta pode influenciar o recrutamento de folículos pequenos, porém, não altera as concentrações do hormônio folículo estimulante (FSH) (GUTIERREZ et al., 1997; ARMSTRONG et al., 2001; GONG et al., 2002a), resultando em um maior número de folículos ovulados após tratamento para superovulação. Este maior número de folículos ovulados pode estar relacionado à

maior concentração plasmática de fatores de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) e insulina (FRERET et al., 2006). Isto pode estar acontecendo porque na fase em que os folículos não são dependentes de gonadotrofinas, mas sim de fatores de crescimento, existe uma grande influência destes fatores na estimulação folicular, sobretudo de IGF (WEBB et al., 2004). Deste modo, o recrutamento folicular potencialmente pode ser alterado de acordo com a nutrição oferecida, pois, as concentrações de IGF estão altamente relacionadas à dieta ingerida.

Além do IGF e da insulina, outros hormônios como leptina e hormônio do crescimento (GH), também podem estar mediando o efeito da nutrição na função ovariana, no entanto os mecanismo e interações destes hormônios ainda não estão bem elucidados.

Dentre estes hormônios, o GH pode sofrer efeito da dieta. Foi observado aumento de GH quando se adicionou gordura na dieta de animais que estavam mantendo o peso. Este aumento no GH não foi acompanhado de aumento no IGF-I sérico, porém, ocorreu aumento na população de folículos médios (4,0 a 9,9mm) e aumento de IGF-I no fluido folicular, mostrando que o GH pode ter efeito direto no ovário (THOMAS; BAO; WILLIAMS, 1997). Isto pode ser suportado pelo fato de que já foram encontrados receptores para GH em tecido ovariano de bovinos (COHICK et al., 1996). Segundo Fortune (2003), camundongos transgênicos com super-expressão de GH bovino apresentaram aumento no número de folículos pré-antrais e antrais, e camundongos sem receptores de GH tiveram concentrações plasmáticas de IGF-I reduzidas. Já o tratamento com GH recombinante em novilhas púberes resultou em aumento no número de folículos pequenos, mas não de grandes (GONG; BRAMLEY; WEBB, 1991; BURATINI Jr et al., 2000).

Chase et al. (1998) estudaram bovinos com deficiência de receptores de GH, os quais apresentaram concentrações altas anormais de GH e baixas de IGF-I, sem alteração nas concentrações de gonadotrofinas, mas com crescimento folicular e desenvolvimento do CL alterados. Estes descreveram que em situações em que há deficiência de receptores para o GH, ele não estimula a liberação de IGF-I, levando ao aumento de GH devido à ausência do *feedback* negativo provocado pelo IGF-I, o qual é o seu regulador primário.

Foi observado um aumento no GH circulante em novilhas com dieta restrita acompanhado de decréscimo nas concentrações circulantes de IGF-I, indicando que o fígado é insensível ao GH em animais subnutridos e a causa desta resposta

reduzida no fígado ao GH envolve um decréscimo de receptores hepáticos de GH (BOSSIS et al., 1999).

Decréscimo na concentração circulante de GH foi associado a um aumento em pequenos folículos em novilhas superalimentadas. Este aumento de pequenos folículos foi correlacionado ao aumento de insulina sérica e não às concentrações de GH e IGF-I (GUTIERREZ et al., 1997; GONG et al., 2002a).

Por outro lado, em revisão realizada por Sartori et al. (2007), a alta ingestão de matéria seca pode reduzir o número de folículos recrutados e interferir no desenvolvimento final do folículo. Confirmando esta hipótese, Mollo et al. (2007a) trabalhando com novilhas Nelore sob alta ou baixa ingestão alimentar, observaram que os animais que estavam em dieta de alta ingestão apresentaram folículos de maior diâmetro, menor duração e intensidade de estro do que as novilhas que estavam em restrição alimentar, porém, o pico pré-ovulatório de E2 foi semelhante entre os grupos. Já em outro estudo realizado por Martins et al. (2008), vacas Nelore sob restrição alimentar apresentaram pico pré-ovulatório de E2 mais elevado do que as vacas superalimentadas. Resultado parecido foi encontrado quando se avaliou tamanho de corpo lúteo e concentração circulante de P4 em vacas de alta produção de leite e novilhas, no qual, as vacas apresentaram menor concentração de P4 apesar do maior diâmetro do CL, este resultado, provavelmente, é devido a maior ingestão alimentar das vacas lactantes (SARTORI et al., 2004).

Além de alterar o desenvolvimento folicular, concentrações reduzidas de P4 e E2 podem afetar a viabilidade de ovócitos e embriões (citado por SARTORI et al., 2007). Mecanismos, tais como, transporte de gametas, fecundação e desenvolvimento embrionário inicial sofrem influência de hormônios esteróides ovarianos. O crescimento folicular prolongado em vacas com baixos níveis de P4 resultou em fertilidade reduzida (AHMAD et al., 1995). Este mesmo grupo em outro experimento relata que a produção de um folículo persistente reduziu drasticamente a taxa de concepção de 54% para 15% em vacas lactantes. Esta redução pode estar associada à exposição prolongada do folículo dominante a elevadas concentrações de E2 antes da ovulação (AHMAD et al., 1996). Além disso, a P4 parece estar associada com um aumento na velocidade do transporte do ovócito no oviduto, enquanto que o E2 está associado à retenção deste ovócito (BEARDEN; FUQUAY, 2000).

Com relação aos animais submetidos a dietas abaixo dos níveis requeridos para a manutenção, estes, também podem apresentar problemas, como comprometimento do crescimento folicular e redução no tamanho e persistência do folículo dominante (MURPHY et al., 1991). Além disso, a restrição alimentar aguda (período de 12 dias) resultou em menor taxa de crescimento folicular, menor diâmetro máximo do folículo dominante e consequentemente falhas na ovulação (MACKEY et al., 1999). Resultados semelhantes foram observados por Bossis et al. (1999), que encontraram redução na taxa de crescimento, no diâmetro do folículo ovulatório e na concentração de hormônio luteinizante (LH) em novilhas de corte submetidas a restrição alimentar. Nestes casos de restrição alimentar pode ocorrer uma redução na síntese e liberação de LH devido a efeitos inibitórios no hipotálamo e hipófise, apresentando como consequência menor crescimento folicular (DISKIN et al., 2003).

Como mencionado acima, o desenvolvimento folicular é influenciado por diversos mecanismos, tais como, a interação entre liberação de gonadotrofinas e fatores intrafoliculares. Este mecanismo está diretamente ligado ao estado nutricional (WEBB et al., 2004). A restrição alimentar reduz a liberação de gonadotrofinas, principalmente no pós-parto inicial, e acredita-se que seja por uma maior liberação de opióides endógenos. Tais substâncias atuam no hipotálamo como neuromoduladores, diminuindo a síntese e liberação de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). A ação no hipotálamo parece ser mediada pelo neuropeptídeo Y (NPY), o qual parece desempenhar uma função na regulação da ingestão alimentar e consequentemente no balanço energético dos ruminantes. Assim, a restrição alimentar pode alterar a pulsatilidade de GnRH através deste mecanismo e indiretamente inibir a secreção de LH (MCSHANE et al., 1993). Deste modo, a restrição alimentar por período prolongado induz anestro em vacas *Bos indicus* (RHODES; ENTWISTLE; KINDER, 1995), provavelmente por interferir na síntese e liberação de GnRH e LH (RHODES; ENTWISTLE; KINDER, 1996). Outro mecanismo importante seria através da glicose, que aparentemente também age no sistema nervoso central, modulando a liberação de GnRH, consequentemente a liberação de LH (DISKIN et al., 2003). No entanto, este processo de controle e liberação de GnRH parece estar seletivamente direcionado à liberação de LH pela hipófise, tendo pouco ou nenhuma ação sobre a secreção de FSH, provavelmente devido a mecanismos distintos de síntese e liberação entre estes hormônios. Esta

informação baseia-se no estudo de Diskin et al. (2003), no qual, a restrição alimentar crônica ou aguda não interferiu na síntese ou liberação de FSH e que novilhas ovularam mesmo com deficiência de FSH.

Além disso, a ingestão insuficiente de alimento também pode influenciar a síntese de hormônios esteroides (SPICER; TUCKER; ADAMS, 1990). Segundo Leroy et al. (2008a), vacas sob restrição alimentar e que estão perdendo PC apresentam menores concentrações de P4 e E2, provavelmente pela redução na capacidade esteroidogênica do CL e do folículo respectivamente. Esta redução na síntese de P4 pode levar a uma diminuição no *feedback* negativo sobre o LH, resultando em aumento na frequência de pulsos deste hormônio e, indiretamente, alterar a secreção de outros hormônios (DOMINGUEZ, 1995). Ainda, a redução da P4 pode interferir na nutrição do embrião, reduzindo as taxas de prenhez (MANN; LAMMING, 2001).

Outro ponto importante a se destacar, são as diferenças entre *Bos taurus* e *Bos indicus* na dinâmica folicular e concentração hormonal. Já está bem esclarecido que animais *Bos indicus* apresentam maior número de folículos na emergência da onda, com aproximadamente 50 folículos pequenos (BURATINI Jr et al., 2000). No entanto, animais *Bos taurus* apresentam cerca de 24 folículos pequenos no mesmo momento (GINTHER et al., 1996), independente da nutrição oferecida. Estudo recente realizado por Bastos et al. (2010) detectou diferença no número de folículos de 2 a 5 mm no momento da emergência da onda entre Nelore ($42,7 \pm 5,9$) e Holandês ($19,7 \pm 3,2$). Estas diferenças na população folicular entre *Bos indicus* e *Bos taurus* podem estar associadas às altas concentrações de insulina e IGF-I em *Bos indicus* (BASTOS et al., 2010), ou seja, a fisiologia por trás destes hormônios pode ser diferente entre as espécies, podendo os animais *Bos indicus* ser mais resistentes aos efeitos das mudanças na ingestão nutricional sobre a produção e qualidade embrionária. Neste mesmo estudo, foi observado que as vacas holandesas apresentaram maior diâmetro do folículo ovulatório e maior volume de CL, porém, as concentrações sanguíneas de E2 e P4 foram maiores para as vacas Nelores. Estes resultados podem sugerir que vacas zebuínas apresentam um menor metabolismo ou menor velocidade de metabolismo de E2 e P4. Neste estudo os animais receberam dieta de manutenção de acordo com a espécie.

2.2 Influência da nutrição na recuperação e qualidade do ovócito

Em bovinos, o crescimento folicular uma vez iniciado, persiste até que ocorra ovulação ou atresia. Os mecanismos que desencadeiam o início e o número de folículos primordiais recrutados para o crescimento ainda não estão totalmente esclarecidos. Para que um folículo primordial alcance o estágio pré-ovulatório é necessário aproximadamente 90 dias (CAMPBELL; SCARAMUZZI; WEBB, 1995).

Na fase de desenvolvimento inicial dos folículos, fase pré-antral, o crescimento destes folículos é influenciado principalmente por fatores de crescimento, como as IGFs (ARMSTRONG; GONG; WEBB, 2003), enquanto que na fase final do desenvolvimento, fase antral, o crescimento dos folículos é influenciado principalmente por gonadotrofinas (WEBB et al., 2004).

Como os dados da literatura fazem crer que a nutrição pode afetar a foliculogênese, pode-se acreditar também que é possível que ocorra alterações na competência e qualidade ovocitária.

Segundo Leroy et al. (2008b), o excesso de energia na dieta pode comprometer o desenvolvimento embrionário inicial, pois, este consumo estaria relacionado a alterações no crescimento folicular e na divisão meiótica final do ovócito. Baixas taxas de desenvolvimento pós-fecundação são mencionadas em ruminantes com dietas de alto plano nutricional, pois, podem estar sendo prejudiciais à qualidade ovocitária (NOLAN et al., 1998a; ARMSTRONG et al., 2001).

Porém, ainda não se sabe com clareza quais alterações no fluido folicular que eventualmente possam modificar o conteúdo do citoplasma do ovócito, diminuindo sua viabilidade. Fatores de crescimento e hormônios extra ovarianos como insulina e leptina estão envolvidos nos mecanismos pelos quais a dieta poderia interferir na qualidade dos ovócitos (WEBB et al., 2004). Deste modo, concentrações adequadas de insulina e IGF-I são importantes para o crescimento folicular e maturação ovocitária (LANDAU et al., 2000; ARMSTRONG et al., 2002). No entanto, dietas que reduzem a concentração de proteínas que se ligam a IGF (IGFBP) e, conseqüentemente, aumentam a disponibilidade de IGF-I livre intrafolicular podem influenciar diretamente a qualidade do ovócito (ARMSTRONG et al., 2001). Thomas et al. (1997), observaram que não houve aumento de IGF-I sérico em novilhas que receberam dieta com adição de gordura, porém, as concentrações de IGF-I no fluido folicular estavam aumentadas. Entretanto, a superestimulação pelo IGF-I pode ser

prejudicial ao desenvolvimento do ovócito, mostrando que uma alteração nutricional que acarrete mudanças no sistema IGF ovariana pode ter papel chave na regulação da qualidade ovocitária (ARMSTRONG et al., 2001). Assim, o excesso de IGF-I disponível pode apresentar efeito negativo sobre a competência dos ovócitos (ARMSTRONG et al., 2002).

Em estudo realizado por Adamiak et al. (2005), observou-se que o efeito da dieta na qualidade ovocitária é dependente do ECC, pois os níveis elevados de energia na dieta foram benéficos para os ovócitos de doadoras com baixa condição corporal, enquanto que as doadoras com condição corporal moderada a alta produziram ovócitos com potencial reduzido de desenvolvimento *in vitro*. Além disso, estes resultados apresentaram alta correlação com as concentrações séricas de insulina dessas doadoras, ou seja, os animais com elevado ECC e superalimentados desenvolveram um quadro de hiperinsulinemia, o que demonstrou ser deletério para a qualidade ovocitária.

Segundo Boland et al. (2001), estudos *in vivo* indicam haver relação entre o consumo de energia e viabilidade do ovócito. Deste modo, McEvoy et al. (1995) observaram que a restrição alimentar em ovelhas aumentou a quantidade de ovócitos considerados viáveis. Em bovinos, a restrição alimentar realizada previamente ao abate e coleta dos ovários aumentou o desenvolvimento *in vitro* de ovócitos colhidos de folículos pequenos (MCEVOY et al., 1997).

Por outro lado, novilhas recebendo dietas com alta energia à vontade tiveram a qualidade e o desenvolvimento *in vitro* de ovócitos prejudicados (NOLAN et al., 1998a, 1998b; YAAKUB; O'CALLAGHAN; BOLAND, 1999). Nolan et al. (1998b) forneceram dietas consideradas de baixo e alto valor nutricionais e observaram que após a aspiração folicular durante várias semanas, o fornecimento da dieta de alto valor nutricional aumentou o número de folículos aspirados, mas reduziu a porcentagem de ovócitos apresentando divisão (estágio de duas células) e de blastocistos. Resultado semelhante foi observado por Lozano et al. (2000), que demonstraram que em vacas de leite recebendo diferentes quantidades de concentrado (3,5 kg/d vs 6,5 kg/d) o número de ovócitos coletados não diferiu. Entretanto, após fecundação *in vitro*, a porcentagem que progrediu para o estágio de duas células foi maior para o grupo alimentado com menor quantidade de concentrado.

Já Kendrick et al. (1999) observaram que o balanço energético negativo (BEN) também pode afetar a qualidade de ovócitos coletados por OPU. Neste estudo, vacas em lactação recebendo dieta com menor concentração energética e em maior BEN produziram menos ovócitos considerados de melhor qualidade. Além disso, estudo realizado por Mossa et al. (2009) relata que a subnutrição no terço inicial da gestação pode afetar a quantidade de folículos nos ovários. Neste estudo, novilhas oriundas de animais que sofreram restrição alimentar no início da gestação, apresentaram 60% menos folículos nas ondas foliculares do que aqueles em dieta considerada de normal para fêmea gestante.

Foi citado anteriormente que dependendo da dieta ingerida pelos animais, pode ocorrer diminuição nas concentrações de E2 e P4 (VASCONCELOS et al., 2003). Deste modo, Stock e Fortune (1993) demonstraram que a fertilidade baixa estava relacionada ao crescimento folicular prolongado e este estaria relacionado a baixas concentrações de P4 e E2, ou seja, um período de maior dominância folicular após a luteólise e previamente à ovulação (SARTORI; GUARDIEIRO, 2010). Isto é importante na definição do ambiente folicular, ou seja, a proporção de E2 e P4 no fluido folicular pode ser importante para definir um ambiente folicular para a maturação e posterior fecundação do ovócito, podendo estar associado a deterioração da qualidade deste (YAAKUB; O'CALLAGHAN; BOLAND, 1999; STOCK; FORTUNE, 2003). Deste modo, Pfeifer et al. (2009) relatam que vacas doadoras de ovócitos com concentrações muito baixas de P4 tiveram menor taxa de clivagem e menor produção *in vitro* de embriões do que doadoras com concentrações sanguíneas mais elevadas de P4.

2.3 Influência da nutrição na produção e qualidade do embrião

Embora se saiba que o efeito final de uma nutrição inadequada sobre a fertilidade seja a mortalidade embrionária, ainda não está totalmente claro se a nutrição afeta a qualidade embrionária por alterar a capacidade de desenvolvimento dos ovócitos, ou por causar mudanças durante o desenvolvimento embrionário, além das possíveis alterações no ambiente uterino (BOLAND; LONERGAN, 2003; NOLAN et al., 1998a). Vacas em início de lactação e com consumo deficiente de energia podem apresentar comprometimento do desenvolvimento folicular e queda na

qualidade ovocitária. Ao contrário, vacas não lactantes ou novilhas com consumo excessivo de energia e ganhando peso podem apresentar comprometimento ovocitário *in vitro* e menor qualidade embrionária *in vivo* (SANTOS; CERRI; SARTORI, 2008). Além disso, o impacto da superalimentação sobre a qualidade embrionária e ovocitária pode ser dependente do status metabólico da doadora (SANTOS; CERRI; SARTORI, 2008).

Como citado anteriormente, a energia é o nutriente que mais afeta a reprodução de fêmeas bovinas. O consumo insuficiente deste nutriente está relacionado a vários problemas reprodutivos como atraso a puberdade, aumento do intervalo parto e primeira ovulação, menor taxa de concepção e prenhez tanto vacas de leite como de corte (SANTOS et al., 2004). No entanto, dietas com grandes quantidades de energia podem diminuir a resposta superovulatória das doadoras, a produção embrionária e até alterar a expressão de genes importantes para o desenvolvimento do embrião. Isto pode ser uma consequência do comprometimento dos ovócitos (DUNNE et al., 1999; YAAKUB; O'CALLAGHAN; BOLAND, 1999).

Trabalho realizado por Yaakub, O'Callaghan e Boland (1999) observou que animais alimentados por um curto período de tempo (9 dias) com feno tiveram mais ovócitos fecundados em comparação aos animais ingerindo silagem ou silagem mais concentrado, porém, a produção de blastocistos não diferiu entre os tratamentos. Outro trabalho em que a dieta foi oferecida por período de tempo curto (10 dias), não foi observado efeito da alimentação *ad libitum* ou restrita na produção de embriões transferíveis, entretanto, com 24 horas de cultivo, uma maior proporção dos embriões oriundos dos animais em restrição alimentar se desenvolveu ao estágio de blastocisto. Além disso, estes embriões apresentaram um maior número de células, mostrando diferenças nas taxas de desenvolvimento (NOLAN et al., 1998a).

Wrenzycki et al. (2000) forneceram dois tipos de concentrados a novilhas, *ad libitum* ou restrito (3 kg/d) por 116 dias e, observaram que os animais que estavam em dieta de restrição produziram um maior número de embriões transferíveis. Além da quantidade de energia consumida, o ECC das doadoras também pode afetar a produção e qualidade embrionária (ADAMIAK et al., 2005). Segundo estes autores, animais com moderado a alto ECC ingerindo grande quantidade de alimento (duas vezes a manutenção) tiveram a produção de embriões prejudicada. No entanto, em animais com baixo ECC a alta ingestão alimentar foi benéfica para o desenvolvimento embrionário.

Como demonstrado anteriormente, a superalimentação pode levar a um aumento de glicose, insulina e IGF-I. Embriões de camundongos expostos a elevadas concentrações de IGF-I apresentaram aumento da apoptose e reabsorção embrionária. Esta hiperinsulinemia provoca uma diminuição nas concentrações de IGFBPs, aumentando a biodisponibilidade de IGF-I. Assim, ocorre uma diminuição na expressão dos receptores de IGF-I (IGF-IR), que sofrem *down-regulation* por causa das elevadas concentrações de IGF-I. Além disso, também ocorre diminuição da expressão dos transportadores de glicose dependentes de insulina (GLUTs), levando a uma diminuição na captação de glicose pelas células embrionárias, podendo induzir a apoptose celular e aumento das perdas embrionárias (PINTO; SCHLEIN; MOLEY, 2002). Sabendo que os embriões bovinos são sensíveis a glicose, Wrenzycki et al. (2000) observaram que altas concentrações de glicose no meio de cultura *in vitro* podem inibir o desenvolvimento embrionário.

Confirmando os resultados acima, Bilby et al. (2004) observaram aumento nas taxas de concepção em vacas lactantes quando baixas doses de GH exógeno foram utilizadas. Porém, reduzidas taxas de gestação foram encontradas quando altas doses de GH foram dadas a vacas não lactantes, provavelmente devido ao aumento de insulina e IGF-I plasmáticos. Já, quando a insulina foi adicionada ao meio de cultivo de embriões, observou-se efeito benéfico em relação ao grupo controle. Os embriões cultivados em meio com adição de insulina apresentaram maiores taxas de clivagem e produção de blastocistos, além de maior número de células e menor grau de apoptose, mostrando elevada atividade mitogênica e anti-apoptótica da insulina no desenvolvimento embrionário inicial (AUGUSTIN et al., 2003).

Estudo realizado em vacas de corte submetidas a dietas que elevam as concentrações séricas de insulina observou maior proporção de embriões alongados (>10 cm) no dia 16 pós IA no grupo tratado (MANN et al., 2003). Bastos et al. (2007) também verificaram efeito positivo da hiperinsulinemia sobre a qualidade embrionária. Foi observada a produção de embriões com maior tamanho e maior taxa de eclosão no cultivo *in vitro* pós-descongelação em novilhas que apresentavam elevado ECC independente da dieta consumida. Este resultado apresentou correlação alta e positiva com as concentrações séricas de insulina.

Como citado anteriormente, a insulina é um potente hormônio anabólico com características mitogênicas e anti-apoptóticas (AUGUSTIN et al., 2003). Entretanto,

o excesso de insulina pode ocasionar *down-regulation* para os seus próprios receptores, conhecido como resistência do organismo à insulina. Isto acontece pela saturação de moléculas energéticas no organismo como glicose, glicerol e ácidos graxos, levando a uma desativação das proteínas receptoras de insulina, além de diminuição na expressão das GLUTs. Este efeito pode ser observado durante o desenvolvimento inicial do embrião, quando ocorre aumento da apoptose celular com o intuito de eliminar células anormais. No entanto, quando esta eliminação ocorre de maneira descontrolada pode acarretar em retardo no desenvolvimento e até mesmo em morte embrionária (PINTO; SCHLEIN; MOLEY, 2002; BILBY et al., 2004; ADAMIAK et al., 2005)

Além do consumo de energia a ingestão de matéria seca em níveis inadequados também pode afetar o desenvolvimento e a qualidade embrionária. Em um estudo comparando a qualidade embrionária de vacas de alta produção de leite e consequente alta ingestão de matéria seca, a novilhas ou vacas não lactantes, foi demonstrada menor viabilidade embrionária para as vacas lactantes (SARTORI et al., 2002). Neste grupo de animais apenas 48% dos embriões foram considerados viáveis seis dias após IA. Por outro lado, novilhas produziram 72% de embriões viáveis e as vacas não lactantes 82%. Já, Mollo et al. (2007b) observaram que novilhas Nelores confinadas e submetidas a restrição alimentar (70% da manutenção) apresentaram respostas superestimulatórias e superovulatórias maiores do que o grupo de novilhas submetidas a alta ingestão alimentar (*ad libitum*). Além disso, o número de embriões colhidos também foi maior nos animais de baixa ingestão. Outros estudos com ovelhas (LOZANO et al., 2003) e novilhas superovuladas (O'CALLAGHAN; BOLAND, 1999; YAAKUB; O'CALLAGHAN; BOLAND, 1999), relataram que o alto fornecimento de alimento acarretou em redução do desenvolvimento embrionário.

Freret et al. (2006) realizaram um estudo com novilhas que inicialmente estavam ganhando 950g de PC por dia e foram divididas em dois grupos: aumentando (1300g de PC/dia) ou diminuindo (730g de PC/dia) este ganho. Não foram observados efeitos prejudiciais do maior ganho de peso na produção de embriões *in vitro* comparado a novilhas com menor ganho de peso. Martins et al. (2007), também não observaram diferença no número de ovócitos aspirados e na produção de embriões *in vitro* em vacas azebuadas com alta (1,7M) ou baixa (0,7M) ingestão alimentar. Porém, neste estudo as vacas em alta ingestão apresentaram

maior número de folículos >3 mm de diâmetro presente nos ovários no momento das aspirações foliculares.

3 OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da alta ou baixa ingestão de matéria seca e/ou energia na qualidade ovocitária, na produção *in vitro* de embriões, sua resistência à vitrificação/desvitrificação e taxa de concepção desses embriões transferidos em receptoras sincronizadas.

4 HIPÓTESES

- Vacas submetidas a dietas de manutenção ou restrição alimentar apresentam ovócitos e embriões de melhor qualidade;
- Vacas submetidas à dieta de alta IMS apresentam maior quantidade de ovócitos e embriões, porém, de menor qualidade;
- Vacas submetidas à dieta de alta energia apresentam maior quantidade de ovócitos e embriões, porém, de melhor qualidade em comparação ao grupo de AIMS;
- Embriões provenientes dos grupos 0,7M e M apresentam melhor criotolerância e melhor concepção.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais

Foram utilizadas 33 vacas Nelores não lactantes, com idade entre 4 e 10 anos, com PC de $489,0 \pm 11,3$ kg e ECC médio de 3,25 (escala de 1 a 5). As vacas foram mantidas confinadas em baias, sem acesso a pastagem, com dois animais por baia (Figura 1).

Figura 1 - Confinamento da área experimental da ESALQ-USP com vacas utilizadas no experimento. Disposição de duas vacas por baia, divididas de acordo com o PC depois do período de adaptação na primeira réplica do experimento

5.2 Dietas e grupos experimentais

Os animais foram agrupados de acordo com o peso inicial e divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais, sendo eles: Manutenção (M), Restrição alimentar (0,7M), Alta IMS (1,5M) e Alta ingestão de energia (E).

Após um período de 15 dias de adaptação utilizando dieta de manutenção, as dietas experimentais foram fornecidas.

As vacas do grupo M receberam uma dieta de manutenção do PC de acordo com o National Research Council - NRC (2000) consumindo 1,2% de MS por kg de PC. O grupo 0,7M recebeu o equivalente a 70% do oferecido ao grupo M, ou seja, 0,84% de MS por kg de PC. O grupo 1,5M recebeu o equivalente a 150% do oferecido ao grupo M, ou seja, 1,8% de MS por kg de PC. As vacas do grupo E receberam uma dieta com quantidade de MS equivalente ao grupo M, porém, com níveis energéticos semelhantes ao do grupo 1,5M (Tabela 1). Sal mineral foi fornecido na dieta e água à vontade. Os animais receberam a alimentação através de ração total fornecida uma vez ao dia. As dietas foram formuladas tanto para o grupo 1,5M, quanto para o grupo E para que as vacas tivessem um ganho de 0,5 ECC em um período de 80 dias. No grupo 0,7M, a expectativa era de que as vacas perdessem 280 g de PC por dia.

Após 30 dias do início do fornecimento das dietas experimentais todas as vacas foram submetidas à aspiração folicular e continuaram na mesma dieta por mais 12 dias para outro experimento. Depois desse período os animais entravam em nova dieta experimental. O delineamento do estudo foi realizado em quadrado latino, portanto, as vacas passaram por todas as dietas (Figura 2).

Na transição do fornecimento das dietas, houve um período de 7 dias de adaptação no qual o volume da dieta foi alterado gradativamente, a fim de evitar problemas digestivos.

Tabela 1 - Porcentagem dos componentes, nutrientes digestíveis totais (NDT) e proteína bruta (PB) das dietas experimentais

Componentes	Mantença (%)	Alta Energia (%)
Bagaço de cana <i>in natura</i>	50,2	10,0
Milho moído	40,0	81,0
Melaço	6,1	6,1
Uréia	1,8	1,0
Mistura mineral	0,8	0,8
Calcário calcítico	0,6	0,6
Cloreto de potássio	0,5	0,5
NDT	57	75
PB	10,9	11,5

Figura 2 – Cronograma Experimental. As vacas passaram por um período de adaptação de 15 dias e posteriormente foram alocados em um dos quatro tratamentos, sendo que, após 30 dias do início da dieta todos os animais passaram por uma sessão de aspiração folicular (OPU)

5.3 Aspiração folicular guiada por ultrassonografia

As doadoras foram contidas em brete de contenção adequadamente. Após a contenção, realizou-se remoção das fezes da ampola retal, higienização da região posterior com água e sabão e secagem com papel toalha. Em seguida, procedeu-se a anestesia epidural, realizada no espaço entre a última vertebra sacral e a primeira coccígea, utilizando volume de 3 a 5 mL de lidocaína a 2% sem vasoconstritor (Anestésico L[®], Pearson). Posteriormente, foi introduzida uma probe convexa com frequência de 7,5 MHz (Mindray DP-2200Vet, China) até o fundo de saco vaginal com o auxílio de uma guia de aspiração folicular (Guia de aspiração folicular, WTA, Cravinhos, SP, Brasil).

Após localização dos ovários e visualização dos folículos, foram realizadas as punções foliculares com linha de aspiração de teflon de 1,7 mm de diâmetro e 80 cm de comprimento (Linha de aspiração, WTA, Cravinhos, SP, Brasil), acoplada a uma agulha descartável 20 gauge (WTA, Cravinhos, SP, Brasil) e inserido na guia de aspiração folicular. O sistema de aspiração foi submetido à pressão negativa entre 60 a 70 mmHg produzida por uma bomba de vácuo com aquecedor de tubo de 50 mL (WTA, Cravinhos, SP, Brasil). Todos os folículos visíveis (≥ 2 mm) foram

aspirados e seus conteúdos depositados em tubos de 50 mL (TPP, Trasadingen, Suíça) que previamente continha 10 mL de meio *Dulbecco's Modified Phosphate Buffered Saline* (DMPBS[®], Nutricell Nutrientes Celulares, Campinas, SP, Brasil) acrescido de 1% de soro fetal bovino (SFB) (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) e 125 UI de heparina sódica/mL (Liquemine[®], Roche, São Paulo, SP, Brasil) a temperatura entre 35 e 37°C. O material aspirado foi conduzido ao laboratório de campo onde seu conteúdo foi transferido para filtro de coleta de ovócitos com malha de 80 µm (WTA, Cravinhos, SP, Brasil) e lavado com DMPBS[®]. Após a filtragem, o conteúdo presente no filtro foi transferido para placas de cultivo celular de 100 x 20 mm (TPP, Trasadingen, Suíça) para busca, seleção e avaliação dos complexos-cúmulus-ovócitos (CCOs) sob estereomicroscópio (SMZ1000, Nikon).

Os ovócitos recuperados foram classificados em uma escala de 1 a 4, sendo, Qualidade 1: CCO com citoplasma homogêneo, com granulações finas e coloração marron, apresentando múltiplas camadas de células do cúmulus; Qualidade 2: ovócito com citoplasma homogêneo com pequenas áreas mostrando pigmentações irregulares, cúmulus compacto menor do que na categoria 1 com pelo menos cinco camadas completas; Qualidade 3: ovócito com citoplasma heterogêneo/vacuolizado, zona pelúcida coberta com pelo menos três camadas de células do cúmulus e/ou com pequenas áreas desnudas; Qualidade 4: ovócito com citoplasma heterogeneamente pigmentado e/ou cúmulus completamente/parcialmente ausente ou expandido (SARTORI; DODE; RUMPF, 2011).

Posteriormente a seleção e classificação os CCOs foram lavados e acondicionados em criotubos de 2 mL (Corning, Corning, NY, USA) contendo meio de maturação *in vitro* composto de *Tissue Culture Medium* 199 (TCM 199) (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) tamponado com Hepes suplementado com 10% de SFB, 22 µg/mL de piruvato de sódio (Instituto Biochimico, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), 0,5 µg/mL de FSH (Folltropin-V, Bionique, ON, Canadá), 50 µg/mL de gonadotrofina coriônica humana (hCG) (Profasi[™], Serono, São Paulo, SP, Brasil), estradiol (1 µg/mL) e 83,4 µg/mL de amicacina (Instituto Biochimico, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), onde permaneceram durante o transporte até o laboratório da empresa In Vitro Brasil localizado na cidade de Mogi Mirim, SP, Brasil.

5.4 Produção *in vitro* de embriões

5.4.1 Maturação *in vitro*

Os ovócitos foram colocados em placas de petri 60 x 15 mm (Corning, Corning, NY, EUA) em gotas de 100 μ L de meio TCM 199 suplementado com 10% de SFB, um μ g/mL FSH, 50 μ g/mL hCG, 1 μ g/mL de estradiol, 0,20 mM de piruvato de sódio e 83,4 μ g/mL de amicacina, recobertas com óleo mineral e mantidas durante 24 h em incubadora à 38,5°C com 5% de CO₂ em ar e umidade máxima.

5.4.2 Fecundação *in vitro*

A FIV foi realizada com sêmen de oito touros Nelores. Foi realizado descongelamento por 30 segundos a 35°C e lavado duas vezes por centrifugação (600 rpm por 5 min) em 2 mL de meio TALP suplementado com 0,2 mM de piruvato e 83,4 g/mL de amicacina, tamponado com 10 mM de Hepes. A concentração do sêmen foi ajustada para 25×10^6 espermatozoides (sptz) móveis/mL. O volume de 4 μ L de sêmen (10^5 sptz) foi adicionado em cada gota de 90 μ L de TALP-FIV (TALP suplementado com 10 g/mL de heparina, 18 M de penicilamina, 10 M de hipotaurina e 8 M de epinefrina) sob óleo mineral. Posteriormente, foram adicionados 25 a 30 oócitos em cada gota.

O período de co-incubação foi de 20-24 h em incubadora a 38,5°C com 5% CO₂ em ar e umidade máxima.

5.4.3 Cultivo *in vitro*

Os prováveis zigotos foram co-cultivados (grupos de 25) na incubadora (38,5°C com 5% CO₂ em ar e umidade máxima) com células da granulosa em gotas de 100 μ L de SOF (WELLS et al., 1999) 2,5% SFB + 0,5% de albumina sérica bovina (BSA) sob óleo mineral. No dia três e no dia cinco do CIV foi realizada a substituição de 50% do volume de meio das gotas por meio novo (*feeding*). O meio de cultivo do *feeding* foi o mesmo meio do início do cultivo.

A taxa de clivagem foi avaliada no terceiro dia de cultivo.

5.4.4 Vitrificação e desvitrificação

A vitrificação dos embriões foi baseada na técnica Cryotop descrita previamente por Kuwayama et al. (2005). Essa metodologia utiliza o conceito de mínimo volume, onde os embriões são acondicionados em um filme plástico muito fino, acoplado a uma haste de plástico utilizada para facilitar o manuseio.

As soluções utilizadas na vitrificação foram preparadas em placa de quatro poços (NUNC S/A, Roskilde, Dinamarca).

A solução de equilíbrio (SE) teve o meio DMPBS como base na preparação (DMPBS + 10% de Etileno Glicol + 10% de Dimetil Sulfóxido + 20% de SFB). Já a solução de vitrificação (SV) utilizou o meio TCM-Hepes como base (TCM-199 + 25 mM Hepes + 10% de SFB + 20% de Etileno Glicol + 20% de Dimetil Sulfóxido + 0,5 M de sacarose), sendo que o Dimetil Sulfóxido somente foi adicionado no momento do uso.

Primeiramente os embriões foram colocados no meio de manutenção (TCM-Hepes), de onde eram retirados (três a cinco de cada vez) e passados para o poço 1, contendo a SE. Nesta solução os embriões permaneceram por um minuto e logo após eram transferidos para o poço 2, contendo a SV, onde ficaram expostos durante 20s.

Assim, imediatamente os embriões foram pipetados e alojados sobre o filme plástico na ponta da haste (Cryotop) e a amostra foi imersa no nitrogênio líquido.

Para o reaquecimento dos embriões, os Cryotops contendo os embriões foram expostos ao ar por quatro segundos e em seguida mergulhados na solução de reaquecimento (TCM-Hepes + sacarose) com temperatura aproximada de 35°C. A remoção da solução de vitrificação foi feita com dois períodos de exposição (5 min cada) em gradientes de 0,3 e 0,15 M de sacarose, respectivamente, antes de passarem para o meio de manutenção TCM-Hepes (MEZZALIRA et al., 2004).

5.5 Inovulação dos embriões e diagnóstico de gestação

Após o aquecimento dos embriões estes foram avaliados e inovulados em receptoras previamente sincronizadas (Figura 3). Os embriões foram transferidos por dois técnicos experientes. No dia da inovulação todas as receptoras foram avaliadas

para conferir a presença de CL. Deste modo, as receptoras que não tinham CL não receberam embriões. Foram sincronizados 1274 animais (vacas e novilhas) para dois experimentos distintos e um total de 543 embriões produzidos *in vitro* e vitrificados foi transferido para este experimento.

O diagnóstico de gestação foi realizado por ultrassonografia 23 dias após a inovulação. Os animais considerados prenhes foram reavaliados 30 dias depois para confirmar a gestação e avaliar a perda embrionária.

Figura 3 – Ilustração esquemática do protocolo de sincronização para receptoras de embrião. D0: inserção de um dispositivo de liberação de P4 e 2 mg de Benzoato de Estradiol (BE). D8: aplicação de 0,6 mg de Cipionato de Estradiol (ECP), 0,5 mg de Cloprostenol sódico (PGF2_α) e 300 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG). D16 e 17: inovulação dos embriões

5.6 Análise Estatística

Para a análise dos dados de produção ovocitária e embrionária utilizou-se o procedimento GLIMMIX (Análise de Variância) do programa SAS, sob a metodologia dos modelos lineares generalizados, considerando para as variáveis de proporção uma distribuição binomial, com função de ligação identity.

Incluíram-se para estas avaliações os efeitos do touro, tratamento, quadrado latino, vaca, baia e repetição.

Para as análises pós inovulação dos embriões produzidos neste experimento, as variáveis de proporção como, taxas de concepção aos 30 e 60 dias, foram inseridas em um modelo matemático, que incluiu os efeitos de dia da TE, doadora, tratamento, tempo (30 e 60 dias) e estágio de desenvolvimento embrionário.

As comparações estatísticas foram realizadas sobre as médias ajustadas pelo método dos quadrados mínimos e estão apresentadas na forma de médias $\pm$ erros-

padrão (EP) com as distribuições nas escalas originais, pois estas podem ser facilmente interpretadas.

6 RESULTADOS

6.1 Avaliação do peso e ECC

Os resultados (média dos quadrados mínimos $\pm$ EP) de peso inicial, peso final, ganho de peso, ECC inicial, ECC final e alteração no ECC durante o período do tratamento estão apresentados na Tabela 2. Como esperado os animais do grupo M não apresentaram alteração no PC e no grupo 0,7M observou-se uma perda média de 16,2 kg. No entanto, as vacas do grupo 1,5M apresentaram um maior ganho de PC em comparação ao grupo E ($P \leq 0,05$). Com relação ao ganho de peso diário também foi observado diferença ($P \leq 0,05$) entre o grupo 1,5M e E, ou seja, o grupo 1,5M obteve um maior ganho. Já o grupo 0,7M apresentou uma perda de peso maior do que o esperado de 280 g/d. Resultado semelhante foi encontrado com relação a alteração do ECC, no qual, o grupo 1,5M obteve um maior ganho de ECC em comparação ao grupo E ($P \leq 0,05$).

Tabela 2 - Índices corporais (média dos quadrados mínimos $\pm$ EP) em vacas ingerindo dietas de manutenção (M), restrição alimentar (0,7M), alta ingestão de MS (1,5M) e alta ingestão de energia (E) durante períodos de 45 dias

	M (n=33)	0,7M (n=33)	1,5M (n=33)	E (n=33)
Peso inicial (Kg)	497,0 $\pm$ 17,8 ^a	500,1 $\pm$ 17,8 ^a	489,3 $\pm$ 18,1 ^b	486,6 $\pm$ 18,9 ^b
Peso final (Kg)	496,3 $\pm$ 19,0 ^b	483,9 $\pm$ 17,9 ^a	515,2 $\pm$ 18,4 ^d	499,5 $\pm$ 18,8 ^c
Ganho diário (g/d)	-16,3 $\pm$ 124 ^b	-386,1 $\pm$ 76,1 ^a	615,3 $\pm$ 57,6 ^d	387,4 $\pm$ 48,7 ^c
ECC inicial	3,46 $\pm$ 0,21 ^a	3,55 $\pm$ 0,21 ^a	3,31 $\pm$ 0,21 ^b	3,38 $\pm$ 0,23 ^b
ECC Final	3,45 $\pm$ 0,24 ^b	3,28 $\pm$ 0,39 ^a	3,64 $\pm$ 0,21 ^c	3,50 $\pm$ 0,22 ^b
Alteração no ECC	-0,01 $\pm$ 0,21 ^b	-0,26 $\pm$ 0,10 ^a	0,33 $\pm$ 0,11 ^d	0,13 $\pm$ 0,11 ^c

^{a,b,c,d} Diferem entre si em nível de $P < 0,05$.

6.2 Avaliação da quantidade e qualidade ovocitária

Os dados referentes aos números de ovócitos totais recuperados, viáveis e atresícos/degenerados estão apresentados na Tabela 3.

Com relação ao número total de ovócitos recuperados o grupo 0,7M foi diferente dos grupos M e E, ou seja, o grupo de restrição alimentar obteve um maior número de ovócitos recuperados do que os grupos em dietas de manutenção e alta ingestão de energia. O mesmo efeito foi observado quando a variável observada foi ovócitos viáveis, onde o grupo 0,7M diferiu e apresentou mais ovócitos considerados viáveis do que os grupos M e E. Entretanto, não houve diferença no número de ovócitos atrésicos/degenerados entre os tratamentos. Em relação à porcentagem de ovócitos viáveis sobre o total recuperado não houve diferença entre os grupos (Figura 4).

Tabela 3 - Quantidade e qualidade ovocitária (média dos quadrados mínimos $\pm$ EP) em vacas ingerindo dietas de manutenção (M), restrição alimentar (0,7M), alta ingestão de MS (1,5M) e alta ingestão de energia (E) submetidas quatro sessões de aspiração folicular

	M	0,7M	1,5M	E	P
Número de animais	33	33	33	33	
Ovócitos recuperados (n = 3247)	20,2 $\pm$ 2,0 ^b	23,0 $\pm$ 2,3 ^a	21,5 $\pm$ 2,2 ^{ab}	20,1 $\pm$ 2,0 ^b	0,02
Ovócitos viáveis (n = 2396)	14,4 $\pm$ 1,6 ^b	17,0 $\pm$ 1,9 ^a	15,7 $\pm$ 1,7 ^{ab}	14,1 $\pm$ 1,6 ^b	0,008
Ovócitos atrésicos ou degenerados (n = 851)	5,7 $\pm$ 0,6	5,7 $\pm$ 0,6	5,6 $\pm$ 0,6	5,7 $\pm$ 0,6	0,99

Figura 4 – Média dos quadrados mínimos $\pm$ EP da porcentagem de ovócitos viáveis sobre o total de ovócitos recuperados de acordo com os tratamentos M (n = 571/790), 0,7M (n = 667/884), 1,5M (n = 621/828) e E (n = 537/745) após 4 sessões de aspiração folicular (P = 0,41)

6.3 Avaliação da produção *in vitro* de embriões

O número de clivados do grupo 0,7M foi maior e apresentou diferença em relação ao grupo M, no entanto, não diferiu dos demais grupos. Com relação à produção de blastocistos os quatro tratamentos apresentaram números semelhantes e não diferiram entre si (Tabela 4). Os resultados com relação à taxa de clivagem (Figura 5), taxa de blastocisto (Figura 6) e a porcentagem de blastocistos sobre os clivados (Figura 7) não diferiram entre os tratamentos.

Tabela 4 - Número de estruturas clivadas e de blastocistos (média dos quadrados mínimos $\pm$ EP) em vacas ingerindo dietas de manutenção (M), restrição alimentar (0,7M), alta ingestão de MS (1,5M) e alta ingestão de energia (E) submetidas quatro sessões de aspiração folicular

	M	0,7M	1,5M	E	P
Número de animais	33	33	33	33	
Clivados (n = 1859)	10,7 $\pm$ 1,4 ^b	13,4 $\pm$ 1,7 ^a	12,6 $\pm$ 1,6 ^{ab}	11,7 $\pm$ 1,5 ^{ab}	0,04
Blastocistos (n = 817)	5,4 $\pm$ 0,8	6,9 $\pm$ 0,9	5,9 $\pm$ 0,8	6,6 $\pm$ 0,9	0,15

Figura 5 – Média dos quadrados mínimos $\pm$ EP da taxa de clivagem (clivados/ovócitos viáveis) de acordo com os tratamentos M (n = 458/571), 0,7M (n = 494/667), 1,5M (n = 484/621) e E (n = 423/537) após quatro sessões de aspiração folicular (P = 0,25)

Figura 6 – Média dos quadrados mínimos $\pm$ EP da taxa de blastocisto (blastocistos/total de ovócitos recuperados) de acordo com os tratamentos M (n = 183/790), 0,7M (n = 229/884), 1,5M (n = 200/828) e E (n = 205/745) após quatro sessões de aspiração folicular (P = 0,67)

Figura 7 – Média dos quadrados mínimos $\pm$ EP da porcentagem de blastocistos sobre o total de clivados de acordo com os tratamentos M (n = 183/458), 0,7M (n = 229/494), 1,5M (n = 200/484) e E (n = 205/423) após quatro sessões de aspiração folicular (P = 0,14)

6.4 Taxas de concepção e parição e perdas gestacionais

As taxas de concepção aos 30 e 60 dias e a taxa de parição não apresentaram diferença entre os tratamentos (Figura 8). Do mesmo modo, a perda gestacional entre 30 e 60 dias, dos 30 dias até o parto e entre 60 dias até o parto não apresentaram diferença entre os grupos (Figura 9).

Figura 8 – Média dos quadrados mínimos $\pm$ EP das taxas de concepção aos 30 ($P = 0,49$), 60 ($P = 0,43$) e parição ($P = 0,73$) de receptoras sincronizadas que receberam embriões produzidos *in vitro* e vitrificados de vacas ingerindo dietas de manutenção (M), restrição alimentar (0,7M), alta ingestão de MS (1,5M) e alta ingestão de energia (E) após quatro sessões de aspiração folicular

Figura 9 – Média dos quadrados mínimos $\pm$ EP da perda gestacional (%) entre 30 e 60 dias ($P = 0,84$), 30 dias até o parto ($P = 0,89$) e 60 dias até o parto ($P = 0,40$) de receptoras previamente sincronizadas que receberam embriões produzidos *in vitro* e vitrificados de vacas ingerindo dietas de manutenção (M), restrição alimentar (0,7M), alta ingestão de MS (1,5M) e alta ingestão de energia (E) após quatro sessões de aspiração folicular

7 DISCUSSÃO

As alterações de PC demonstradas na Tabela 2 mostram que quando as vacas estavam em dieta de alta ingestão de MS (1,5M) apresentaram maior ganho de peso diário em relação à alta ingestão de energia (E), não sendo este o resultado esperado inicialmente (450 g/d para ambos os tratamentos). Além disso, o grupo E apresentou ganho de peso diário abaixo do esperado ($387,4 \pm 48,7$ g/d) e o grupo 1,5M apresentou ganho maior do que o esperado ($615,3 \pm 57,6$ g/d) dificultando a análise da comparação entre os grupos 1,5M e E, no qual se pretendia diferenciar o efeito sobre a reprodução de alta IMS vs alta energia.

No entanto, os grupos recebendo dietas de manutenção (M) e restrição alimentar (0,7M) apresentaram resultados esperados, ou seja, o grupo M apresentou mínima perda de peso ($-16,3 \pm 12,4$) podendo-se dizer que manteve o peso como o esperado e o grupo 0,7M apresentou perda de peso diária ($-386,1 \pm 76,1$ g/d) compatível com o esperado.

A mesma situação apresentada para o ganho de peso ocorreu com o ECC. O grupo 1,5M apresentou maior aumento no ECC em relação ao grupo E, o que não era esperado, pois, inicialmente as dietas foram formuladas para terem o mesmo ganho de peso diário. Esses resultados podem ser explicados pela menor quantidade de MS e menor volume da dieta de alta energia, ou seja, esta dieta pode apresentar uma maior taxa de passagem ruminal e deste modo apresentar menor aproveitamento dos nutrientes e consequentemente menor ganho de PC e ECC. Já o grupo M não apresentou diferença no ECC e o grupo 0,7M teve seu ECC reduzido (Tabela 2), como já era aguardado para estes grupos de acordo com as dietas fornecidas.

Diante de tais resultados, pode-se especular que a quantidade de energia fornecida para o grupo E não foi suficiente para promover aumento esperado no PC e ECC, podendo não ser suficiente para promover alterações metabólicas e endócrinas necessárias para modificar o desempenho reprodutivo das doadoras, como relatado anteriormente na literatura (YAAKUB; O'CALLAGHAM; BOLAND, 1999; ADAMIAK et al., 2005).

Com relação à quantidade e qualidade ovocitária foi observado que os animais em restrição alimentar apresentaram maior número total de ovócitos

recuperados e maior quantidade de ovócitos viáveis em comparação aos grupos manutenção e alta ingestão de energia, porém não diferiu do grupo alta ingestão de matéria seca (1,5M). Estes resultados estão de acordo com alguns trabalhos da literatura que observaram efeito nulo (FRERET et al., 2006) ou negativo (LOZANO et al., 2003; ADAMIAK et al., 2005; MOLLO et al., 2007) da alta ingestão alimentar sobre o número de folículos recrutados e produção de ovócitos. No entanto, segundo o que foi hipotetizado no presente experimento os grupos 1,5M e E apresentariam maior quantidade de ovócitos recuperados e como pode ser visto na Tabela 3 isto não ocorreu.

A mesma situação aconteceu com relação à qualidade dos ovócitos, ou seja, o esperado era de que o grupo 0,7M apresentasse maior quantidade de ovócitos de melhor qualidade em comparação ao grupo 1,5M, porém, não houve diferença entre os grupos (Tabela 3). Em contraste ao presente experimento, vários estudos relatam queda na viabilidade ovocitária em animais recebendo excesso de energia (NOLAN et al., 1998a; YAAKUB; O'CALLAGHAM; BOLAND, 1999; ADAMIAK et al., 2005).

Já, em estudo realizado com vacas recebendo dietas de alta ingestão (1,7M) ou baixa ingestão (0,7M) observou-se maior número de folículos aspirados para o grupo de alta ingestão. Entretanto, houve uma tendência de redução na porcentagem de ovócitos de qualidade superior nos animais que receberam dieta de alta ingestão (MARTINS, 2007). No entanto, no presente estudo a porcentagem de ovócitos viáveis sobre o total recuperado não diferiu entre os quatro tratamentos. Estes contrastes com a literatura podem ser devido a alguns fatores como o tipo e o tempo de dieta fornecida, a espécie animal utilizada e até mesmo a diferenças nas avaliações visuais das estruturas colhidas.

Como citado anteriormente, apesar do grupo 0,7M ter apresentado maiores quantidades de ovócitos totais e viáveis, esta aparente vantagem não foi capaz de alterar as etapas seguintes, onde não houve diferença no número de blastocistos e nas taxas de clivagem, blastocisto e blastocisto/clivados, contrariando o que foi hipotetizado, no qual a alta IMS ou energia prejudicaria a PIVE. Resultados semelhantes foram obtidos por Martins (2007), no qual não foram observadas diferenças nas taxas de clivagem e de blastocistos em vacas aneloradas recebendo dietas de alta ou baixa ingestão. Estes resultados podem ter ocorrido devido ao tempo em que os animais ficaram expostos às dietas, ou seja, o período de 30 dias parece não prejudicar a PIVE. Deste modo, estudo recente realizado por Sales et al.

(2011) mostrou que vacas *Bos indicus* submetidas a altos níveis de energia na dieta tiveram a PIVE prejudicada após 60 dias de fornecimento da dieta em comparação à vacas que estavam em dieta de manutenção. Além disso, Wrenzycki et al. (2000) relataram maior número de embriões transferíveis em novilhas que estavam em dieta de restrição comparados às novilhas que estavam em dieta *ad libitum*. Neste estudo ambas as dietas foram fornecidas por 116 dias.

Outro fator que pode ter contribuído para os resultados do presente experimento é o ECC, pois, outros estudos demonstraram que doadoras com elevado ECC podem ter sua produção e qualidade embrionária afetada (ADAMIAK et al., 2005; SALES, 2011) e no presente experimento as vacas em alta IMS e alta energia não apresentaram grandes alterações no ECC.

Apesar de hormônios/fatores importantes como E2, P4 e IGF-I não terem sido dosados no presente experimento, pode-se especular sobre a influência destes nos resultados obtidos. Segundo alguns trabalhos animais em restrição alimentar podem ter as concentrações de IGF-I diminuídas devido à insensibilidade e ao decréscimo dos receptores hepáticos de GH (CHASE et al., 1998; BOSSIS et al., 1999). Entretanto, no presente experimento a restrição alimentar pode não ter sido tão rigorosa a ponto de causar uma insensibilidade hepática ao GH e consequentemente não houve queda na concentração de IGF-I circulante. Com isso, não se alterou o recrutamento folicular e possivelmente o número de ovócitos recuperados. Por outro lado, restrição alimentar pode ter ocasionado uma menor persistência do folículo dominante (MURPHY et al., 1991) pela maior concentração circulante de P4 e menor pulsatilidade de LH, levando a um aumento de folículos de menor tamanho presentes nos ovários à OPU, sendo parte deles, potencialmente atresícos. Além disso, alterações nas dietas não afetam as concentrações circulantes de FSH (CHASE et al., 1998). Portanto, queda na pulsatilidade de LH associada ao não incremento de FSH podem ter afetado discretamente o processo de competência ovocitária causando uma maturação inadequada para alguns os ovócitos, não gerando aumento nas taxas de clivagem e de blastocisto.

Além disso, a maioria dos estudos foi realizada em animais *Bos taurus* e atualmente podemos especular que a fisiologia de alguns hormônios citados acima como insulina, IGF-I, E2 e P4 possa ser diferente entre as espécies *Bos indicus* e *Bos taurus*, ou seja, fêmeas *Bos indicus* aparentemente são mais resistentes aos efeitos das mudanças na ingestão nutricional sobre a produção e qualidade

embrionária. Ainda, podemos sugerir que vacas zebuínas apresentam um menor metabolismo ou menor velocidade de metabolização de E2 e P4 (BASTOS et al., 2010).

Por outro lado, como citado anteriormente, para que um folículo primordial alcance o estágio pré-ovulatório é necessário aproximadamente 90 dias (CAMPBELL; SCARAMUZZI; WEBB, 1995). Além disso, a proporção de E2 e P4 no fluido folicular pode ser importante para definir um ambiente folicular adequado para a maturação e posterior fertilização do ovócito (YAAKUB; O'CALLAGHAN; BOLAND, 1999; STOCK; FORTUNE, 2003). Deste modo, no presente experimento pode-se criar a hipótese de que o período de 30 dias de dietas de alta IMS e alta energia foi insuficiente para gerar alterações na PIVE devido a possível não alteração nas concentrações de E2 e P4 suficientes para causar prejuízos nas estruturas avaliadas.

Deste modo, pode-se ver que a influência da dieta na quantidade e qualidade ovocitária e posterior PIVE ainda é bastante controversa e dependente de distintos fatores, tais como a categoria animal utilizada, o tipo e o tempo de dieta fornecida, o ECC dos animais, o status fisiológico dos animais, a metodologia *in vitro* utilizada, entre outros.

Com relação à taxa de concepção aos 30 e 60 dias apesar de haver uma diferença numérica entre o grupo 0,7M com os demais, estatisticamente não houve diferença (Figura 8). Estes resultados não eram esperados segundo a hipótese inicial de que os embriões dos grupos 0,7M e M teriam melhores taxas de concepção. Além disso, como citado anteriormente, eram esperadas melhores taxas de blastocistos para esses grupos, porém isto não ocorreu.

Outro ponto importante de se ressaltar foi a escolha da vitrificação, pois, como foi produzido um número muito grande de embriões foi necessária vitrificação e armazenamento destes, gerando mais um fator de influência na qualidade e posterior taxa de concepção. Apesar das técnicas de vitrificação terem avançado e os resultados obtidos estarem melhores, sabe-se que este método pode gerar injúrias ao embrião influenciando negativamente os resultados, podendo até mascarar possíveis efeitos das dietas.

Apesar disso, por se tratar de um número considerável e provavelmente inédito na literatura, pode-se acreditar que doadoras de ovócitos, principalmente as com elevado PC e ECC que passarem por um período de restrição alimentar antes

das seções de aspiração folicular possam apresentar mais ovócitos viáveis, como demonstrado no presente experimento. Acredita-se que este manejo seja importante, pois a maioria das doadoras da raça Nelore no Brasil é superalimentada e apresenta elevado PC e ECC. E como apresentado na revisão de literatura, estas características podem ser bastante prejudiciais à qualidade e desenvolvimento de ovócitos e embriões.

Além disso, o grupo 0,7M foi o que mais se aproximou dos resultados obtidos pelo mesmo laboratório onde foram realizados os procedimentos da PIVE e posterior transferência. No estudo deste grupo obteve-se 42% de concepção após vitrificação em gado zebuino (SPEGIORIN et al., 2010). Ainda, este estudo demonstra ser possível alcançar taxas de concepção semelhantes às obtidas com embrião a fresco.

Como relatado anteriormente, dados da literatura sobre este assunto ainda são escassos. No entanto, estudos realizados com vacas de corte (Hereford) avaliando somente taxa de concepção após vitrificação, obtiveram boas taxas de concepção aos 30 (42,4% e 47,5%) e aos 60 dias de gestação (39,4% e 45%) após a transferência (MARTÍNEZ et al., 1998, MARTÍNEZ et al., 2002). Resultados estes superiores aos encontrados no presente experimento. Um problema encontrado nestes trabalhos citados é o reduzido número de animais que receberam embrião e da possibilidade de se escolher melhores receptoras, dificultando a interpretação e comparação de dados.

Não foi possível detectar diferença entre os grupos com relação à mortalidade embrionária/fetal (Figura 9). No entanto, a perda gestacional encontrada no presente experimento é bem mais expressiva do que em outros trabalhos que encontraram perdas de 5% em vacas Hereford (MARTÍNEZ et al., 2002) e 5,4% em receptoras Holandesas (BLOCK; BONILLA; HANSEN, 2010). Resultado semelhante foi observado por Mattos (2010) em que foi observada perda gestacional de 5% em vacas Nelore, no entanto, neste estudo os embriões foram produzidos *in vivo* e posteriormente vitrificados. Já Sartori et al. (2006) comparam a IA à transferência de embriões produzidos *in vivo* em vacas holandesas lactantes e observaram perda de 26,2% nas vacas que receberam TE. Outro estudo avaliou a perda embrionária/fetal dos 30 aos 60 dias em vacas holandesas lactantes e novilhas e encontrou perda embrionária de 10,3% nas novilhas, 19,4% nas vacas de primeira lactação e 20,5% nas vacas de segunda ou mais lactações (MELÉNDEZ; DUCHENS, 2009). Deste

modo, pode-se dizer que vários são os fatores que podem influenciar na perda gestacional, dentre eles o processo de criopreservação utilizado, o ambiente uterino, a raça, produção de leite, estresse, nutrição, doenças infecciosas e outros, assim, acredita-se que no presente experimento algum desses problemas como estresse, manejo inadequado das receptoras, problemas sanitários e o processo de vitrificação podem ter influenciado a perda gestacional, pois, esta variável foi semelhante entre os grupos.

8 CONCLUSÕES

- Apesar de ter havido uma discreta vantagem da restrição alimentar no número de ovócitos totais, viáveis e na clivagem em relação aos demais grupos, isto não se refletiu em uma melhor produção final de blastocistos, contrastando com o que foi hipotetizado.
- Contrariando a hipótese inicial a alta IMS ou alta energia por um período de 30 dias não foi capaz de aumentar a quantidade de ovócitos e embriões e não prejudicou a qualidade destes.
- Os embriões produzidos em diferentes dietas apresentaram taxas de concepção semelhantes após a inovulação, mostrando que este período de tratamento não foi capaz de prejudicar a qualidade embrionária ou criotolerância, a ponto de acarretar queda nas taxas de concepção dos grupos de alta IMS ou alta energia.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES

Segundo dados da literatura a qualidade ovocitária e posterior desenvolvimento embrionário *in vitro* podem ser afetados pela quantidade de matéria seca ou energia ingerida, porém, no presente estudo estas dietas por um período de 30 dias não foram capazes de afetar a produção de embriões. Deste modo, seria interessante um estudo com um maior tempo de tratamento para que se aproxime da realidade das doadoras no Brasil, as quais são superalimentadas por um longo período.

Além disso, devido a maior quantidade de ovócitos viáveis nos animais em restrição alimentar, recomenda-se que doadoras com excesso de peso e elevado ECC passem por um período de restrição antes de sessões de aspiração folicular.

Com relação à taxa de concepção pouco se pode concluir devido a não diferença entre os grupos e a falta de dados da literatura. O presente estudo é pioneiro na avaliação da concepção de embriões produzidos *in vitro* e vitrificados sob diferentes dietas.

No entanto, os embriões das doadoras em restrição alimentar foram os que mais se aproximaram das médias obtidas pelos laboratórios tanto para embriões vitrificados como frescos. Como citado anteriormente, seria interessante um período de restrição alimentar das doadoras para uma melhor produção embrionária e posterior concepção.

REFERÊNCIAS

ADAMIAK, S.J.; MACKIE, K.; WATT, R.G.; WEBB, R.; SINCLAIR, K.D. Impact of nutrition on oocyte quality: cumulative effects of body composition and diet leading to hiperinsulinemia in cattle. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 73, p. 918-926, 2005.

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

AHMAD, N.; BEAM, S.W.; BUTLER, W.R.; DEEVER, D.R.; DUBY, R.T.; ELDER, D.E.; FORTUNE, J.E.; GRIEL, L.C.; JONES, L.S.; MILVAE, R.A.; PATE, J.L.; REVAH, I.; SCHREIBER, D.T.; TOWNSON, D.H.; TSANG, P.C.W.; INSKEEP, E.K. Relationship of fertility to patterns of ovarian follicular development and associated hormonal profiles in dairy cows and heifers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 74, p. 1943-1952, 1996.

ARMSTRONG, D.G.; GONG, J.G.; WEBB, R. Interactions between nutrition and ovarian activity in cattle: physiological, cellular, and molecular mechanisms. **Reproduction Domestic Ruminants**, Berlin, v. 61, p. 403-414, 2003.

ARMSTRONG, D.G.; BAXTER, G.; HOGG, C.O.; WOAD, K.J. Insulin-like growth factor (IGF) system in the oocyte and somatic cells of bovine preantral follicles. **Reproduction**, Southampton, v. 123, p. 789–797, 2002.

ARMSTRONG, D.G.; MCEVOY, T.G.; BAXTER, G.; ROBINSON, J.J.; HOGG, C.O.; WOAD, K.J.; WEBB, R. Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production in vitro: Associations with the ovarian insulin-like growth factor system. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 64, p. 1624–1632, 2001.

AUGUSTIN, R.; POCAR, P.; SANTOS, A.N.; WRENZYCKI, C.; GANDOLFI, F.; NIEMANN, H.; FISCHER, B. Glucose transporter expression is developmentally regulated in in vitro derived bovine preimplantation embryos. **Molecular Reproduction and Development**, Malden, v. 60, p. 370-376, 2001.

BASTOS, M.R.; RAMOS, A.F.; DRIESSEN, K.; MARTINS, A.C.; RUMPF, R.; SARTORI, R. Efeito do “flushing” nutricional sobre a resposta superovulatória em vacas mestiças (Resumo). **Acta Scientiae Veterinariae**, São Paulo, v. 35, p. 1242, 2007.

BASTOS, M. R.; MATTOS, M.C.C.; MESCHIATTI, M.A.P.; SURJUS, R.S.; GUARDIEIRO, M.M.; FERREIRA, J.C.P.; MOURAO, G.B.; PIRES, A.V.; BIEHL, M.V.; PEDROSO, A.M.; SANTOS, F.A.P.; SARTORI, R. Ovarian function and circulating hormones in nonlactating Nelore versus Holstein cows. In: XXIV Reunião Anual da SBTE, 2010, Porto de Galinhas. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38. p.776. 2010

BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. **Applied Animal Reproduction**. 5th ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2000. 382 p.

BILBY, T.R.; GUZELOGLU, A.; KAMIMURA, S.; PANCARCI, S.M.; MICHEL, F. HEAD, H.H.; THATCHER, W.W. Pregnancy and bovine somatotropin in nonlactating dairy cows: I. Ovarian, conceptus, and insulin-like growth factor system responses. **Journal of Dairy Science**, Champaign, IL, v. 87, p. 3256-3267, 2004.

BLOCK, J.; BONILLA L.; HANSEN, P.J. Efficacy of in vitro embryo transfer in lactating dairy cows using fresh or vitrified embryos produced in a novel embryo culture medium. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 93, p. 5234-5242, 2010.

BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Effects of nutrition on fertility in dairy cows. **Advances in Dairy Technology**, Jersey, v. 15, p. 19-23, 2003.

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

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

BURATINI JR., J.; PRICE, C.A.; VISINTIN, J.A.; BÓ, G.A. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (BST) on ovarian follicular development in nelore (*Bos indicus*) heifers. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 54, p. 421-432, 2000.

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

CHASE JR., C.C.; KIRBY, C.J.; HAMMOND, A.C.; OLSON, A.C.; LUCY, M.C. Patterns of ovarian growth and development in cattle with a growth hormone receptor deficiency. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 76, p. 212-219, 1998.

COHICK W.S.; ARMSTRONG, J.D.; WHITACRE, M.D.; LUCY, M.C.; HARVEY, R.W.; CAMPBELL, R.M. Ovarian expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF binding proteins, and growth hormone (GH) receptor in heifers actively immunized against GH-releasing factor. **Endocrinology**, Chevy Chase, v. 137, p. 1670-1677, 1996.

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

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

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

DROST, M.; AMBROSE, J.D.; THATCHER, M.J.; CANTRELL, C.K.; WOLFSDORF, K.E.; HASLER, J.F.; THATCHER W.W. Conception rates after artificial insemination or embryo transfer in lactating dairy cows during summer in Florida. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 52, p. 1161–1167, 1999.

DUNNE, L.D.; DISKIN, M.G.; BOLAND, M.P.; O'FARRELL, K.J.; SREENAN, J.M. The effect of pre- and post-insemination plane of nutrition on embryo survival in beef heifers. **Animal Science**, Penicuik, v. 69, p. 411-17, 1999.

FORTUNE, J.E. The early stages of follicular development activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 78, p. 135-163, 2003.

FRERET, S.; GRIMARD, B.; PONTER, A.A.; JOLY, C.; PONSART, C.; HUMBLLOT, P. Reduction of body-weight gain enhances in vitro embryo production in overfed superovulated dairy heifers. **Reproduction**, Southampton, v. 131, p. 783-794, 2006.

GONG, J.G.; BRAMLEY, T.; WEBB, R. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: follicular populations and peripheral hormones. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 45, p. 941-9, 1991.

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

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

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

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo agropecuário 2010**: resultados preliminares. Rio de Janeiro, 2010.

KENDRICK, K.W.; BAILEY, T.L.; GARST, A.S.; PRYOR, A.W.; AHMADZDEH, A.; AKERS, R.M. Effects of energy balance on hormones, ovarian activity, and

recovered oocytes in lactating Holstein cows using transvaginal follicular aspiration. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 82, p. 1731–1740, 1999.

KUWAYAMA, M.; VAJTA, G.; KATO, O.; LEIBO, S.P. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. **Reproductive BioMedicine**, Orlando, v. 11, p. 300-308, 2005.

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

LEROY, J.L.M.R.; OPSOMER, G.; VAN SOOM, A.; GOOVAERTS, I.G.F.; BOLS, P.E.J. Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? Part I. The importance of negative energy balance and altered Corpus luteum function to the reduction of oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows. **Reproduction Domestic Animal**, Malden, v. 43, p. 612-622, 2008a.

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

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

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

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

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

MANN, G.E.; GREEN, M.P.; SINCLAIR, K.D.; DEMMERS, K.J.; FRAY, M.D.; GUTIERREZ, C.G.; GARNSWORTHY, P.C.; WEBB, R. Effects of circulating progesterone and insulin on early embryo development in beef heifers. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 79, p. 71-79, 2003.

MARTÍNEZ, A.G.; DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.C.; BROGLIATTI, G.M. In vitro evaluation and pregnancy rates after vitrification of in vitro produced bovine embryos. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 50, p. 757–767, 1998.

MARTÍNEZ, A.G.; VALCARCEL, A.; DE LAS HERAS, M.A.; DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.; BROGLIATTI, G. Vitrification of in vitro produced bovine embryos: in vitro and in vivo evaluations. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 73, p. 11-21, 2002.

MARTINS, A.C.; MOLLO, M.R.; BASTOS, M.R.; GUARDIEIRO, M.M.; SARTORI, R. Concentrações séricas de hormônios reprodutivos e metabólicos em vacas azebuadas submetidas à baixa ou alta ingestão alimentar (resumo). **Acta Scientiae Veterinarie**, São Paulo, v. 35, p. 1026, 2007.

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

MATTOS, M.C.C. **Vitrificação e congelamento de mórulas e blastocistos produzidos in vivo em *bos taurus* e *bos indicus***. 2010. p. 50-56. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – UNESP, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2010.

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

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

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

MELÉNDEZ, P.; DUCHENS, M. Factores asociados a mortalidad embrionária (30-60 ds) en vacas Holstein de Chile Central. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUCCIÓN ANIMAL. Córdoba, p. 8-10, 2009.

MEZZALIRA, A.; MEZZALIRA, J.C.; MORAES, A.N.; THALER NETO, A.; VIEIRA, A.D.; BARRETA, M.H.; DAMIANI, J.C. Vitrification of bovine embryos: age of embryos and exposure time to cryoprotectant influences viability. **Archives of Veterinary Science**. Curitiba, v. 9, p. 107-111, 2004.

MOLLO, M.R.; RUMPF, R.; MARTINS, A.C.; CARRIJO, L.H.D.; SAUERESSIG, M.G.; SARTORI, R. Produção de embriões em novilhas nelore superovuladas submetidas à baixa ou alta ingestão alimentar (Resumo). **Acta Scientiae Veterinariae**, São Paulo, v. 35, p. 945, 2007a.

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

MOSSA, F.; KENNY, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; SMITH, G.W.; BERRY, D.; BUTLER, S.; FAIR, T.; LONERGAN, P.; IRELAND, J.J.; EVANS, A.C.O. 2009: Undernutrition of Heifers during the First Trimester of Pregnancy Diminishes Size of the Ovarian Reserve in Female Offspring. **42nd Annual Meeting of the Society for Study of Reproduction**, Pittsburg, v.135, p.77.

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

NOLAN, R.; DUFFY, M.; WADE, D.; O'CALLAGHAN, D.; BOLAND, M.P. Effect of quantity and type of diet and frequency of trans-vaginal ovum aspiration on in-vitro embryo development in heifers. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 49, p. 402, 1998a.

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

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of beef cattle**. 7th ed. Washington: National Academy Press, 2000. 232 p.

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

PFEIFER, L.F.M.; SARTORI, R.; PIVATO, I.; RUMPF, R.; NOGUEIRA, G.P.; XAVIER, E.G.; DIONELLO, N.J.L.; CORRÊA, M.N. Effect of circulating progesterone on *in vitro* developmental competence of bovine oocytes. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 6, p. 473-480, 2009.

PINTO, A.B.; SCHLEIN, A.L.; MOLEY, K.H. Preimplantation exposure high insulin-like growth factor I concentrations results in increased resorption rates *in vivo*. **Human Reproduction**, Beigem, v. 17, p. 457-462, 2002.

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

SALES, J.N.S.; IGUMA, L.T.; QUINTÃO, C.C.R.; GAMA, M.A.S.; FREITAS, C.; PEREIRA, M.M.; CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M.; BARUSELLI, P.S. Efeito da dieta com alta energia nos parâmetros metabólicos, endócrinos e reprodutivos de vacas *Bos indicus* e *Bos taurus* (resumo). **Acta Scientiae Veterinariae**, São Paulo, v. 39, p. 395, 2011.

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-17beta in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 11, p. 2831-2842, 2002.

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

SANTOS, J.E.P.; CERRI, R.L.A.; BALLOU, M.A.; HIGGINBOTHAM, G.E.; KIRK, J.H. Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of holstein dairy cows. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 80, p. 31-45, 2004.

SANTOS, R.M. **Efeito da quantidade de concentrado da dieta de vacas holandesas não-lactantes na progesterona plasmática, composição do fluido folicular e produção de prostaglandina pelo endométrio**. 2005. p. 62-65. Tese (Doutorado Reprodução Animal) – UNESP, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2005.

SARTORI, R.; GUARDIEIRO, M.M. Fatores nutricionais associados à reprodução da fêmea bovina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, p. 422-432, 2010.

SARTORI, R.; DODE, M.A.; RUMPF, R. Produção *in vivo* e *in vitro* de embriões bovinos. **Bovinocultura de Corte**, Piracicaba, v. 1, p. 561-584, 2011.

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

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

SARTORI, R.; GÜMEN, A.; GUENTHER, J.N.; SOUZA, A.H.; CARAVIELLO, D.Z.; WILTBANK, M.C. Comparison of artificial insemination *versus* embryo transfer in lactating dairy cows. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 65, p. 1311–1321, 2006.

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

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

SIDDIQUI, M.A.R.; SHAMSUDDIN, M.; BHUIYAN, M.M.U.; AKBAR, M.A.; KAMARUDDIN, K.M. Effect of feeding and body condition score on multiple ovulation and embryo production in zebu cows. **Reproduction of Domestic Animals**, Malden, v. 37, p. 37-41, 2002.

SPEGIORIN, M.R.; SANCHES, B.V.; FORTES-PONTES, J.H.; RIGO, A.G.; UNTURA, R.M.; FERREIRA, C.R.; MOINO, L.L.; BASSO, A.C. Technical report: pregnancy rates evaluation after large scale transfer of in vitro produced and vitrified bovine embryos from diverse breeds (Resumo). **Acta Scientiae Veterinarie**, São Paulo, v. 38, p. 820, 2010.

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

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

STROUD, B.; BÓ, G.A. Estatísticas mundiais de 2009 para transferência embrionária em animais domésticos de fazenda. Resumo do relatório da comissão de recuperação de dados da Sociedade Internacional para Transferência de Embriões (IETS). **Acta Scientiae Veterinarie**, São Paulo, v. 39, p. 157-163, 2011.

THIBIER, M. Transfers of both *in vivo* derived and *in vitro* produced embryos in cattle still on the rise and contrasted trends in other species in 2005. **International Embryo Transfer Society Newsletter**, Collingwood, v. 24, p. 12-18, 2006.

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

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Livestock and poultry**: world markets and trade. Washington: USDA, Foreign Agricultural Service, 2012. 12 p.

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

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

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

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