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

**Produção de embriões e fisiologia ovariana em vacas nelore sob diferentes
níveis nutricionais**

Ricardo da Silva Surjus

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

**Piracicaba
2013**

Ricardo da Silva Surjus
Médico Veterinário

**Produção de embriões e fisiologia ovariana em vacas Nelore sob diferentes
níveis nutricionais**

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**

Surjus, Ricardo da Silva
Produção de embriões e fisiologia ovariana em vacas nelore sob diferentes níveis
nutricionais / Ricardo da Silva Surjus.- - Piracicaba, 2013.
80 p: il.

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

1. Embrião - Produção 2. Insulina 3. Metabolismo animal 4. Nutrição animal 5. Ovário -
Fisiologia 6. Vacas Nelore I. Título

CDD 636.291
S961p

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

À minha Mãe pelo apoio incondicional, pela amizade *E pelo exemplo profissional e
pessoal e familiar*

Ao meu pai pela amizade e conversas intermináveis

Ao meu irmão pelo exemplo de mudança e crescimento

pessoal

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Roberto Sartori Filho pelas oportunidades, confiança, exemplo de profissional. Por ser responsável pelo meu crescimento pessoal e profissional neste período e além de tudo de ser um grande amigo.

À família que apesar de ausente, esteve sempre presente. Aquela que apesar de não concordar com suas decisões vai estar sempre ao seu lado. Que são responsáveis pelos momentos mais intensos (bons e não tão bons assim) da vida. Principalmente aos meus avós. Meu avô Axel por ser exemplo de patriarca e cavalheirismo e equilíbrio, a minha vó Penha ser modelo de família e coração quando o objetivo é defender a família, Minha vó Amélia por ser exemplo de vó e por sua amizade e carinho.

A todos os professores em especial à: Milo Wiltbank pelo aprendizado, baladas, oportunidades, confiança e amizade e muito serviço. Gerson Mourão por nossas horas de discussões (lutas) e aprendizado sobre estatística e amizade. José Eduardo Santos; José Vasconcelos; Alexandre Vaz Pires; Pietro Baruselli por serem exemplos de profissionais, principalmente de orientadores, por explorar a máxima capacidade de seus alunos e ser exemplo para eles.

Às pessoas que me ajudaram a realizar o experimento de mestrado. Michele Bastos (chefa), por ter me ensinado grande parte das biotecnologias, e uma grande amiga, por ser minha chefe é claro. Marta Borsato (Traste), pela amizade, ser meu braço direito durante o experimento e pela teimosia (não podia faltar). Mariana Curci, meu braço esquerdo, pelas risadas e loucuras (muitas). Alexandre Prata, companheiro e parceiro. Fernanda Zinsly, simpatia, amizade e por ser uma companhia agradabilíssima. Aos amigos do LAB: Pedro Leopoldo Monteiro Jr, irmão e cientista; Amandinha Lemes, amizade e ajuda na estatística e por sempre estar disponível para ajudar e com um sorriso no rosto; Fernanda Moura (cearense); determinação e amizade; Monique Guardieiro, criteriosa e pela ajuda nas análises hormonais; Maria Clara Mattos; Aos novos membros da equipe: Leonardo França (Pandinha), amizade e risadas DE MAIS; Jéssica Nora Drum, companheira de experimentos malucos, amiga, parceira; Guilherme Correa; Anibal Nascimento; Louise. Aos meus amigos batateiros, Igor Sokoloski e Murilo Meschiatti amigos, parceiros de festa, de trabalhos, e professores em matar serviço e principalmente de não fazer nada e todo mundo achar (inclusive os próprios) que trabalham muito

(brincadeira). Ao Rafael Teixeira de Sousa e Roberta do Valle, por dedicação nos experimentos malucos, amizade e bom humor por horas intermináveis no tronco.

Ao Sr. Laureano e família, minha família em Piracicaba.

À minha namorada Emiliana Santana Batista, por me ajudar na escrita e revisão da tese e colocar em ordem meus pensamentos malucos e por ser uma grata surpresa (uma pessoa especial quando não estava procurando) e por sua ajuda e apoio incondicional.

Pedro Baggio por seus conselhos, oportunidades e visão empresarial.

Aos ilustres professores do Departamento de Zootecnia por contribuírem direta ou indiretamente para minha formação. A todos os estagiários que passaram pelo Laboratório por poder fazer parte da sua formação e compartilhar meus conhecimentos, e de forma direta me treinar a ser (quem sabe) um bom orientador.

Aos amigos da Flórida; o aprendizado e histórias de vida e principalmente modelos de sinônimos de dedicação e eficiência. Rafael Bisinotto, por ser um grande amigo e Eduardo Ribeiro, por ser exemplo de critério na hora de conduzir o experimento, e um grande amigo (apesar da brincadeira da neve).

À Fazenda Figueira que abriu as portas para a transferência dos embriões. Raí, uma pessoa impar, com muito conhecimento e ensinamentos valiosos, apesar de alguns deslizes.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo Auxílio à pesquisa (Proc. 2010/20704-4) e bolsa de estudos (Proc. 2010/14494-7), sendo parte essencial deste trabalho. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo temporária e ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq).

Muito obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	11
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE ABREVIATURAS.....	17
1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	19
1.1 Introdução	19
1.2 Revisão Bibliográfica	22
1.2.1 Influência da ingestão de matéria seca/energia na população folicular	22
1.2.2 Influência da alta ingestão de matéria seca/energia no diâmetro de estruturas ovarianas e concentração de hormônios esteróides	24
1.2.3 Influência da ingestão alimentar/energia na produção <i>in vivo</i> de embriões	28
1.2.3.1 Resposta superovulatória.....	28
1.2.3.2 Número de embriões e qualidade embrionária.....	29
2 EXPERIMENTO: FISIOLOGIA OVARIANA E CONCENTRAÇÕES DE HORMÔNIOS ESTERÓIDES EM VACAS NELORE SOB DIFERENTES NÍVEIS NUTRICIONAIS.....	32
Resumo	32
Abstract	32
2.1 Introdução	33
2.2 Objetivo	35
2.3 Hipóteses	35
2.4 Material e Métodos	35
2.4.1 Animais e Local	35
2.4.2 Dietas Experimentais.....	36
2.4.3 Sincronização do estro e avaliações ultrassonográficas.....	38
2.4.4 Coleta de Sangue e dosagens hormonais.....	38
2.4.5 Análise estatística.....	39
2.5 Resultados	39
2.5.1 Resultados da dieta padrão	40
2.6 Discussão	45
2.7 Conclusões.....	46
3 PRODUÇÃO IN VIVO DE EMBRIÕES DE VACAS NELORE SUBMETIDAS A DIFERENTES NÍVEIS NUTRICIONAIS	48
Resumo	48
Abstract	49
3.1 Introdução	49
3.2 Objetivo	51
3.3 Hipóteses	51
3.4 Material e Métodos	51
3.5 Resultados	57
3.6 Discussão.....	63
3.7 Conclusões.....	66
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES.....	67
REFERÊNCIAS.....	68

RESUMO

Produção de embriões e fisiologia ovariana em vacas nelore sob diferentes níveis nutricionais

A nutrição está intimamente relacionada com a reprodução nos animais e ainda há muito a se estudar sobre essa inter-relação, principalmente porque ainda há muita controvérsia na literatura sobre este tema. Por exemplo, alguns estudos sugerem ser benéfico o uso do "flushing" nutricional na produção de embriões em ruminantes. Entretanto, a maioria dos trabalhos mostra resultados negativos da alta ingestão de matéria seca (IMS). Dessa forma, existe a necessidade em se avançar nos estudos comparando a fisiologia reprodutiva e produção de embriões em fêmeas sob diferentes níveis nutricionais. Foram utilizadas 33 vacas Nelores não lactantes recebendo um dos quatro tratamentos a seguir: Os grupos Manutença (M), Restrição (0,7M) e Alta IMS (1,5M) receberam a mesma dieta padrão variando a quantidade oferecida. O grupo Alta ingestão de energia (E), recebeu uma dieta com alto teor de amido, com a mesma energia do grupo 1,5M, porém, com a mesma IMS do grupo M. Todas as vacas passaram por todos os tratamentos, em um modelo crossover. Estes animais tiveram o ciclo estral sincronizado e acompanhamento ovariano diário, por meio de ultrassonografia até confirmação da ovulação. Posteriormente, nos dias 7 e 10 do ciclo estral foi avaliado o volume do corpo lúteo (CL). Concentrações circulantes de hormônios esteróides (progesterona [P4] e estradiol [E2]) foram mensuradas em dias estratégicos. Os animais foram submetidos à aspiração intrafolicular (OPU) por volta do dia 12 do ciclo estral e dois dias após a OPU, os animais foram superestimulados e avaliou-se a resposta superovulatória e a qualidade embrionária entre os grupos, assim como a taxa de prenhez de 273 receptoras após transferência em tempo fixo dos embriões vitrificados. As análises foram realizadas de acordo com o Proc GLIMMIX do SAS, com nível de significância de $P < 0,05$. Os resultados estão apresentados na forma de média dos quadrados mínimos $\pm$ erro padrão. Este estudo englobou duas áreas principais: fisiologia e concentrações hormonais (Experimento 1) e produção *in vivo* de embriões (Experimento 2). Apesar de, no Experimento 1, terem sido avaliadas 33 vacas nas quatro repetições, totalizando 132 sincronizações, houve apenas 75 ovulações, as quais foram consideradas para as análises subsequentes. A taxa de ovulação não variou entre os tratamentos (~57%). O folículo ovulatório foi maior conforme a IMS aumentou para a dieta padrão nos grupos 1,5M, M, 0,7M ($14,4 \pm 0,3^a$ vs $12,8 \pm 0,3^b$ vs $12,0 \pm 0,3^c$ nos grupos 1,5M, M e 0,7M, respectivamente). Apesar disso, o E2 circulante não diferiu entre os grupos. O volume do CL no Dia 7 do ciclo estral foi semelhante entre os grupos, todavia o grupo 1,5M apresentou menor concentração de P4 circulante ($2,4 \pm 0,2$ ng/mL) em relação aos grupos M e 0,7M ($2,9 \pm 0,2$ vs $3,0 \pm 0,3$ ng/mL, respectivamente). No Experimento 2, a concentração de insulina plasmática foi maior no grupo E ($8,7 \pm 0,86$ μ UI/mL) comparado com os grupos 0,7M ($4,6 \pm 0,87$) e M ($5,3 \pm 0,85$), não diferindo do grupo 1,5M ($6,6 \pm 0,9$). Houve maior resposta superovulatória (CL) nas doadoras que receberam a dieta padrão, 0,7M ($13,0 \pm 1,3^a$); M ($14,2 \pm 1,2^a$) e 1,5M ($13,9 \pm 1,2^a$) comparado às alimentadas com alta energia ($9,7 \pm 1,2^b$), devido à correlação negativa entre resposta superovulatória e insulina ($r = -0,32$). Apesar disso, não houve diferença entre os grupos para o número total de ovócitos/embriões colhidos (~6 estruturas), embriões viáveis (~3 embriões), ou congeláveis (~2,7 embriões). Independente de tratamento, a insulina circulante ao início da superovulação, apresentou correlação negativa com o número

de embriões viáveis ($r = -0,22$). A prenhez aos 23 e 53 dias após a transferência dos embriões não diferiu entre os tratamentos, entretanto, a insulina circulante das doadoras teve correlação negativa com a prenhez das receptoras aos 60 dias de gestação ($r = -0,16$). Em conclusão, diferentes níveis de IMS alteraram o tamanho das estruturas ovarianas e/ou as concentrações circulantes de hormônios esteróides. Apesar disso, houve um efeito muito discreto de dieta na resposta superovulatória e qualidade embrionária das vacas. Independente de tratamento, alta insulina circulante das doadoras foi associada a menor resposta superovulatória, número de embriões viáveis e prenhez das receptoras aos 60 dias de gestação.

Palavras Chave: Ovário; Metabolismo; Insulina; Embrião

ABSTRACT

Embryo production and ovarian physiology in cows under different levels nutritional nellore

Nutrition is closely related to reproduction and there is still much to learn about this relationship, mainly because there is so much controversy in the literature on this topic. For example, some studies propose beneficial use of nutritional "flushing" on embryo production in ruminants. However, most studies show negative results of high dry matter intake (DMI). Thus, there is a need to advance in studies comparing reproductive physiology and embryo production in females under different nutritional levels. A total of 33 non-lactating Nelore cows received one of the following treatments: Groups maintenance (M), Restriction (0.7M) and High DMI (1.5M) received the same standard diet with variations in the amount offered. The group High intake of energy (E) received a diet with high starch content, but the same amount of energy as group 1.5M, however, with the same DMI as Group M. All cows underwent all treatments in a crossover model. These animals had their estrus synchronized and ovarian dynamics was monitored daily by ultrasound until confirmation of ovulation. Subsequently, on days 7 and 10 of the estrous cycle the volume of the corpus luteum (CL) was estimated. Circulating concentrations of steroid hormones (progesterone [P4] and estradiol [E2]) were measured in strategic days. The cows underwent intrafollicular aspiration (OPU) on day 12 of the estrous cycle, and two days after OPU, the cows ovaries were supererstimulated. The superovulatory response and embryo quality was compared among groups, as well as pregnancy rate of 273 recipients after receiving fixed-time transfer of vitrified embryos. Analyses were performed according to the Proc GLIMMIX of SAS, with a significance level of $P < 0.05$. Results are presented as least squares means $\pm$ standard error. This study included two main areas: physiology and hormone concentrations (Experiment 1) and *in vivo* embryo production and pregnancy rate (Experiment 2). Although, in Experiment 1, 33 cows were evaluated in four repetitions, totaling 132 synchronizations, there were only 75 ovulations, which were considered for subsequent analyzes. The ovulation rate did not vary between treatments ($\sim 57\%$). The size of the ovulatory follicle increased as the DMI of the standard diet increased (14.4 ± 0.3^a vs 12.8 ± 0.3^b vs 12.0 ± 0.3^c for groups 1.5 M, M and 0.7M, respectively). Nevertheless, the circulating E2 did not differ between groups. The volume of the CL on Day 7 of the estrous cycle increased as the DMI of the standard diet increased, but the 1.5M group had lower circulating concentrations of P4 (2.4 ± 0.2 ng/mL) than groups M and 0.7M (2.9 ± 0.2 and 3.0 ± 0.3 ng/mL, respectively). In Experiment 2, plasma insulin concentration was higher in the E group (8.7 ± 0.86 μ IU/mL) compared with groups 0.7 M (4.6 ± 0.87) and M (5.3 ± 0.85) not differing from group 1.5M (6.6 ± 0.9). There was a higher superovulatory response (CL) in donors receiving the standard diet [0.7M (13.0 ± 1.3), M (14.2 ± 1.2) and 1.5M (13.9 ± 1.2)] compared with those fed high energy (9.7 ± 1.2 CL) due to the negative correlation between superovulatory response and circulating insulin ($r = -0.32$). Nevertheless, there was no difference between groups for the total number of oocytes/embryos collected (~ 6 structures), viable embryos (~ 3 embryos), or freezable (~ 2.7 embryos). Regardless of treatment, circulating insulin at the beginning of superovulation, was negatively correlated with the number of viable embryos ($r = -0.22$). Pregnancies at 23 and 53 days after embryo transfer did not differ between treatments, however, circulating insulin of the donor cows had a

negative correlation with pregnancy of recipients at 60 days of gestation ($r = -0.16$). In conclusion, different levels of DMI changed the size of ovarian structures and/or the concentrations of circulating steroid hormones. Nevertheless, there was a very minor effect of diet on superovulatory response and embryo quality in cows. Regardless of treatment, high circulating insulin of the donors was associated with lower superovulatory response, lower number of viable embryos and less pregnancies of recipients at 60 days of gestation.

Keywords: Ovary; Metabolism; Insulin; Embryo

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Estudos realizados em vacas *Bos taurus*, *Bos indicus* ou cruzadas mostrando a influencia da ingestão de matéria seca/energia sobre a população de folículo antral antes da aspiração intra-folicular ou superovulação. Os animais experimentais eram alimentados dieta de manutenção (1 x M) ou abaixo da manutenção vs animais alimentados acima da manutenção (> M), durante diferentes períodos (Sartori et al., 2012).....24
- Tabela 2 - Porcentagem dos componentes das duas dietas utilizadas no experimento, assim como nutrientes digestíveis totais (NDT) e proteína bruta (PB), a principal diferença seria na relação milho/bagaco de cana *in natura*.....37
- Tabela 3 - Análise dos resultados dos quatro grupos experimentais, quanto ao peso inicial e final, ganho médio diário (GMD), ingestão de matéria seca (CMS), dias para a ovulação (DOV), crescimento folicular, folículo ovulatório estradiol, volume do CL no dia 6 e progesterona dia 6 (P4 D6), assim como volume do CL (CL D6) e progesterona no dia 9 (P4 do D9) após a ovulação. Piracicaba - SP.**Erro! Indicador não definido.**0
- Tabela 4 - Análise dos resultados dos grupos experimentais, quanto ao peso inicial e final, ganho médio diário (GMD), ingestão de matéria seca (IMS), concentração de insulina, dias para a ovulação (DOV), crescimento folicular, diâmetro do folículo ovulatório, concentração de estradiol, volume do CL no dia 6, concentração de progesterona dia 6 (P4 D6) e número de folículos. Piracicaba - SP.....**Erro! Indicador não definido.**
- Tabela 5 - Índices corporais de 33 vacas Nelore não-lactantes em 4 réplicas experimentais, observados durante o experimento recebendo uma das quatro dietas: restrição (0,7M), manutenção (M), alta ingestão (1,5M) e alta energia (E) durante períodos de 42 dias em design *cross over*. GMD, ganho médio diário; ECC, escore de condição corporal; IMS, ingestão de matéria seca. Piracicaba- SP.**Erro! Indicador não definido.**58
- Tabela 6 - Média dos quadrados mínimos $\pm$ erro padrão em relação as variáveis de população folicular antes e depois da OPU, resposta superestimulatória e superovulatória entre as dietas 0,7M, M, 1,5M e grupo energia. Piracicaba-SP.....**Erro! Indicador não definido.**.....59
- Tabela 7 - Número total de estruturas, de embriões fertilizados, viáveis congeláveis; assim como a taxa de embriões viáveis, congeláveis e taxa de recuperação entre os tratamentos.....60

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Vacas utilizadas no experimento, confinamento da área experimental da ESALQ-USP. Disposição de duas vacas por baia e divididas de acordo com o peso corporal depois do período de adaptação na primeira réplica do experimento.....36
- Figura 2 - Esquema representativo do delineamento experimental, a figura mostrando o período das dietas experimentais, os dias são relacionados ao início do fornecimento das dietas. Legenda: PGF = prostaglandina F2 α , OPU = aspiração folicular (“ovum pick-up”), US = ultrassonografia diária, CS = coleta de sangue.....37
- Figura 3 - Resultados (média $\pm$ EP) do diâmetro do folículo ovulatório e concentração do pico de estradiol no sangue de vacas Nelore não-lactantes submetidas aos três tratamentos em delineamento cross over.**Erro! Indicador não definido.2**
- Figura 4 - Regressão do diâmetro do folículo ovulatório e ingestão de matéria seca por baia de todos os folículos ovulatórios, independente dos grupos...**Erro! Indicador não definido.2**
- Figura 5 - Resultados (média $\pm$ EP) do volume de corpo lúteo e concentração de progesterona no sangue seis dias após a ovulação de vacas Nelore não-lactantes submetidas a mesma dieta e três níveis de ingestão de matéria seca.....**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 6 – Regressão alta e positiva entre volume do CL e ingestão de matéria seca por baia, independente do tratamento em vacas nelore não-lactantes.44
- Figura 7 - Modelo hipotético da influência do nível de ingestão alimentar sobre o diâmetro de folículo ovulatório e pico de estradiol e volume luteal e concentração de progesterona no dia 6 após a ovulação.47
- Figura 8 - Esquema representativo do delineamento experimental, mostrando o período das dietas experimentais, o protocolo de superestimulação ovariana e os exames ultrassonográficos (US). Legenda: D0= dia do início do fornecimento das dietas; D30= dia da aspiração intrafolicular e inserção do dispositivo; D32= início do protocolo de superestimulação; P4 = dispositivo intravaginal de progesterona; P4 remoção do DIV, FSH = hormônio folículo estimulante; PGF = prostaglandina F2 α , GnRH = hormônio liberador de gonadotrofina; IA = inseminação artificial; OPU = aspiração folicular (“ovum pick-up”), D42 colheita embrionária e final do período da dieta experimental, o dia da colheita foi realizado dia 7 ou 8 após o GnRH.....53
- Figura 9 - 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 0,5 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.....56
- Figura 10 – Resultados da população folicular $\geq$ 3mm (n folículos FSH) no primeiro dia de FSH, resposta superestimulatória (último FSH) e resposta superovulatória (Número de folículos ovulados), entre as dietas fornecidas.....59

Figura 11 – Regressão entre número de embriões viáveis e concentração de insulina no primeiro dia do FSH, mostrando todos os tratamentos juntos.....	61
Figura 12 - Taxa de concepção aos 23 e 53 dias após a inovulação embrionária após desvitrificação e a perda embrionária e fetal entre os dias 23 e 53 dias.....	62
Figura 13 – Taxa de concepção aos 23 e 53 dias após a transferência dos embriões após desvitrificação e a perda embrionária/fetal entre os dias 23 e 53 dias de acordo com o grau de desenvolvimento embrionário, independente das dietas as quais foram submetidas.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS

BE	- Benzoato de estradiol
CL	- Corpo lúteo
D	- Dia
DIB®	- Dispositivo intravaginal de progesterona (Syntex S.A)
E ₂	- Estradiol
ECC	- Escore de condição corporal
eCG	- Gonadotrofina coriônica equina
ECP	- Cipionato de estradiol
FAO	- Food and Agriculture Organization
FD	- Folículo dominante
FSH	- Hormônio folículo estimulante
g	- Grama
GnRH	- Hormônio liberador de gonadotrofinas
IA	- Inseminação artificial
IATF	- Inseminação artificial em tempo fixo
IFN- τ	- Interferon-tau
IMS	Ingestão de matéria seca
Kg	- Quilograma
LH	- Hormônio luteinizante
LHr	- Receptores de LH
mL	- mililitros
mm	milímetros
Ng	- nanograma
P ₄	- Progesterona
PGF	- Prostaglandina F2alfa
STAR	- Proteína de regulação aguda da esteroidogênese

CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 Introdução

O total de embriões bovinos transferidos no mundo foi aproximadamente um milhão em 2010 (56,7% *in vivo* e 43,3% *in vitro*). Mais que 30% destes embriões foram transferidos no Brasil (Stroud e Callesen 2012) e de origem zebuína. A maioria dos embriões foi transferida a fresco (Stroud e Callesen 2012), principalmente porque os embriões *Bos indicus* são mais vulneráveis ao congelamento convencional comparados aos embriões *Bos taurus* (Viana e Camargo, 2007). Entretanto, muitos fatores podem influenciar a produção de embriões, como a genética das doadoras, aspectos técnicos, assim como a nutrição. As doadoras frequentemente apresentam sobrepeso e são submetidas a um manejo nutricional inadequado podendo comprometer os resultados (Santos, Cerri *et al.*, 2008).

A nutrição é o fator mais impactante na fertilidade, entretanto o conhecimento de cada nutriente específico que pode influenciar a resposta superovulatória (SOV), qualidade e número de oócitos e embriões, assim como a subsequente concepção são poucos conhecidos (Santos, Cerri *et al.*, 2008). Tanto o excesso, quanto a falta de nutrientes afetam a fertilidade, sendo a energia o principal fator que influencia na reprodução. A falta de energia é a principal causa para baixa fertilidade em rebanhos de corte criados em sistema extensivos (Bó, Baruselli *et al.*, 2003), assim como o atraso ao retorno da ciclicidade em vacas no pós-parto. Há relatos de vacas na Venezuela em condições tropicais com mais de 180 dias para o retorno à ciclicidade (Perea, De Ondiz *et al.*, 2008).

Outros fatores relacionados a uma nutrição inadequada são: atraso na puberdade, queda na taxa de concepção. Souza, Viechnieski *et al.* (2009) demonstraram uma queda de 50% na concepção de vacas leiteiras com baixo escore de condição corporal (ECC), comparadas com vacas de alto ECC. Isto foi demonstrado também em gado de corte (Peres, Claro *et al.*, 2009; Sá Filho, Santos *et al.*, 2011).

Muitos estudos têm relacionado nutrição a problemas de fertilidade, especialmente em vacas leiteiras que apresentam severo balanço energético negativo (BEN), evidenciado pela queda de ECC no pós-parto (Moreira, Risco *et al.*, 2000; López-Gatius, 2003). Além disso, também tem sido demonstrado o efeito

negativo do excesso de energia (Wiltbank, Lopez *et al.*, 2006; Santos, Cerri *et al.*, 2008), os efeitos tóxicos do nitrogênio nas dietas (Butler, 1998; Dawuda, Scaramuzzi *et al.*, 2002; Rhoads, Rhoads *et al.*, 2006), assim como deficiências de vitaminas e minerais (Ingraham, Kappel *et al.*, 1987; Aréchiga, Ortiz *et al.*, 1994; Aréchiga, Vázquez-Flores *et al.*, 1998).

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, 2002). Acredita-se que o tipo e/ou quantidade da dieta fornecida aos animais antes de iniciar os programas de superestimulação ovariana tem forte influência sobre a resposta superovulatória e qualidade embrionária (Yaakub, O'callaghan *et al.*, 1999). Entretanto, fatores relacionados à produção embrionária *in vivo* e *in vitro* parecem ser controversos na literatura (Sartori, Guardieiro *et al.*, 2012). Alguns autores relatam o benefício do “flushing” nutricional na população folicular (Gutierrez, Oldham *et al.*, 1997) e resposta superovulatória (Gong, Armstrong *et al.*, 2002), entretanto, a maioria dos trabalhos demonstra um declínio na resposta superovulatória e embriões produzidos (Nolan, O'callaghan *et al.*, 1998; Yaakub, O'callaghan *et al.*, 1999; Wrenzycki, De Sousa *et al.*, 2000; Siddiqui, M., Shamsuddin, M. *et al.*, 2002; Lozano, Lonergan *et al.*, 2003; Mollo, Rumpf *et al.*, 2007).

Diversos estudos sugerem que a alta IMS por um período prolongado pode exercer um efeito deletério sobre a maturação ovocitária e produção de embriões, possivelmente devido ao excesso de IGF-I (Webb, Garnsworthy *et al.*, 2004) e à hiperinsulinemia (Adamiak, Mackie *et al.*, 2005), pois acredita-se que a alta IMS, associada ao elevado ECC desenvolva um quadro de resistência à insulina, resultando em comprometimento da qualidade dos gametas e de embriões produzidos.

Além do efeito negativo das dietas com alta energia, sabe-se que a alta IMS também pode comprometer a eficiência reprodutiva por reduzir as concentrações circulantes de hormônios esteróides. Em ovelhas (Parr, Davis *et al.*, 1993) e em vacas (Sangsritavong, Combs *et al.*, 2002; Vasconcelos, Sangsritavong *et al.*, 2003) a alta IMS aumentou o catabolismo da progesterona (P4) no fígado. Consequentemente, diminuiu a concentração circulante de P4, aumentando a pulsatilidade de LH, podendo comprometer a maturação do ovócito e o

desenvolvimento precoce do embrião (Mcevoy, Mayne *et al.*, 1995; Revah e Butler, 1996). Além do mais, baixas concentrações de P4 no ciclo estral prévio podem reduzir a prenhez em vacas (Meisterling e Dailey, 1987). Essa baixa concentração de hormônios esteróides pode comprometer a qualidade embrionária (Sartori, Sartor-Bergfelt *et al.*, 2002). Com o aumento da concentração circulante de P4 previamente à IATF em vacas de alta produção, por meio do protocolo Duplo-Ovsynch, houve melhora significativa na qualidade embrionária (Wiltbank; comunicação pessoal). Da mesma forma, aumento da P4 durante o protocolo de superovulação, aumentou a produção de embriões viáveis (Rivera, Narciso *et al.*, 2010). Lemley, Vonnahme *et al.*, (2010) forneceram uma dieta isoenergética com duas diferentes fontes de carboidratos e relataram que, dietas à base de amido aumentaram a insulina circulante e diminuíram a expressão de enzimas (CYP2C, CYP3A AKR1C) relacionadas ao catabolismo de hormônios esteróides. Entretanto, a quantidade de MS foi diferente entre as dietas, podendo influenciar no catabolismo de hormônios esteróides. Os fatores que influenciam o metabolismo dos hormônios esteróides não estão claros. Sabe-se que o aumento da IMS aumenta o catabolismo destes hormônios, entretanto ainda não está claro se este efeito se deve principalmente ao aumento da IMS, independente do nível de energia, ou da alta energia consumida, mesmo com quantidades inferiores de MS.

1.2 Revisão Bibliográfica

1.2.1 Influência da IMS/energia na população folicular

O O número de folículos nos ovários é um dos principais fatores que influenciam a resposta superovulatória (Gong, 2002) e está relacionado com a fertilidade (Ireland, Smith *et al.*, 2011). A maioria dos fatores que influenciam a população folicular é ainda desconhecida (Ireland, Smith *et al.*, 2011). A população de folículos antrais não é influenciada pela a concentração de FSH circulante, pois está correlacionada negativamente com a concentração de FSH (Ireland, Scheetz *et al.*, 2008), e apresenta uma alta repetibilidade no mesmo animal (0,85; Burns, Jimenez-Krassel *et al.*, 2005). Em um protocolo de superovulação, a população de folículos antrais está relacionada com o número de folículos que responderão ao tratamento com FSH, número de CL no dia da colheita (Singh, Dominguez *et al.*, 2004; Ireland, Ward *et al.*, 2007) e ao número de embriões produzidos (Ireland, Ward *et al.*, 2007). Então, muitos trabalhos foram realizados com o intuito de aumentar a população folicular das doadoras.

Estudos demonstraram aumento na população folicular em animais que passaram por “flushing” nutricional (Gutierrez, Oldham *et al.*, 1997; Armstrong, Mcevoy *et al.*, 2001; Gong, Armstrong *et al.*, 2002) e tratamento com somatotropina recombinante bovina (Gong, Bramley *et al.*, 1991; Buratini, Price *et al.*, 2000). Aparentemente, o mecanismo envolvendo o aumento do número de folículos é devido à alta ingestão de alimento, relacionado com elevação nas concentrações de insulina e IGF-1. O aumento na concentração de insulina induzido pela alta ingestão, diminui a expressão de proteínas ligantes ao IGF (IGFBP), aumentando a biodisponibilidade do IGF-1 (Armstrong, Mcevoy *et al.*, 2001; Gong, 2002). Ambos, IGF-1 e insulina, agem como potentes estimuladores da proliferação das células da granulosa e esteroidogênese (Webb, Garnsworthy *et al.*, 2004). O IGF-1 atua em sinergismo com o FSH sobre a esteroidogênese pelo aumento da atividade da enzima P450 aromatase (Echternkamp, Howard *et al.*, 1994).

Mani, Fenwick *et al.*, (2010) cultivaram células da granulosa de bovinos com IGF-1 com soro livre de insulina. Estes autores encontraram aumento significativo na produção de estradiol-17 β , número de células da granulosa e aumento da expressão de genes relacionados à esteroidogênese (CYP11A1, HSD3B1, e CYP19A1), e expressão de genes que codificam receptores de IGF-1 e FSH (IGF-1R e FSHR), comparadas com as células cultivadas somente com FSH.

Bastos, Mattos *et al.*, (2010) comparando vacas não lactantes *Bos indicus* vs *Bos taurus*, alimentadas com dieta de manutenção, observaram um maior número de folículos nas vacas *Bos indicus* ($42,7 \pm 5,9$) que nas *Bos taurus* ($19,7 \pm 3,2$; $P < 0,05$), além de maiores concentrações de insulina ($9,9 \pm 1,5$ vs $3,0 \pm 0,7$; $\mu\text{UI/mL}$) e maiores concentrações de IGF-1 circulante ($245,5 \pm 12,0$ vs $198,3 \pm 10,3$ ng/mL; $P < 0,05$). Apesar dos dados apresentados do efeito da insulina e IGF-1 (Sartori, Guardieiro *et al.*, 2012) sobre a população folicular, muitos autores não encontraram efeito da alta IMS na população folicular, e alguns trabalhos apresentam resultados negativos (Tabela 1). A maioria dos estudos que não apresentam efeito da IMS no número de folículos foi feita em vacas *Bos indicus* (Tabela 1), e/ou em animais submetidos à alta IMS por um longo período (> 60 dias), que resultou em alta concentração de insulina circulante (Sartori, Guardieiro *et al.*, 2012).

Mollo, Rumpf *et al.*, (2007) submeteram 39 novilhas *Bos indicus* por um período de nove semanas, um grupo recebendo dieta *ad libitum* ($\sim 170\%$ a dieta de manutenção; 1,7M) e outro restrita (0,7M). No início do tratamento com FSH, as novilhas do grupo *ad libitum* apresentaram maior concentração de insulina ($14,3 \pm 1,7$ vs $3,0 \pm 0,8$ $\mu\text{IU/mL}$), entretanto apresentaram menor número de folículos ≥ 3 mm ($42,6 \pm 6,6$ vs $32,6 \pm 2,5$; $P = 0,10$) comparadas às novilhas do grupo restrito. Adamiak, Mackie *et al.*, (2005) não encontraram diferença na população folicular entre as novilhas que receberam alta IMS e manutenção (~ 13 folículos), entretanto quando classificaram os animais pelos níveis de insulina, os hiperinsulinêmicos (Insulina > 3 desvios-padrão da média) apresentaram menor quantidade de folículos, comparados aos animais com níveis de insulina normal. Estes autores relataram um efeito crônico e deletério da alta concentração de insulina, contrastando com o “flushing nutricional”.

Tabela 1- Estudos realizados em vacas *Bos taurus*, *Bos indicus* ou cruzadas mostrando a influencia da ingestão de matéria seca/energia sobre a população de folículo antral antes da aspiração intra-folicular ou superovulação. Os animais experimentais eram alimentados com dieta de manutenção (M) ou abaixo da manutenção (<M) vs animais alimentados acima da manutenção (>M), durante diferentes períodos (Sartori, Guardieiro *et al.*, 2012a)

Referência	N	Grupo genético	Categoria	Tempo das dietas (d)	M ou <M	>M	Diferença (%)	P
Gutierrez <i>et al.</i> (1997)	28	<i>Bos taurus</i>	Novilhas	30	18,0	25,0	38,9	<0,05
Nolan <i>et al.</i> (1998)	33	<i>Bos taurus</i>	Novilhas	17	6,7	6,7	0,00	>0,1
Mackey <i>et al.</i> (2000)	11	<i>Bos taurus</i>	Novilhas	14	5,9	9,2	55,9	0,1
Armstrong <i>et al.</i> (2001)	24	<i>Bos taurus</i>	Novilhas	12	8,1	11	35,8	<0,05
Gong <i>et al.</i> (2002)	24	<i>Bos taurus</i>	Novilhas	16	8,7	14,5	66,7	<0,05
Adamiak <i>et al.</i> (2005)	48	<i>Bos taurus</i>	Novilhas	70	12,6	13,0	3,2	>0,1
Bastos <i>et al.</i> (2007a)	28	Cruzadas <i>taurus X indicus</i>	Vaca seca	7	19,5	16,4	-15,9	>0,1
Salles <i>et al.</i> (2011)	28	<i>Indicus taurus X indicus</i>	Novilhas	42	25,2	24,5	-2,8	>0,1
Bastos <i>et al.</i> (2012)	44	<i>indicus</i>	Vaca seca	~20	18,9	16,6	-12,2	>0,1
Martins <i>et al.</i> (2006)	20	<i>Bos indicus</i>	Vaca seca	35	14,8	17,1	15,5	<0,05
Bastos <i>et al.</i> (2007b)	72	<i>indicus</i>	Novilhas	7	54,4	51,6	-5,2	>0,1
Mollo <i>et al.</i> (2007)	39	<i>Bos indicus</i>	Novilhas	63	42,6	32,6	-23,5	0,098
Surjus <i>et al.</i> (2012a)	66	<i>Bos indicus</i>	Vaca seca	32	11,1	12,8	15,3	<0,05

1.2.2 Influência da IMS/energia na diâmetro das estruturas ovarianas e na concentração de hormônios esteróides

Muitos trabalhos avaliaram o efeito da alta IMS na concentração de hormônios esteróides e no tamanho de estruturas ovarianas, entretanto a maioria deles avaliou os resultados de forma indireta, correlacionando-os com a produção de leite, pois esta apresenta uma alta correlação com a IMS ($r = 0,88$; Harrison, Ford *et al.*, 1990). Vacas de alta produção apresentam um tamanho folicular maior, entretanto apresentam menor concentração de E2 comparado com novilhas (Sartori, Haughian *et al.*, 2004; Wolfenson, Inbar *et al.*, 2004). Novilhas Nelore, submetidas à alta IMS (1,5M), apresentaram maior tamanho folicular, entretanto a concentração de

E2 não diferiu das novilhas alimentadas com 70% da manutenção (0,7M; Sartori, Barros 2011). Em outro estudo com vacas Nelores não-lactantes submetidas à mesma dieta acima, o tamanho folicular não diferiu, entretanto as vacas sob restrição alimentar (0,7M) apresentaram maior concentração sérica pré-ovulatória de E2 comparadas às *ad libitum* (~1,7M; $17,2 \pm 2,5$ vs. $9,8 \pm 1,2$ pg/mL; $P = 0,03$; Martins, Mollo *et al.*, 2007). Do mesmo modo, Lopez, Satter *et al.*, (2004) observaram folículos maiores ($18,6 \pm 0,3$ vs $17,4 \pm 0,2$ mm; $P < 0,05$), porém E2 circulante mais baixo ($6,8 \pm 0,5$ vs. $8,6 \pm 0,5$ pg/mL; $P < 0,05$) em vacas HPB de alta produção ($46,8 \pm 1,0$ kg/dia) comparadas a vacas HPB de menor produção ($32,3 \pm 0,8$ kg/dia).

Devido à baixa concentração de E2, o folículo demora um tempo maior para ovular em vacas lactantes comparado a novilhas (Sartori, Haughian *et al.*, 2004). Este aumento no período de dominância folicular pode comprometer a fertilidade. Cerri, Rutigliano *et al.*, (2009) reportaram aproximadamente 80% de embriões viáveis em vacas com período de dominância entre 5,5 e 6 dias, entretanto observaram somente 45% de embriões viáveis, quando a dominância foi de 8,5 a 11 dias. Há uma correlação negativa ($r = -0,22$) entre o período de dominância e taxa de concepção (Bleach, Glencross *et al.*, 2004).

O E2 peri-ovulatório mais baixo também pode comprometer a fertilidade em vacas de corte e de leite. Bridges, Mussard *et al.*, (2010) relataram que novilhas com pró-estro curto com o mesmo tamanho folicular e mesma idade do folículo, apresentaram uma concentração de E2 mais baixa comparada com vacas com pró-estro longo. As novilhas de pró-estro curto apresentaram maior proporção de ciclo curto, além de menor fertilidade. Além disso, Bridges, Mussard *et al.*, (2010) demonstraram que com aumento do pró-estro/E2 ocorre um aumento na taxa de concepção. Similarmente, Ribeiro, Monteiro *et al.*, (2012), trabalhando com aproximadamente 1000 vacas HPB lactantes a pasto, encontraram uma maior concepção aos 60 dias em vacas que aumentaram o pró-estro/E2. Em vacas HPB lactantes com baixo ECC, houve um incremento na concepção em vacas suplementadas com E2 (40,0% vs. 28,1%) durante o protocolo Ovsynch, entretanto não houve diferença nas vacas com ECC normal (Souza, Gümen *et al.*, 2007). A ação benéfica do E2 na fertilidade aparentemente envolve vários fatores, sendo relatados: a melhora no transporte espermático (Hawk e Cooper, 1975; Gaddum-Rosse, 1981; Orihuela, Ortiz *et al.*, 1999), redução da incidência de ciclo curto (Mann

e Lamming, 2000; 2001; Mussard, Burke *et al.*, 2007; Bridges, Mussard *et al.*, 2010), expressão de genes importantes para a manutenção da gestação (Bridges, Mussard *et al.*, 2012), ou benefício na manutenção da gestação (Wiltbank, Souza *et al.*, 2012).

A duração do estro apresenta alta correlação com o pico de E2 ($r = 0,57$), entretanto apresenta uma forte e negativa correlação com produção de leite ($r = -0,45$; Lopez, Satter *et al.*, 2004). Vacas de alta produção de leite apresentam uma menor duração e intensidade do estro comparadas a vacas de baixa produção (Lopez, Satter *et al.*, 2004). A duração do estro parece também ser influenciada pelo nível de IMS/energia a qual as fêmeas são submetidas. Mollo, Rumpf *et al.*, (2007) observaram que vacas sob restrição alimentar (0,7M) tiveram maior duração ($17,1 \pm 2,5$ vs. $10,7 \pm 2,2$ h) e intensidade ($29,8 \pm 5,1$ vs. $8,9 \pm 1,9$ montas) do estro comparadas a novilhas alimentadas *ad libitum*.

O tamanho do folículo ovulatório apresenta alta correlação com o tamanho do CL subsequente (Vasconcelos, Sartori *et al.*, 2001; Sartori, Rosa *et al.*, 2002). Vacas de alta produção de leite apresentaram um maior CL ($11.120 \pm 678 \text{ mm}^3$) comparadas a novilhas ($7.303 \pm 308 \text{ mm}^3$), entretanto as vacas apresentaram menores concentrações de P4 plasmática em relação às novilhas ($5,6 \pm 0,5$ vs. $7,3 \pm 0,4$ ng/mL; respectivamente; Sartori, Haughian *et al.*, 2004). De maneira similar, novilhas submetidas à alta de ingestão alimentar apresentaram um maior CL comparadas às submetidas a baixa ingestão alimentar (5199 ± 376 vs $4096 \pm 174 \text{ mm}^3$), entretanto a concentração circulante de P4 não diferiu entre os grupos (Mollo, Rumpf *et al.*, 2007).

Os efeitos benéficos da P4 circulante mais alta antes e depois da IA, são amplamente discutidos e demonstrados em vacas leiteiras lactantes (Bisinotto, Chebel *et al.*, 2010; Wiltbank, Sartori *et al.*, 2010; Bisinotto e Santos, 2011; Wiltbank, Souza *et al.*, 2012). Vacas lactantes que apresentam alta concentração de P4 antes da IA, apresentam uma redução na ovulação dupla (Wiltbank, Souza *et al.*, 2011a), assim como, uma melhor qualidade embrionária e fertilidade (Fonseca, Britt *et al.*, 1983; Stevenson, Pursley *et al.*, 2006; Stevenson, Dalton *et al.*, 2008; Chebel, Al-Hassan *et al.*, 2010; Wiltbank, Souza *et al.*, 2011a), além de redução da perda embrionária/fetal entre os dias 30 e 60 de gestação (Bisinotto, Chebel *et al.*, 2010).

Em vacas de corte zebuínas submetidas ao protocolo de IATF baseado na associação de P4 e E2, aparentemente a alta concentração de P4 antes da IA não é

benéfica. Há uma correlação negativa entre concentração de P4 na retirada do dispositivo de liberação de P4 e probabilidade de prenhez (Meneghetti, Sá Filho *et al.*, 2009; Peres, Claro *et al.*, 2009), pois vacas zebuínas com alta concentração de P4 durante o protocolo tem uma menor taxa de crescimento folicular e, consequentemente, um menor folículo no dia da IATF (Carvalho, Carvalho *et al.*, 2008). Vacas *Bos indicus* apresentam uma correlação alta e positiva entre o tamanho folicular no dia da IATF e probabilidade de prenhez (Peres, Claro *et al.*, 2009; Sá Filho, Santos *et al.*, 2011). Entretanto, pode haver um efeito de confundimento em relação à ação da alta concentração de P4 no dia da retirada do dispositivo, pois o indutor de ovulação utilizado nestes estudos foi o cipionato de estradiol, que pode ter causado um feed back negativo associado à alta P4 (Bo, Adams *et al.*, 1995), ou essas vacas apresentarem P4 mais alta no momento da IATF (Wiltbank, Souza *et al.*, 2012).

Outro efeito benéfico da alta concentração de P4 após a IA está no útero, agindo no alongamento do concepto (Mann, Lamming *et al.*, 1999; Clemente, De La Fuente *et al.*, 2009) e regulando receptores moleculares responsáveis pela manutenção da gestação. Entretanto, na maioria dos trabalhos esses efeitos na taxa de concepção são discretos (abaixo de 5%; Wiltbank, Souza *et al.*, 2011b; Nascimento, Souza *et al.*, 2012).

Há duas possibilidades que podem explicar essa diferença na concentração circulante de hormônios esteróides em animais submetidos a diferentes níveis de ingestão: 1. menor produção ou 2. maior metabolização hepática destes hormônios em animais com maior IMS. Quanto à primeira, não há nenhum trabalho que a tenha comprovado adequadamente, entretanto alguns estudos indicam que a produção de esteróides seja similar. Bastos (2012), aspirou o folículo pré-ovulatório no momento do início do estro e observou concentração folicular de E2 similar em vacas sob baixa ou alta IMS. A segunda hipótese, do metabolismo de hormônios esteróides, foi demonstrada pela primeira vez em porcas e ovelhas (Christenson *et al.*, 1985; Parr *et al.*, 1993). Há alta correlação da IMS, fluxo hepático e taxa de metabolismo dos hormônios esteróides em vacas leiteiras lactantes (Sangsritavong *et al.*, 2002; Vasconcelos *et al.*, 2003). Vacas leiteiras lactantes tem duas vezes mais fluxo hepático comparadas a vacas não lactantes com peso e idade similares, acarretando uma maior metabolização dos hormônios esteróides e consequentemente menor

concentração destes na corrente sanguínea (Sangsritavong et al., 2002) levando a queda na fertilidade (Wiltbank et al., 2006).

1.2.3 Influência da IMS/energia na produção *in vivo* de embriões

1.2.3.1 Resposta superovulatória

Há uma controvérsia na literatura sobre o efeito da alta ingestão alimentar sobre a resposta superestimulatória (número de folículos no último dia do protocolo de superestimulação); ou na resposta superovulatória (número de CL no dia da coleta ou folículos ovulados). Alguns trabalhos relatam um efeito positivo no número de ovulações (Gong, Armstrong et al., 2002), entretanto alguns estudos não mostraram efeito (Bastos, Martins et al., 2007; Surjus, Prata et al., 2012), ou mesmo efeito negativo (Nolan, O'callaghan et al., 1998; Yaakub, O'callaghan et al., 1999; Wrenzycki, De Sousa et al., 2000; Siddiqui, M., Shamsuddin, M. et al., 2002; Lozano, Lonergan et al., 2003; Mollo, Rumpf et al., 2007).

Gutierrez, Oldham et al., (1997) concluíram que a alta IMS por duas semanas aumentou em 40% o número de folículos pequenos na emergência da onda. Sabe-se que o número de folículos é um dos principais fatores que influenciam a resposta superovulatória (Singh, Dominguez et al., 2004; Ireland, Ward et al., 2007) e o número de embriões produzidos (Ireland, Ward et al., 2007). Em outro estudo complementar (Gong, Armstrong et al., 2002), foi observado que o efeito do aumento da IMS por 3 semanas, aumentou o número de folículos pequenos e a resposta superovulatória, comparado ao grupo controle.

Bastos, Martins et al., (2007) trabalhando com 14 novilhas cruzadas Simental x Nelore, em crossover, recebendo “Flushing” nutricional por 7 dias antes do protocolo de superestimulação, não observaram diferença na resposta superestimulatória e superovulatória entre os grupos. Entretanto, muitos trabalhos demonstram uma queda na resposta superovulatória com o aumento da IMS. Novilhas *Bos taurus*, apresentaram uma maior resposta superestimulatória no grupo que passou por restrição alimentar, comparado com as alimentadas *ad libitum* ($13,5 \pm 2,4$, vs $9,6 \pm 1,2$; $p < 0,06$; Nolan, O'callaghan et al., 1998). Yaakub, O'callaghan et al., (1999) trabalhando com grande número de animais demonstraram que novilhas alimentadas com concentrado *ad libitum* tiveram uma queda na resposta superovulatória ($12,3 \pm 1,4$ CL) comparadas a novilhas alimentadas com 3 kg de concentrado ($15,5 \pm 1,6$ CL). Entretanto, de modo geral parece um consenso de que

a alta IMS, principalmente por um longo período, parece comprometer a resposta superovulatória (Santos, Cerri *et al.*, 2008).

Aparentemente, a alta concentração circulante de insulina durante um longo período, tem efeitos deletérios na reprodução (Adamiak, Mackie *et al.*, 2005; Velazquez, Newman *et al.*, 2005; Freret, Grimard *et al.*, 2006; Mollo, Rumpf *et al.*, 2007). Novilhas hiperinsulinêmicas apresentam uma menor população folicular (Adamiak, Mackie *et al.*, 2005) e houve uma correlação forte e negativa com a resposta superestimulatória ($r = -0,45$; Mollo, Rumpf *et al.*, 2007), podendo ser este um dos importantes mecanismos que comprometem a resposta superovulatória em vacas.

1.2.3.2 Número de embriões e qualidade embrionária

A maioria dos estudos demonstraram que doadoras de embriões não-lactantes e novilhas em plano de alta ingestão alimentar apresentam um comprometimento da qualidade ovocitária e/ou do embrião (Santos, Cerri *et al.*, 2008; Sartori, Guardieiro *et al.*, 2012). Adamiak, Mackie *et al.*, (2005) demonstraram que o efeito na reprodução do plano nutricional ao qual as doadoras são submetidas depende da condição corporal que elas apresentam ao início do protocolo. Entretanto, alguns trabalhos não mostram influencia da dieta no número de embriões produzidos (Nolan, O'callaghan *et al.*, 1998; Bastos, Martins *et al.*, 2007; Bastos, Ramos *et al.*, 2007; Surjus, Prata *et al.*, 2012a). Nolan, O'callaghan *et al.*, (1998) superovularam novilhas depois de 7 dias de fornecimento da dieta alta e restrita e não observaram diferença no número de estruturas e embriões viáveis. Entretanto, após colocarem os embriões em cultivo por 24 horas, as novilhas que tiveram alta ingestão apresentaram uma menor taxa de blastocisto (44 vs. 78; $P < 0,05$) e um menor número de células embrionárias ($75,3 \pm 2,4$ vs. $98,3 \pm 3,0$, $P < 0,05$), comparadas às novilhas com restrição alimentar.

Mollo, Rumpf *et al.*, (2007) trabalharam com novilhas *Bos indicus* ($n = 38$) submetidas a dois níveis de IMS: Restrito (0,7M) e *ad libitum* (~1,7M). Após 7 semanas na dieta experimental, as novilhas foram superovuladas. As novilhas alimentadas *ad libitum* apresentaram um maior peso (462 ± 10 vs 378 ± 10 kg; $P < 0,05$) e ECC ($4,1 \pm 0,06$ vs $3,0 \pm 0,07$; $P < 0,05$), assim como maior insulina plasmática ($14,3 \pm 1,7$ vs $3,4 \pm 1,7$ $\mu\text{UI/mL}$) comparadas às novilhas sob restrição alimentar. As novilhas sob alta IMS apresentaram um menor número de estruturas

colhidas ($6,7 \pm 0,6$ vs $10,5 \pm 0,8$ ovócitos/embriões; $P < 0,05$) e menor número de embriões viáveis ($3,8 \pm 0,4$ vs $5,7 \pm 0,6$; $P < 0,05$), entretanto a taxa de embriões viáveis foi similar ($65,2 \pm 11,2$ vs. $58,2 \pm 12,0$; $P > 0,10$) comparadas com as restritas.

Dois estudos [Yaakub, O'callaghan *et al.*, (1999); Wrenzycki, De Sousa *et al.*, (2000)] avaliaram o efeito do tipo e quantidade de concentrados, até 100 dias de alimentação, na superovulação e produção de embriões em novilhas de corte. Os tratamentos consistiram de cevada ou polpa cítrica/beterraba, como fonte de suplemento concentrado. Ambos os concentrados foram fornecidos de forma restrita ou *ad libitum*. A resposta superovulatória foi semelhante para as diferentes fontes de concentrado. No entanto, as novilhas que foram oferecidas polpa cítrica/beterraba, apresentaram mais embriões viáveis ($4,8 \pm 0,7$) do que as novilhas alimentadas com cevada ($2,9 \pm 0,5$). Também foi observado que o número de embriões transferíveis ($4,8 \pm 0,7$ vs $2,8 \pm 0,4$; Yaakub, O'callaghan *et al.*, 1999; Wrenzycki, De Sousa *et al.*, 2000) foi maior quando foram oferecidos às novilhas quantidade restrita de concentrado. Além disso, Wrenzycki, De Sousa *et al.*, (2000) demonstraram um aumento significativo no stress celular do embrião (com base em resultados de transcrição de Cu/Zn-SOD) de novilhas alimentadas *ad libitum*. Da mesma forma, Mantovani, Enright *et al.*, (1993) relataram em novilhas *Bos taurus*, que o aumento da ingestão de concentrado a partir de 3 kg *ad libitum* em longo prazo reduziu a resposta superovulatória e produção de embriões de alta qualidade.

Os mecanismos envolvidos no decréscimo da produção embrionária em doadoras superalimentadas são pouco conhecidos, e aparentemente estão relacionados a fatores metabólicos, como excessos de glicose, IGF-1 ou insulina circulantes (Santos, Cerri *et al.*, 2008). Além disso, o efeito da superalimentação ocorre quando a dieta é fornecida por longos períodos, sendo indicativo que as altas concentrações de insulina podem levar a uma resistência a insulina, que implica em uma menor entrada de glicose pelas células, podendo comprometer a qualidade embrionária (Santos, Cerri *et al.*, 2008; Sartori, Guardieiro *et al.*, 2012).

Velazquez, Newman *et al.*, (2005) demonstraram que vacas apresentam uma correlação negativa ($r = -0,33$) entre a concentração circulante de insulina e o número de embriões viáveis. Adamiak, Mackie *et al.*, (2005) avaliaram a correlação entre produção de embriões *in vitro* e concentração de insulina durante oito semanas do fornecimento da dieta. Na primeira semana, a correlação era nula ($r =$

$0,024 \pm 0,02$), entretanto na última semana a correlação era forte e negativa ($r = -0,71 \pm 0,31$), indicando efeito deletério e crônico do nível de insulina por longos períodos. Mulheres diabéticas têm menor concepção e *produção in vitro* de embriões (Valckx, De Pauw *et al.*, 2012). De maneira similar (Kadokawa, Tameoka *et al.*, 2008) demonstraram que novilhas hiperinsulinêmicas superovuladas tiveram menor número de embriões produzidos.

2 FISIOLOGIA OVARIANA E CONCENTRAÇÕES DE HORMÔNIOS ESTERÓIDES EM VACAS NELORE SOB DIFERENTES NÍVEIS NUTRICIONAIS

Resumo

A nutrição está intimamente relacionada com a reprodução nos animais e ainda há muito a se estudar sobre essa inter-relação, principalmente porque ainda há muita controvérsia na literatura sobre este tema. Entretanto, a maioria dos trabalhos mostra resultados negativos da alta ingestão de matéria seca (IMS). Dessa forma, existe a necessidade em se avançar nos estudos comparando a fisiologia reprodutiva e produção de embriões em fêmeas sob diferentes níveis nutricionais. Foram utilizadas 33 vacas Nelores não lactantes recebendo um dos quatro tratamentos a seguir: Os grupos Manutença (M), Restrição (0,7M) e Alta IMS (1,5M) receberam a mesma dieta padrão variando a quantidade oferecida. O grupo Alta ingestão de energia (E), recebeu uma dieta com alto teor de amido, com a mesma energia do grupo 1,5M, porém, com a mesma IMS do grupo M. Todas as vacas passaram por todos os tratamentos, em um modelo crossover. Estes animais tiveram o ciclo estral sincronizado e acompanhamento ovariano diário, por meio de ultrassonografia até confirmação da ovulação. Posteriormente, nos dias 7 e 10 do ciclo estral foi avaliado o volume do corpo lúteo (CL). Concentrações circulantes de hormônios esteróides (progesterona [P4] e estradiol [E2]) foram mensuradas em dias estratégicos. As análises foram realizadas de acordo com o Proc GLIMMIX do SAS, com nível de significância de $P < 0,05$. Os resultados estão apresentados na forma de média dos quadrados mínimos $\pm$ erro padrão. Apesar de, no Experimento 1, terem sido avaliadas 33 vacas nas quatro repetições, totalizando 132 sincronizações, houve apenas 75 ovulações, as quais foram consideradas para as análises subsequentes. A taxa de ovulação não variou entre os tratamentos (~57%). O folículo ovulatório foi maior conforme a IMS aumentou para a dieta padrão nos grupos 1,5M, M, 0,7M ($14,4 \pm 0,3^a$ vs $12,8 \pm 0,3^b$ vs $12,0 \pm 0,3^c$ nos grupos 1,5M, M e 0,7M, respectivamente). Apesar disso, o E2 circulante não diferiu entre os grupos. O volume do CL no Dia 7 do ciclo estral foi semelhante entre os grupos, todavia o grupo 1,5M apresentou menor concentração de P4 circulante ($2,4 \pm 0,2$ ng/mL) em relação aos grupos M e 0,7M ($2,9 \pm 0,2$ vs $3,0 \pm 0,3$ ng/mL, respectivamente). O aumento da IMS afeta a fisiologia ovariana de vacas Nelore, provavelmente por alterar a metabolização hepática de hormônios esteróides, pois conforme aumenta-se a IMS, há uma queda nas concentrações circulantes de hormônios esteróides, apesar do incremento no tamanho das estruturas ovarianas.

Palavras chaves: Estradiol, progesterona, folículo, corpo lúteo, vacas, metabolismo

Abstract

Nutrition is closely related to reproduction and there is still much to learn about this relationship, mainly because there is so much controversy in the literature on this topic. However, most studies show negative results of high dry matter intake (DMI). Thus, there is a need to advance in studies comparing reproductive physiology and embryo production in females under different nutritional levels. A total of 33 non-lactating Nelore cows received one of the following treatments: Groups Maintenance (M), Restriction (0.7M), and High DMI (1.5M) received the same standard diet, but changing the amount offered. The group High intake of energy (E) received a diet with high starch content, and the same energy content as the 1.5M group, however, with the same DMI as Group M. All cows underwent all treatments in a crossover model. These animals has their estrus synchronized and ovarian dynamics was monitored daily by ultrasound until confirmation of ovulation. Subsequently, on days 7 and 10 of the estrous cycle the volume of the corpus luteum (CL) was estimated. Circulating concentrations of steroid hormones (progesterone [P4] and estradiol [E2]) were measured on strategic days. Analyses were performed according to the SAS Proc GLIMMIX, with a significance level of $P < 0.05$. Results are presented as least squares means $\pm$ standard error. Although, in Experiment 1, 33 cows were evaluated in four repetitions, totaling 132 synchronizations, there was only 75 ovulations, which were considered for subsequent analyzes. The ovulation rate did not vary between treatments (~57%). The ovulatory follicle was greater as the DMI standard diet increased to 1.5 M groups, M, 0.7 M (14.4 ± 0.3^a vs 12.8 ± 0.3^b vs 12.0 ± 0.3^c to groups 1.5 M, M and 0.7 M, respectively). Nevertheless, the current E2 did not differ between groups. The volume of the CL on Day 7 of the estrous cycle was greater as the DMI standard diet increased to 1.5 M groups, M, 0.7 M, but the 1.5 M group had lower circulating concentrations of P4 (2.4 ± 0.2 ng/mL) than in groups M and 0.7M (2.9 ± 0.2 vs 3.0 ± 0.3 ng / mL, respectively). Increased DMI alters the ovarian physiology of Nelore cows, probably by altering liver metabolism of steroid hormones, because as DMI increases, there is decrease in concentrations of steroid hormones, despite the increase in the size of ovarian structures.

Keywords: Estradiol, progesterone, metabolism, follicle, corpus luteum, cows, metabolism

2.1 Introdução

A energia é o fator que mais afeta a reprodução de fêmeas bovinas. A ingestão insuficiente de energia está correlacionada a um desempenho reprodutivo insatisfatório, atraso na idade à puberdade, atraso no intervalo da primeira ovulação e cio pós-parto e redução na prenhez em vacas de corte e leiteiras (Santos, Cerri *et al.*, 2004). Novilhas submetidas à restrição alimentar apresentam uma menor taxa de crescimento do folículo dominante (Mackey, Wylie *et al.*, 2000), redução no tamanho do folículo ovulatório até cessar a ovulação (Bossis, Wettemann *et al.*, 1999).

Entretanto, somente no último ciclo estral prévio às novilhas entrarem em anestro, observou-se uma redução na pulsatilidade de LH (Bossis, Wettemann *et al.*, 1999). Restrição alimentar também diminuiu a persistência do folículo dominante, levando a um maior número ondas foliculares durante o ciclo estral em novilhas taurinas (Murphy, Enright *et al.*, 1991), mas não em zebuínas (Sartori e Barros 2011).

Apesar de novilhas alimentadas com 0,7M apresentarem folículos ovulatórios 40% menores do que novilhas alimentadas *ad libitum*, estas apresentaram concentração circulante pré-ovulatória de E2 semelhante (Sartori, Barros 2011). No entanto, Martins, Mollo *et al.* (2007) demonstraram que vacas secas submetidas aos mesmos níveis de IMS do estudo citado acima, apresentaram o mesmo tamanho folicular, entretanto o pico de E2 circulante pré-ovulatório foi mais alto nas vacas sob restrição alimentar. De maneira similar, vacas leiteiras de alta produção apresentaram maior folículo ovulatório, entretanto menor pico pré-ovulatório de E2 comparadas às vacas de menor produção (Lopez, Satter *et al.*, 2004).

O tamanho do folículo ovulatório apresenta alta correlação com o tamanho do CL subsequente (Vasconcelos, Sartori *et al.*, 2001; Sartori, Rosa *et al.*, 2002). Vacas de alta produção de leite apresentaram um maior CL, comparadas às novilhas, entretanto as vacas tiveram menores concentrações de P4 plasmática em relação às novilhas (Sartori, Haughian *et al.*, 2004). De maneira similar, novilhas submetidas à alta IMS apresentaram um maior CL, comparadas a submetidas à baixa IMS, entretanto a concentração de P4 circulante não diferiu entre os grupos (Sartori, Barros 2011).

O possível mecanismo que explica o maior tamanho de estruturas ovarianas, e a menor concentração de hormônios esteróides é o maior metabolismo hepático dos hormônios esteróides, demonstrado por Sangsritavong, Combs *et al.*, (2002). Vacas leiteiras lactantes apresentam um fluxo hepático duas vezes maior do que vacas secas e, conseqüentemente, maior taxa de degradação dos hormônios esteróides, ou seja, as vacas com alta IMS apresentam alto *clearance* de hormônios esteróides, gerando um maior folículo, porém com níveis mais baixos de E2 plasmático (Wiltbank, Lopez *et al.*, 2006).

Da mesma forma, o presente estudo teve como proposta diferenciar os fatores principais relacionados ao metabolismo dos hormônios esteróides e suas conseqüências na função ovariana, ou seja, se o que contribui mais com o alto

metabolismo de P4 e E2 é o elevado consumo de energia, independente da alta IMS ou a associação de ambos.

2.2 Objetivo

Comparar a fisiologia ovariana e concentrações de hormônios esteróides circulantes em vacas ingerindo diferentes quantidades de MS e/ou energia.

2.3 Hipóteses

- Vacas submetidas à restrição de IMS e energia apresentam menores estruturas ovarianas, entretanto maiores concentrações circulantes de E2 e P4, comparadas aos outros grupos (alta IMS ou alta energia), não diferindo da manutenção.
- Dentro do mesmo nível energético, o grupo recebendo uma dieta com alto teor de amido apresenta menores estruturas ovarianas e maiores concentrações de hormônios esteróides, comparado ao grupo com dieta a base de fibra, ou seja, maior kg de matéria seca.

2.4 Material e Métodos

2.4.1 Animais e Local

O experimento foi conduzido na ESALQ-USP, no período de novembro de 2010 a abril de 2011. Foram utilizadas 33 vacas Nelores não lactantes com peso corporal (PC) de $489,5 \pm 11,3$ kg e ECC $3,26 \pm 0,08$ (Escala de 1 a 5; Houghton et al., 1990). Os animais foram distribuídos de acordo com o peso inicial em dois animais por baia (Figura 3), e uma vaca permaneceu em um piquete sem acesso ao pasto. Apesar de terem sido avaliadas 33 vacas nas quatro repetições, totalizando 132 sincronizações, houve apenas 75 ovulações, e somente estas foram consideradas para as análises subsequentes.

2.4.2 Dietas Experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais, sendo eles: Manutenção (M), Restrição alimentar (0,7M), Alta IMS (1,5M) e Alta ingestão de energia (E). O espaçamento de cocho foi de 1,5 m por vaca. Sal mineral foi fornecido na dieta e água à vontade. Os animais receberam a alimentação por meio de ração total fornecida apenas uma vez ao dia. A avaliação do consumo era realizada diariamente pela diferença entre quantidade fornecida e a sobra do dia subsequente.

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

As vacas dos grupos M, 0,7M e 1,5M receberam a mesma dieta (dieta padrão), que variou apenas na quantidade oferecida. O grupo M recebeu uma dieta de manutenção do PC de acordo com o 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. Finalmente, as vacas do grupo E receberam uma dieta com alto teor de amido, com uma quantidade de MS equivalente ao grupo M, porém com níveis energéticos semelhantes aos do grupo 1,5M (Tabela 1). As dietas foram formuladas tanto no grupo 1,5M, quanto no grupo E para que as vacas tivessem um ganho de 0,5 ECC (escala de 1 a 5) em um período

de 80 dias. No grupo 0,7M, a expectativa era de que as vacas perdessem 280 g de PC por dia.

A mensuração da condição corporal era feita a cada 21 dias por um único técnico experiente e a pesagem era realizada toda semana. O ajuste da dieta era realizado semanalmente conforme o PC, de acordo com o tratamento pré-determinado.

Tabela 2 - Porcentagem dos componentes das duas dietas utilizadas no experimento, assim como nutrientes digestíveis totais (NDT) e proteína bruta (PB), a principal diferença seria na relação milho/bagaco de cana *in natura*

Componentes	Padrão (%)	Alto Amido(%)
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
Cálcario calcítico	0,6	0,6
Cloreto de potássio	0,5	0,5
Nutrientes Digestíveis total	57,0	75,0
Proteína Bruta	10,9	11,5

O delineamento do experimento foi realizado em quadrado latino, e levou em consideração o peso inicial dos animais para disposição das vacas nas baias e o esquema foi *cross over*, ou seja, todas as baias (vacas dentro das baias) passavam por todos os tratamentos (Figura 2).

Figura 2 - Esquema representativo do delineamento experimental, mostrando o período das dietas experimentais. Os dias são relacionados ao início do fornecimento das dietas. Legenda: PGF = prostaglandina F₂α, OPU = aspiração folicular (“ovum pick-up”), US = ultrassonografia diária, CS = colheita de sangue

2.4.3 Sincronização do estro e avaliações ultrassonográficas

Nos primeiros dias de fornecimento das dietas experimentais em cada uma das quatro repetições do estudo, as vacas receberam dois tratamentos com PGF₂α com um dia de intervalo (530 µg; i.m., D-cloprostenol, Sincrocio, Ourofino, Cravinhos, Brasil). Um terceiro tratamento com PGF₂α foi realizado 14 dias após a segunda aplicação, com o objetivo de sincronizar o estro das vacas (Figura 2). Ultrassonografia ovariana foi realizada diariamente (probe de 7,5 MHz; Mindray DP 2200 vet, Mindray, China) entre a terceira aplicação de PGF₂α e a ovulação, e 6 dias após a ovulação. Diâmetro e volume folicular e do CL eram avaliados de acordo com Sartori, Haughian *et al.* (2004). A taxa de crescimento folicular (mm/d) foi calculada pela diferença entre o tamanho do folículo um dia antes da ovulação e o tamanho do folículo no dia da terceira PGF₂α, dividido pelo número total de dias. O dia da ovulação foi considerado como dia 1 do ciclo estral. Posterior ao dia 30 de fornecimento das dietas as vacas foram submetidas a aspiração intrafolicular (OPU), e dois dias após a OPU as vacas foram submetidas a um protocolo de superestimulação ovariana (Experimento 2).

2.4.4 Coleta de Sangue e dosagens hormonais

As amostras de sangue foram colhidas em tubos a vácuo com heparina sódica da veia jugular diariamente até a ovulação e 6 após, para avaliação da concentração de P4. As amostras foram centrifugadas a 1700 x g por 15 min e o plasma foi armazenado a -20°C para posterior análise. Para avaliação da concentração de E2, foram utilizadas amostras colhidas entre 2 dias anteriores à ovulação e o dia da ovulação. O maior valor encontrado foi usado para identificar o pico de E2.

A concentração de E2 foi realizada por radioimunoensaio (RIE) de acordo com Kulick, Kot *et al.*, (1999), com pequenas adaptações. Para tanto, o plasma foi extraído duas vezes com éter dietílico. O coeficiente de variação intra-ensaio foi de 9,35% e o coeficiente inter-ensaio, de 12,3%. A concentração de P4 foi avaliada por

meio de RIE com leitura em fase sólida de acordo com o protocolo Coat-A-Count Progesterona (Siemens, Los Angeles CA, USA). O coeficiente de variação intra-ensaio foi de 5,52% e a sensibilidade para o ensaio foi de 0,01 ng/mL. A insulina plasmática foi avaliada no dia 32 posterior ao fornecimento das dietas, e as concentrações foram determinadas por RIE com leitura da fase sólida de acordo com o protocolo Coat-A-Count Insulina (Siemens), sendo o CV intra-ensaio de 4,2%.

2.4.5 Análise estatística

A análise estatística para as variáveis como: consumo de MS, PC inicial e final, dias para ovulação, crescimento folicular, diâmetro do folículo ovulatório, concentração de E2, volume do CL, concentração de P4 e insulina e número de folículos antrais médio foram realizadas sob a metodologia dos modelos lineares generalizados (Nelder, Wedderburn 1972) com o procedimento GLIM do SAS ($P < 0,05$). Consideraram-se os efeitos fixos de período, baia, quadrado latino, sob distribuição normal e função de ligação logarítmica.

2.5 Resultados

Na avaliação da fisiologia ovariana, das 132 observações para o acompanhamento da ovulação, somente ocorreram 76 ovulações. A taxa de ovulação foi semelhante entre os tratamentos (~57%; $P > 0,10$). Das vacas que ovularam 77,3% apresentavam CL no momento da terceira dose de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Em contrapartida, das vacas as que não ovularam, somente 35% apresentavam CL.

Os pesos iniciais e finais estão demonstrados na Tabela 3. As vacas do grupo 1,5 M apresentaram maior ganho de peso em relação ao grupo E, não sendo este o resultado esperado inicialmente (450 g/d, para ambos os tratamentos). O grupo E ganhou um peso abaixo do esperado, e o grupo 1,5M ganhou um peso acima do esperado, dificultando a análise dos dados e o entendimento da comparação entre os grupos e as dietas. Este contratempo prejudicou elucidar um dos questionamentos iniciais do estudo com relação aos principais fatores que influenciam o metabolismo de hormônios esteróides. Independentemente do imprevisto, os resultados são apresentados abaixo. Entretanto, devido a esta discrepância e, principalmente, à grande variação de ganho de peso entre as vacas do grupo E, foi realizada uma análise à parte excluindo este grupo.

Os dados de PC e ECC estão apresentados na Tabela 3, assim como ganho médio diário (GMD) e IMS. A IMS foi maior no grupo 1,5M, assim como o GMD. O grupo E apresentou a mesma IMS que o grupo M, entretanto, inexplicavelmente o ganho de peso foi similar entre os tratamentos.

O grupo 1,5M apresentou maior tamanho do folículo ovulatório comparado com os grupos M e 0,7M, entretanto não diferiu do grupo E. O grupo E apresentou um maior diâmetro folicular que o grupo 0,7M, todavia não diferiu do grupo M. Entretanto, o pico pré-ovulatório de E2 foi similar entre os grupos. O volume do CL no dia 7 do ciclo não diferiu entre os grupos, contudo a P4 plasmática foi menor no grupo 1,5M comparando com o grupo 0,7M, não diferindo dos outros grupos.

Tabela 3 - Análise dos resultados dos quatro grupos experimentais, quanto ao peso inicial e final, ganho médio diário (GMD), ingestão de matéria seca (IMS), dias para a ovulação (DOV), crescimento folicular, folículo ovulatório, estradiol plasmático, volume do CL no dia 7 e progesterona plasmática no dia 7 (P4 D7) do ciclo. Piracicaba - SP

	0,7M (n=19)	M (n=18)	1,5M (n=19)	E (n=18)
Peso inicial (kg)	471 ± 2,44 ^{bc}	481 ± 2,86 ^a	465 ± 2,74 ^c	474 ± 4,11 ^{ab}
Peso final (kg)	457 ± 2,52 ^c	483 ± 2,61 ^{ab}	492 ± 2,85 ^a	480 ± 4,21 ^{ab}
GMD (g/d)	-362 ± 126 ^c	64 ± 126 ^b	657 ± 122 ^a	85 ± 122 ^b
IMS (kg)	5,4 ± 0,2 ^c	7,4 ± 0,2 ^b	10,6 ± 0,2 ^a	7,5 ± 0,2 ^b
Insulina (μUI/mL)	4,7 ± 0,7 ^b	4,5 ± 0,7 ^b	5,7 ± 0,7 ^{ab}	7,5 ± 0,7 ^a
Crescimento Folicular (mm/dia)	1,01 ± 0,1 ^b	1,15 ± 0,1 ^{ab}	1,41 ± 0,1 ^a	1,14 ± 0,1 ^{ab}
Folículo Ovulatório (mm)	12,05 ± 0,3 ^c	12,77 ± 0,3 ^{bc}	14,27 ± 0,3 ^a	13,66 ± 0,3 ^{ab}
Estradiol (pg/ml)	11,04 ± 1,6	8,87 ± 1,5	8,04 ± 1,5	11,04 ± 1,6
Volume do CL D6 (mm ³)	2966 ± 374	3295 ± 387	3524 ± 369	3297 ± 366
P4 do D6 (ng/ml)	2,95 ± 0,2 ^a	2,61 ± 0,3 ^{ab}	2,20 ± 0,3 ^b	2,57 ± 0,3 ^{ab}
Número de Folículos	36,90 ± 2,9	34,76 ± 2,9	38,20 ± 2,9	34,55 ± 2,8

^{abcd} diferem entre si. P < 0,05.

2.5.1 Resultados da dieta padrão

Para todas as análises, consideram-se apenas as vacas que ovularam após a terceira PGF_{2α}. Pesos corporais, inicial e final, são diferentes entre os grupos, porque o esquema realizado foi em crossover (Tabela 4). Vacas alimentadas com alta IMS (grupo 1,5M) apresentaram maior GMD do que as vacas do grupo M e 0,7M. Os animais do grupo 0,7M perderam mais peso que os demais grupos

conforme o esperado (Tabela 4). O GMD apresentou alta correlação com a IMS por baia ($r = 0,67$). A insulina plasmática foi similar entre os grupos, assim como o número de folículos nos ovários. Os grupos apresentaram intervalo semelhante em dias entre a PGF₂ α até a ovulação.

Tabela 4 - Análise dos resultados dos grupos experimentais, quanto ao PC inicial e final, ganho médio diário (GMD), ingestão de matéria seca (IMS), concentração de insulina plasmática, dias para a ovulação (DOV), crescimento folicular, diâmetro do folículo ovulatório, pico pré-ovulatório plasmático de estradiol, volume do CL no dia 7, concentração de progesterona dia 7 (P4 D7) e número de folículos. Piracicaba - SP

Colunas1	0,7M (n=19)	M (n=18)	1,5M (n=19)
Peso inicial (Kg)	471 $\pm$ 2,44 ^{bc}	481 $\pm$ 2,86 ^a	465 $\pm$ 2,74 ^c
Peso Final (Kg)	457 $\pm$ 2,52 ^c	483 $\pm$ 2,61 ^{ab}	492 $\pm$ 2,85 ^a
Ganho médio diário (g/d)	-362 $\pm$ 126 ^c	-64 $\pm$ 126 ^b	657 $\pm$ 122 ^a
Ingestão de matéria seca (Kg)	5,39 $\pm$ 0,2 ^c	7,35 $\pm$ 0,2 ^b	10,63 $\pm$ 0,2 ^a
Insulina	4,61 $\pm$ 0,73	4,54 $\pm$ 0,76	5,40 $\pm$ 0,7
Dias para ovulação (dias)	3,03 $\pm$ 0,2	3,01 $\pm$ 0,2	3,52 $\pm$ 0,2
Crescimento folicular (mm/d)	1,10 $\pm$ 0,1 ^b	1,21 $\pm$ 0,1 ^{ab}	1,44 $\pm$ 0,1 ^a
Folículo ovulatório (mm)	11,96 $\pm$ 0,4 ^c	12,80 $\pm$ 0,3 ^b	14,35 $\pm$ 0,3 ^a
Estradiol (pg/ml)	10,39 $\pm$ 1,4	7,57 $\pm$ 1,2	8,94 $\pm$ 1,3
Volume do CL (mm ³)	2670 $\pm$ 269 ^b	3243 $\pm$ 283 ^{ab}	3811 $\pm$ 254 ^a
P4 do D6 (ng/ml)	3,01 $\pm$ 0,3 ^a	2,91 $\pm$ 0,2 ^a	2,38 $\pm$ 0,2 ^b
Número de folículos	36,03 $\pm$ 3,2	34,87 $\pm$ 3,2	35,64 $\pm$ 3,1

^{a,b,c} Médias seguidas de letras distintas na mesma linha, significam diferença estatística ($p < 0,05$).

O folículo ovulatório foi maior no grupo 1,5M, porém não diferiu entre os grupos 0,7M e M (Figura 3). O folículo ovulatório apresentou alta e positiva correlação com o IMS por baia (Figura 4). Contudo a concentração de E2 foi similar entre os grupos.

Figura 3 - Resultados média calculada $\pm$ EP) do diâmetro do folículo ovulatório e concentração do pico de estradiol no sangue de vacas Nelore não-lactantes submetidas aos três tratamentos em delineamento crossover. O grupo 0,7M (n = 19), grupo M (n= 18) e grupo 1,5M (n = 19)

^{a,b} Médias seguidas de letras distintas, diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Figura 4 - Relação entre diâmetro do folículo ovulatório e ingestão de matéria seca por baía de todos os folículos ovulatórios, independente dos tratamentos

O diâmetro do folículo ovulatório apresentou correlação alta com o volume do CL subsequente ($r = 0,67$). Consequentemente o volume de CL no dia 7 foi maior no grupo 1,5M comparado com os demais grupos (Figura 5). O volume do CL no dia 7 apresentou alta correlação com CMS por baia ($r = 0,52$; Figura 6), entretanto a concentração de P4 foi maior no grupo restrito comparado ao grupo 1,5M (Figura 5).

Figura 5 - Resultados (média calculada $\pm$ EP) do volume de corpo lúteo e concentração de progesterona no sangue seis dias após a ovulação de vacas Nelore não-lactantes submetidas a mesma dieta e três níveis de ingestão de matéria seca. Grupo 0,7M (n = 19), Grupo M (n = 18), Grupo 1,5M (n = 19)

^{a,b}P < 0,05

Figura 6 - Relação entre volume do CL e ingestão de matéria seca por baía, independente do tratamento em vacas Nelore não-lactantes submetidas a dieta padrão, independente do tratamento

2.6 Discussão

Como esperado, as vacas do grupo 1,5M apresentaram maior ganho de peso durante o período experimental que o grupo M. No grupo M, apesar do GMD negativo, este estatisticamente não diferiu de zero. O grupo restrito (0,7M) apresentou perda de peso, alcançando o objetivo proposto.

Posteriormente às análises fisiológicas, foram realizadas OPU e dois dias após esta, as vacas foram superovuladas. De acordo com Sartori, Suárez-Fernández *et al.*, (2003), doadoras de embriões que receberam $\text{PGF}_2\alpha$ após a colheita de embrião apresentaram estro, em média, sete dias após. No presente estudo, esperava-se que a maioria das vacas apresentasse CL responsivo no momento da terceira $\text{PGF}_2\alpha$. A maior parte das vacas que ovularam apresentava CL no dia da terceira aplicação de $\text{PGF}_2\alpha$, entretanto, nos animais que não ovularam mais de 60% não apresentavam CL, podendo ser uma das justificativas que somente 57% dos animais terem ovulado.

A população folicular não sofreu influência do nível de ingestão alimentar corroborando outros trabalhos (Tabela 1). A maioria dos trabalhos que demonstraram um aumento na população folicular devido a alta ingestão alimentar,

foi realizada em vacas *Bos taurus* (Sartori, Guardieiro *et al.*, 2012), e o provável mecanismo é pelo aumento da concentração de insulina e IGF-1, levando a um aumento no número de folículos antrais (Sartori, Guardieiro *et al.*, 2012). Entretanto, no presente estudo a insulina foi similar entre os tratamentos.

A taxa de crescimento folicular foi menor nas vacas submetidas à restrição alimentar (0,7M), comparadas àquelas sob alta IMS (1,5M). Bossis, Wettemann *et al.*, (1999) encontraram menor taxa de crescimento (0,9 mm/d) em novilhas submetidas a restrição alimentar, comparadas às alimentadas com dieta de manutenção (1,4 mm/d) e observaram uma menor frequência de pulsos e amplitude de LH nas novilhas sob restrição. O LH é responsável pelo crescimento final do folículo dominante podendo ser uma das causas de as novilhas sob restrição de MS apresentarem menor diâmetro folicular.

O intervalo entre a luteólise e ovulação foi similar entre os grupos ($P > 0,05$). Sartori, Haughian *et al.*, (2004) relataram que vacas lactantes de alta produção apresentavam maior tempo entre a luteólise e ovulação, comparadas às novilhas. A justificativa para isso foi que vacas de alta produção apresentam maior IMS, que eleva o metabolismo de E2 (Sangsritavong, Combs *et al.*, 2002; Vasconcelos, Sangsritavong *et al.*, 2003), o que leva nestes animais, a um maior tempo para atingir o pico de LH pré-ovulatório e ovulação. Em contrapartida, (Sartori, Barros 2011) relataram que novilhas sob restrição alimentar apresentaram um maior tempo entre a luteólise e ovulação, devido a um menor crescimento folicular. Estas novilhas precisariam também de um maior tempo para a ovulação.

O volume folicular foi 72% maior no grupo 1,5M comparado ao grupo 0,7M, entretanto não houve diferença no pico de E2 circulante. Animais sob restrição de IMS apresentaram folículos ovulatórios menores, tanto em fêmeas de corte (Bossis, Wettemann *et al.*, 1999; Bossis, Wettemann *et al.*, 2000; Mackey, Wylie *et al.*, 2000; Sartori, Barros 2011), quanto em comparação indireta entre vacas lactantes vs novilhas HPB (Sartori, Haughian *et al.*, 2004); e vacas de alta produção apresentaram um maior folículo, que vacas de baixa produção de leite (Lopez, Satter *et al.*, 2004). O E2 plasmático similar entre os grupos corrobora o relato Sartori, Barros (2011), que submeteram as novilhas à mesma dieta alterando o nível de IMS. Novilhas submetidas à dieta *ad libitum* (~1,7M) apresentaram maior folículo ovulatório, entretanto foi observado o mesmo pico de E2 comparadas àquelas sob restrição de IMS (0,7M). Martins, Mollo *et al.*, (2007) trabalhando com vacas Nelores

não lactantes submetidas aos mesmo níveis de IMS do estudo anterior (Sartori, Barros 2011) não encontraram diferença no diâmetro do folículo ovulatório, entretanto o pico pré-ovulatório de E2 circulante do grupo restrito foi 70% mais alto ($17,2 \pm 2,5$, vs $9,8 \pm 1,2$ pg/mL; $P = 0,03$).

A IMS por baia apresentou alta correlação com o tamanho do folículo ovulatório. Sabe-se que a produção de leite apresenta alta correlação com a IMS ($r = 0,88$; Harrison, Beier *et al.*, 1988). Lopez, Satter *et al.*, (2004) encontraram uma correlação alta e positiva ($r = 0,45$) entre tamanho do folículo ovulatório e produção de leite e uma correlação negativa entre produção de leite e concentração de E2 ($r = -0,57$). No presente estudo, não se detectou correlação entre E2 circulante e IMS.

O tamanho do folículo ovulatório apresentou alta correlação ($r = 0,52$) com o volume do CL no dia 7, corroborando os dados de (Vasconcelos, Sartori *et al.*, 2001; Sartori, Rosa *et al.*, 2002). As vacas do grupo 1,5M apresentaram maior volume luteal, que dos demais grupos e foi encontrada uma correlação positiva entre IMS e volume luteal no dia 7. Entretanto, o grupo 1,5M teve menor concentração de P4 plasmática que o grupo 0,7M. Vacas de alta produção de leite apresentaram um maior volume luteal comparadas a novilhas, entretanto tiveram uma menor concentração de P4 sérica (Sartori, Haughian *et al.*, 2004). De maneira similar (Sartori, Barros 2011) descreveram um estudo em que novilhas alimentadas com alta IMS apresentaram maior volume luteal comparadas a novilhas sob baixa IMS, entretanto a P4 circulante não diferiu entre os tratamentos ao longo do ciclo estral.

O aumento da IMS aumenta o fluxo hepático, o catabolismo da P4, assim como sua excreção nas fezes (revisado por Wiltbank, Lopez *et al.*, 2006). Vacas Lactantes apresentam maior fluxo hepático e 2,3 vezes maior metabolismo de P4, comparadas a vacas não lactantes com peso e idade similares (Sangsritavong, Combs *et al.*, 2002). O fluxo hepático foi alterado logo após o fornecimento da dieta. (Vasconcelos, Sangsritavong *et al.*, 2003) demonstraram que a fornecimento da dieta total de uma só vez diminuiu a concentração de P4 sérica e aumentou a concentração de LH circulante comparadas às vacas não alimentadas.

2.7 Conclusão

O metabolismo dos hormônios esteróides influencia a fisiologia ovariana e concentrações hormonais, alterando o tamanho do folículo e mantendo a mesma concentração de E2. Além disso, apesar de desenvolverem um CL maior, vacas com

alta IMS apresentam P4 circulante mais baixa, corroborando estudos que demonstraram a influência da alta IMS na reprodução (Figura 7).

Figura 7 - Modelo hipotético da influência do nível de ingestão alimentar sobre o diâmetro de folículo ovulatório e pico pré-ovulatório de estradiol plasmático e volume luteal e concentração plasmática de progesterona no dia 6 após a ovulação em fêmeas bovinas

3 PRODUÇÃO *IN VIVO* DE EMBRIÕES DE VACAS NELORE SUBMETIDAS A DIFERENTES NÍVEIS NUTRICIONAIS

Resumo

Objetivou-se avaliar a influência da alta ou baixa ingestão de matéria seca (IMS) e/ou energia sobre a qualidade e quantidade de embriões produzidos *in vivo*. Vacas Nelores não lactantes ($n = 32$, 4 a 10 anos de idade), pesando $489,6 \pm 11,3$ kg e com um ECC de 3,25 (1 a 5) foram utilizadas. Após 15 dias, sob uma dieta de adaptação, as vacas foram divididas em baias de acordo com o peso corporal (PC) inicial e aleatorizadas em quatro grupos experimentais. O grupo de manutenção (M) recebeu dieta para fornecer 1,2% de MS por kg de PC. O grupo de restrição (0,7M) recebeu o equivalente a 70% da dieta do grupo M (0,84% kg de MS por kg de PC). O grupo de alta IMS (1,5M) recebeu o equivalente a 150% do grupo M (1,8% de MS por kg de PC). Os três grupos anteriores receberam a mesma dieta padrão, alterando somente o nível de ingestão. O grupo energia (E) recebeu uma dieta com a MS semelhante ao grupo M, no entanto, com um nível de energia igual ao grupo 1,5M. Todos os animais foram submetidos à aspiração de todos os folículos. Os ovócitos recuperados foram usados em outro experimento. As doadoras de embriões receberam um dispositivo intravaginal (DIV) de liberação lenta de progesterona (Sincrogest[®], Ourofino, Ribeirão Preto, Brasil), logo após a OPU. Dois dias após a OPU, as vacas receberam oito doses decrescentes de FSH (100 mg, im, Folltropin-V[®], Bioniche, Ontário, Canadá), e concomitante com o quinto e sexto tratamento de FSH, PGF₂ α (500 mg cada, i.m., cloprostenol, Sincrocio[®], Ourofino) foi administrada. O DIV foi removido no momento da última injeção de FSH. Doze horas após remoção do DIV, a ovulação foi induzida com GnRH (0,01 mg, im, acetato de buserelina, Sincroforte[®], Ourofino). Doze e 24 horas após o GnRH, as vacas foram inseminadas. As colheitas de embriões foram realizadas 7 ou 8 dias após a indução da ovulação. As vacas receberam todas as dietas em um delineamento de quadrado latino e em esquema de *crossover* com quatro sessões de colheita de embriões e 42 dias de intervalo entre elas. Os dados foram analisados pelo PROC GLIMMIX do SAS e os resultados foram apresentados como média dos quadrados mínimos $\pm$ EP. Houve maior resposta superovulatória nas doadoras que receberam a dieta padrão, 0,7M ($13,0 \pm 1,3^a$); M ($14,2 \pm 1,2^a$); 1,5M ($13,9 \pm 1,2^a$) comparado à de alta energia ($9,7 \pm 1,2^b$). Também houve uma correlação negativa entre resposta superovulatória e insulina ($r = -0,32$). Apesar das respostas mais baixas observadas principalmente no grupo E, não houve diferença entre os grupos para o total de embriões/ovócitos (~6 estruturas), embriões viáveis (~3 embriões) e congeláveis (~2,7 embriões). A insulina circulante ao início da superovulação apresentou correlação negativa com o número de embriões viáveis ($r = -0,22$); a concepção aos 23 e 53 dias após a transferência dos embriões não diferiu entre os tratamentos, mas a insulina circulante apresentou correlação negativa com a taxa de concepção aos 60 dias de gestação em receptoras sincronizadas ($r = -0,16$). Em conclusão, houve um efeito muito discreto de dieta na resposta superovulatória e qualidade embrionária das vacas. Independente de tratamento, alta insulina circulante das doadoras foi associada a menor resposta superovulatória, número de embriões viáveis e prenhez das receptoras aos 60 dias de gestação.

Palavras-chave: Embriões; Taxa de concepção; Insulina

Abstract

The Nutrition is closely related to reproduction and there is still much to learn about this relationship, mainly because there is so much controversy in the literature on this topic. For example, some studies propose beneficial use of nutritional "flushing" on embryo production in ruminants. However, most studies show negative results of high dry matter intake (DMI). Thus, there is a need to advance in studies comparing reproductive physiology and embryo production in females under different nutritional levels. A total of 33 non-lactating Nelore cows received one of the following treatments: Groups maintenance (M), Restriction (0.7M) and High DMI (1.5M) received the same standard diet with variations in the amount offered. The group High intake of energy (E) received a diet with high starch content, but the same amount of energy as group 1.5M, however, with the same DMI as Group M. All cows underwent all treatments in a crossover model. The cows underwent intrafollicular aspiration (OPU) 30 days after start diet, and two days after OPU, the cows ovaries were supererstimulated. The superovulatory response and embryo quality was compared among groups, as well as pregnancy rate of 273 recipients after receiving fixed-time transfer of vitrified embryos. Analyses were performed according to the Proc GLIMMIX of SAS, with a significance level of $P < 0.05$. Results are presented as least squares means $\pm$ standard error. Plasma insulin concentration was higher in the E group ($8.7 \pm 0.86 \mu\text{IU/mL}$) compared with groups 0.7 M (4.6 ± 0.87) and M (5.3 ± 0.85) not differing from group 1.5M (6.6 ± 0.9). There was a higher superovulatory response (CL) in donors receiving the standard diet [0.7M (13.0 ± 1.3), M (14.2 ± 1.2) and 1.5M (13.9 ± 1.2)] compared with those fed high energy (9.7 ± 1.2 CL) due to the negative correlation between superovulatory response and circulating insulin ($r = -0.32$). Nevertheless, there was no difference between groups for the total number of oocytes/embryos collected (~ 6 structures), viable embryos (~ 3 embryos), or freezable (~ 2.7 embryos). Regardless of treatment, circulating insulin at the beginning of superovulation, was negatively correlated with the number of viable embryos ($r = -0.22$). Pregnancies at 23 and 53 days after embryo transfer did not differ between treatments, however, circulating insulin of the donor cows had a negative correlation with pregnancy of recipients at 60 days of gestation ($r = -0.16$). In conclusion, different levels of DMI changed the size of ovarian structures and/or the concentrations of circulating steroid hormones. Nevertheless, there was a very minor effect of diet on superovulatory response and embryo quality in cows. Regardless of treatment, high circulating insulin of the donors was associated with lower superovulatory response, lower number of viable embryos and less pregnancies of recipients at 60 days of gestation.

Keywords: Embyo transfer; Nutrition; Insulin

3.1 Introdução

O Brasil é o maior produtor mundial de embriões bovinos (Viana e Camargo, 2007), sendo uma parte dos embriões produzidos advindos de superovulação (SOV). Entretanto, há uma grande variabilidade da técnica (Keller e Teepker, 1990),

sendo o maior entrave para implantação desta de maneira eficiente. Há relatos que mais de 20% das vacas não produzem embriões viáveis (Looney, 1986). Há vários fatores que levam a essa grande variação, como o número de aplicações de FSH, o lote de FSH utilizado, a relação FSH/LH do produto, assim como fatores relacionados à doadora (número de folículos, condição corporal e manejo nutricional) (Mapletoft, Steward *et al.*, 2002). Além disso, o manejo nutricional e o tipo de concentrado também têm influência na resposta superovulatória e número de embriões produzidos (Yaakub, O'callaghan *et al.*, 1999). Comumente, doadoras de embriões são sobrealimentadas e apresentam sobrepeso, submetidas a um manejo nutricional inadequado que pode levar a uma queda nos resultados, assim como um decréscimo na produção embrionária (Santos, Cerri *et al.*, 2008).

A população folicular no começo do tratamento com FSH é o principal fator que afeta a resposta superovulatória e apresenta alta e positiva correlação com esta, (Gong, Armstrong *et al.*, 2002; Singh, Dominguez *et al.*, 2004; Ireland, Ward *et al.*, 2007) e com o total de embriões produzidos (Ireland, Ward *et al.*, 2007). O “Flushing” nutricional aumenta a população folicular aparentemente através do IGF-1 (Gutierrez, Oldham *et al.*, 1997; Gong, Armstrong *et al.*, 2002) e a insulina, a qual aumenta a sensibilidade das células da granulosa ao FSH (Davoren e Hsueh, 1984). Entretanto, o alto nível de insulina compromete a população folicular em vacas (Adamiak, Mackie *et al.*, 2005), a resposta superovulatória (Mollo, Rumpf *et al.*, 2007) e número de embriões produzidos (Adamiak, Mackie *et al.*, 2005; Velazquez, Newman *et al.*, 2005).

Resultados sobre níveis energéticos ou IMS na resposta superovulatória são controversos. Apesar de alguns pesquisadores apresentarem efeitos positivos sobre a IMS na resposta superovulatória (Gong, Armstrong *et al.*, 2002), a maioria demonstra efeitos negativos (Nolan, O'callaghan *et al.*, 1998; Yaakub, O'callaghan *et al.*, 1999; Wrenzycki, De Sousa *et al.*, 2000; Siddiqui, M. A., Shamsuddin, M. *et al.*, 2002; Mollo, Rumpf *et al.*, 2007). Altos níveis energéticos comprometem a produção embrionária *in vivo* e *in vitro* e alteram a expressão de genes importantes (Dunne, Diskin *et al.*, 1999; Wrenzycki, De Sousa *et al.*, 2000). O mecanismo pelo qual a nutrição altera a reprodução não está completamente elucidado (Yaakub, O'callaghan *et al.*, 1999). Portanto, há a necessidade de se elucidar os fatores relacionados à alta IMS que afetam a reprodução, e melhor compreender a

influência da insulina circulante nos aspectos relacionados à produção e transferência de embriões.

3.2 Objetivo

Avaliar o efeito de diferentes níveis de IMS/energia na produção de embriões *in vivo* de vacas superovuladas, a qualidade embrionária e a taxa de concepção após vitrificação/desvitrificação e transferência para receptoras sincronizadas.

3.3 Hipóteses

- Vacas alimentadas com restrição e/ou manutenção têm mais embriões viáveis comparado com os grupos 1,5M e E.
- Vacas do grupo E terão uma menor resposta superovulatória e menor taxa de prenhez comparados com os demais tratamentos.
- A insulina tem uma correlação negativa com as variáveis resposta superovulatória, número de embriões viáveis e taxa de concepção aos 30 e 60 dias.

3.4 Material e Métodos

3.4.1 Animais e Local

O experimento foi conduzido na ESALQ-USP, no período de novembro de 2010 a abril de 2011. Foram utilizadas os mesmos animais do experimento 1, 33 vacas Nelores não lactantes com PC de $489,5 \pm 11,3$ kg e escore de condição corporal $3,26 \pm 0,08$ (Escala de 1 a 5; Houghton et al., 1990).

3.4.2 Dietas Experimentais

As dietas experimentais foram semelhantes ao experimento 1. O protocolo de superestimulação iniciou 32 dias após o início da dieta, ou dois dias da aspiração folicular (Figura 8).

3.4.3 Protocolo de superestimulação ovariana

Trinta dias após o início do fornecimento das dietas experimentais, todas as vacas tiveram todos os folículos aspirados (OPU), sendo sincronizada a emergência da onda e, em seguida, inseriu-se um dispositivo intravaginal de P4 (DIV, Sincrogest[®], Ourofino). Esta foi a técnica de escolha devido a um possível metabolismo diferente entre animais submetidos a níveis energéticos distintos, onde a utilização do benzoato de estradiol como agente sincronizador de emergência de onda poderia ser um fator de confundimento (REF?). Em seguida, as vacas foram superovuladas com FSH seguindo o protocolo descrito na Figura 8. As vacas começaram a receber pFSH dois dias após a OPU. Cada vaca recebeu oito injeções de pFSH, i.m. a cada 12 horas em doses decrescentes, utilizando uma dose total de 100 mg de FSHp (i.m., Folltropin, Bioniche Animal Health, Canadá) e 530 µg de PGF₂α em duas vezes (i.m., 530 µg de cloprostenol, Sincrocio[®], Ourofino), simultâneas à quinta e sexta aplicações de FSH. Doze horas após a última aplicação de FSH, a ovulação foi induzida com 0,05 mg de GnRH (0.01 mg, i.m., Buserelin acetate, Sincroforte[®], Ourofino). Doze e 24 horas após a aplicação de GnRH as fêmeas foram inseminadas artificialmente com sêmen descongelado. Foi utilizado sêmen de fertilidade comprovada de oito touros. Os touros foram distribuídos na mesma baia por quatro réplicas (“graeco square design”) e os embriões foram colhidos 7 ou 8 dias após a administração de GnRH. Após a colheita dos embriões, as vacas foram tratadas com 530 µg de PGF₂α e imediatamente passaram a receber uma nova dieta experimental baseada no sistema *crossover*. Outro tratamento com PGF₂α foi realizado no dia seguinte.

Figura 8 - Esquema representativo do delineamento experimental, mostrando o período das dietas experimentais, o protocolo de superestimulação ovariana e os exames ultrassonográficos (US). Legenda: D0 = dia do início do fornecimento das dietas; D30 = dia da aspiração intra-folicular e inserção do dispositivo intra-vaginal (DIV) de P4; D32 = início do protocolo de superestimulação; P4 = dispositivo intravaginal de progesterona; P4 remoção do DIV, FSH = hormônio folículo estimulante; PGF = prostaglandina F2 α , GnRH = hormônio liberador de gonadotrofinas; IA = inseminação artificial; OPU = aspiração folicular (“ovum pick-up”), D42 colheita embrionária e final do período da dieta experimental

3.4.4 Exames ultrassonográficos

Durante o período de SOV, foram realizadas avaliações ultrassonográficas transretais (transdutor linear de 7,5 MHz, Mindray DP 2200 vet, Mindray, China). Durante três dias antes da OPU e foi estabelecida a média do número de folículos antes da OPU. No dia 2 após a OPU, concomitante com a primeira dose de FSH, todos os folículos ≥ 3 mm foram contados. Foi realizada a proporção de folículos depois da OPU sobre a média de folículos antes da OPU, para analisar se a OPU comprometeu a quantidade de folículos antrais. Resposta superestimulatória era estimada pela contagem de todos os folículos ≥ 6 mm, no último dia da aplicação do FSH. Este tamanho ≥ 6 mm foi escolhido para os folículos potencialmente ovulatórios, pois o desvio ocorre em folículos com o diâmetro variando de 5,3 a 7 mm em *Bos indicus* e se torna dominante (Sartori e Barros 2011). Os folículos anovulatórios foram classificados como todos os folículos ≥ 6 mm, 48 h após o tratamento com GnRH. A resposta superovulatória foi estimada pela diferença entre os folículos ≥ 6 mm no último dia do FSH e folículos anovulatórios, e foram

confirmados pela contagem do número de CL no dia da colheita embrionária. A taxa de recuperação foi definida pela relação do número total de estruturas dividido pela resposta superovulatória.

3.4.5 Colheita e avaliação embrionária

Embriões foram colhidos por dupla lavagem do útero conforme a técnica descrita por (Castro Neto, Sanches *et al.*, 2005) e classificados segundo o grau de desenvolvimento e qualidade (1 = excelente; 2 = bom; 3 = regular; 4 = pobre; 5 = degenerado) de acordo com (Ahmad, Schrick *et al.*, 1995; Sartori, Sartor-Bergfelt *et al.*, 2002). Embriões graus 1, 2 e 3 foram classificados como embriões viáveis. Embriões grau 1 e 2 foram classificados como embriões congeláveis e estes embriões foram vitrificados para posterior transferência em tempo fixo em receptoras sincronizadas.

3.4.6 Vitrificação dos Embriões

A vitrificação dos embriões foi baseada na técnica Cryotop descrita previamente por Kuwayama, Vajta *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 20 segundos.

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 minutos cada) em gradientes de 0,3 e 0,15 M de sacarose, respectivamente, antes de passarem para o meio de manutenção TCM-Hepes (Mezzalana et al., 2004).

3.4.7 Transferência dos embriões

Os embriões foram transferidos para 273 receptoras na Fazenda experimental Figueira- Londrina-PR. As receptoras foram sincronizadas no Dia 0 (D0), onde receberam um dispositivo de liberação de P4 e 2 mg de BE (i.m. Ciclover;); no Dia 8 (D8) o dispositivo foi removido e foram aplicados PGF₂α (i.m., 530 µg cloprostenol, Sincrocio®, Ouro Fino) e 0,5 mg de ECP (i.m. ECP®, Pfizer Saúde animal) e 300 UI de eCG (i.m.; SincroeCG®; Ouro Fino) no dia 16 ou 17 os embriões foram inovulados, no lado ipsilateral ao CL. Após a desvitrificação dos embriões estes foram avaliados como aptos ou não. Os embriões foram transferidos por dois técnicos experientes. No dia da inovulação todas as receptoras foram avaliadas para a presença de CL. Deste modo, as receptoras que não tinham CL não receberam embriões.

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. A perda embrionária/fetal foi realizada pela diferença entre o diagnóstico de 53 dias após a inovulação e o diagnóstico de 23 dias.

Figura 9 - 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 ($\text{PGF}_{2\alpha}$) e 300 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG). D16 e 17: inovulação dos embriões

3.4.8 Análise estatística

O delineamento proposto foi quadrado latino, e conforme descrito acima, foram realizados quatro períodos experimentais, de forma que todas as fêmeas passaram por todos os tratamentos (*crossover*). Cada vaca foi acasalada com o mesmo touro nos diferentes períodos. De acordo com o delineamento proposto, a unidade experimental foi a baia composta de duas vacas para o consumo de MS.

O procedimento GLIMMIX (ANOVA) do SAS foi usado com a metodologia de modelos lineares generalizados. Para variáveis de contagens, usou-se distribuição de Poisson, e para distribuição binomial, a função Logit Link foi empregada.

As variáveis de contagem como: número de folículos ≥ 3 mm na emergência da onda, número de folículos ≥ 6 mm no final do protocolo de superestimulação, números de folículos não ovulados 48 horas depois do GnRH, número de CL, número total de ovócitos/embriões, embriões viáveis, degenerados e não fecundados foram analisados usando um modelo matemático que incluiu a baia, as dietas e a réplica. Para análises como qualidade embrionária, touro entrou no modelo.

Todas as comparações estatísticas foram feitas usando médias ajustadas dos quadrados mínimos e os resultados foram apresentados em médias dos quadrados mínimos $\pm$ erro padrão.

As medidas repetidas de concentrações hormonais foram modeladas com a matriz de correlação de melhor ajuste, utilizando o procedimento MIXED do SAS. Usou-se o proc REG do SAS para realizar as regressões tais como as associações da insulina circulante com variáveis reprodutivas.

3.5 Resultados

3.5.1 Peso corporal, ECC, IMS

Foram avaliados os índices corporais de 33 vacas nas quatro repetições do experimento totalizando 132 observações. O PC inicial, e ECC inicial foram diferentes, pois o esquema experimental foi *crossover*, ou seja, as vacas foram alocadas em uma dieta diferente tendo passado por um tratamento prévio. As vacas do grupo 1,5M apresentaram um maior GMD e alteração do ECC que as vacas do grupo E, não sendo o resultado esperado, apesar deste grupo ter apresentado insulina mais alta e consumo de MS esperado pelo delineamento. As vacas do grupo E apresentaram uma tendência para um maior GMD e tiveram um maior ganho de ECC em relação ao grupo M, o grupo 0,7M perdeu mais peso e ECC que os demais grupos. O consumo de MS foi maior no grupo 1,5M que nos demais tratamentos. Como esperado, as vacas dos grupos E e M apresentaram IMS similar e foram maiores que o grupo 0,7M. A insulina plasmática foi maior no grupo E que nos demais tratamentos, possivelmente devido a alta proporção de milho/amido da dieta. Os demais tratamentos apresentaram concentrações de insulina plasmática similares (Tabela 5).

Tabela 5 - Índices corporais de 33 vacas Nelore não-lactantes em 4 réplicas experimentais, observados durante o experimento recebendo uma das quatro dietas: restrição (0,7M), manutenção (M), alta ingestão (1,5M) e alta energia (E) durante períodos de 42 dias em design *cross over*. GMD, ganho médio diário; ECC, escore de condição corporal; IMS, ingestão de matéria seca. Piracicaba- SP

	0,7M	M	1,5M	E
Peso inicial (Kg)	501 ± 4,1 ^a	498 ± 4,5 ^a	489,4 ± 4,3 ^b	492 ± 4,4 ^b
Peso Final (Kg)	484 ± 3,9 ^c	499 ± 4,1 ^b	515 ± 4,2 ^a	499 ± 4,0 ^b
GMD (g/d)	-404 ± 61 ^c	25 ± 60 ^{bB}	614 ± 60 ^a	180 ± 70 ^{bA}
ECC inicial	3,54 ± 0,1	3,46 ± 0,1	3,31 ± 0,1	3,38 ± 0,1
ECC final	3,29 ± 0,05 ^c	3,45 ± 0,05 ^b	3,64 ± 0,05 ^a	3,51 ± 0,05 ^b
Alteração do ECC	-0,26 ± 0,04 ^d	-0,01 ± 0,04 ^c	0,33 ± 0,04 ^a	0,125 ± 0,04 ^b
IMS (Kg)	5,57 ± 0,27 ^c	8,11 ± 0,28 ^b	11,56 ± 0,27 ^a	7,71 ± 0,26 ^b
Insulina	4,65 ± 0,87 ^b	5,33 ± 0,85 ^b	6,61 ± 0,87 ^B	8,74 ± 0,86 ^{aA}

^{a,b,c,d} Diferem entre si em nível de $P < 0,05$. ^{A,B} Diferem entre si em nível de $P < 0,10$

3.5.2 População folicular, resposta superestimulatória e superovulatória

A população folicular antes da OPU não diferiu entre os tratamentos (Tabela 6). O grupo E apresentou maior número de folículos 2 dias após a OPU comparado aos grupos 0,7M e M, entretanto não diferiu do 1,5M ($P > 0,05$). A aspiração intrafolicular prejudicou a população folicular em todos os tratamentos. O número de folículos ≥ 3 mm 2 dias após a OPU (primeiro dia de FSH) foi somente ~42% da população folicular prévia à OPU, e não diferiu entre as dietas, entretanto apresentou uma correlação com a concentração de insulina ($r = 30,0$), ou seja quanto maior a insulina maior foi a população de folículos antrais no dia do primeiro tratamento com FSH (Tabela 6).

Tabela 6 – Média dos quadrados mínimos $\pm$ erro padrão em relação às variáveis de população folicular antes e depois da OPU, resposta superestimulatória e superovulatória entre as dietas 0,7M, M, 1,5M e grupo energia em vacas Nelore não lactantes

	0,7M	M	1,5M	E
População folicular antes da OPU	40,08 $\pm$ 9,4	36,09 $\pm$ 9,3	39,22 $\pm$ 9,4	36,83 $\pm$ 9,3
População folicular dois d após a OPU	12,86 $\pm$ 1,1 ^b	12,79 $\pm$ 1,1 ^b	13,34 $\pm$ 1,1 ^{ab}	14,31 $\pm$ 1,2 ^a
Relação número de folículos depois sobre antes da OPU (%)	42,5 $\pm$ 4,8	40,66 $\pm$ 4,1	47,36 $\pm$ 4,1	45,16 $\pm$ 4,8
Diferença entre primeiro e último FSH	2,36 $\pm$ 1,4 ^a	5,8 $\pm$ 1,4 ^a	2,78 $\pm$ 1,4 ^a	-1,85 $\pm$ 1,4 ^b
Resposta Superestimulatória	15,78 $\pm$ 1,4 ^a	17,96 $\pm$ 1,4 ^a	16,65 $\pm$ 1,4 ^a	12,13 $\pm$ 1,4 ^b
Folículos anovulatórios	2,82 $\pm$ 0,6	3,74 $\pm$ 0,6	2,74 $\pm$ 0,6	2,44 $\pm$ 0,6
Resposta Superovulatória	12,96 $\pm$ 1,3 ^a	14,22 $\pm$ 1,2 ^a	13,91 $\pm$ 1,2 ^a	9,68 $\pm$ 1,2 ^b

A resposta superestimulatória (número de folículos $\geq$ 6 mm no último FSH) e superovulatória foram menores no grupo E comparado aos demais tratamentos (Tabela 6 e Figura 10). A insulina plasmática no primeiro dia do FSH apresentou uma correlação negativa com a resposta superestimulatória ($r = -0,28$) e superovulatória ($r = -0,32$; Figura 10).

Figura 10 – Resultados da população folicular $\geq$ 3mm (n folículos FSH) no primeiro dia de FSH, resposta superestimulatória (último FSH) e resposta

superovulatória (número de folículos ovulados), entre o grupo 0,7M (n = 33); grupo M (n = 33); grupo 1,5M (n = 33) e grupo E (n = 33).

* diferem em $P < 0,05$

3.5.3 Resultados da produção e qualidade embrionária

Apesar da diferença na resposta superovulatória (Figura 10), não houve diferença entre os tratamentos no número de ovócitos/embrião (Tabela 7), número de embriões: fecundados, viáveis ou congeláveis, assim como nas taxa de embriões viáveis e congeláveis. Os tratamentos M e 1,5M apresentaram um maior número de embriões degenerados (Tabela 7).

Tabela 7 - total de estruturas, de embriões fecundados, viáveis congeláveis, assim como a taxa de embriões viáveis, congeláveis e taxa de recuperação de 33 vacas Nelore não lactantes em quatro réplicas experimentais, observados durante o experimento recebendo uma das quatro dietas: restrição (0,7M), manutenção (M), alta ingestão (1,5M) e alta energia (E) durante períodos de 42 dias em design *crossover*

	0,7M	M	1,5M	E
Taxa de recuperação (%)	43,9 ± 5,3	48,6 ± 5,8	50,3 ± 5,5	56,4 ± 5,6
Total de ovócito/embrião (n)	6,0 ± 0,8	6,4 ± 0,8	6,3 ± 0,8	5,3 ± 0,8
Não fecundados (n)	1,8 ± 0,4	0,8 ± 0,4	0,7 ± 0,4	1,4 ± 0,4
Embriões (n)	4,1 ± 0,6	5,5 ± 0,6	5,5 ± 0,6	3,92 ± 0,6
Taxa de embriões (%)	74,4 ± 5,9	87,4 ± 5,6	89,2 ± 5,7	81,1 ± 5,8
Embriões degenerados (n)	1,0 ± 0,3 ^a	2,1 ± 0,4 ^b	1,9 ± 0,4 ^b	0,9 ± 0,3 ^a
Embriões viáveis (n)	3,2 ± 0,5	3,3 ± 0,5	3,5 ± 0,5	3,0 ± 0,5
Taxa de embriões viáveis (%)	53,0 ± 6,7	51,9 ± 6,5	53,3 ± 6,5	59,81 ± 6,6
Embriões grau III (n)	0,5 ± 0,2	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,2	0,4 ± 0,1
Embriões congeláveis (n)	2,7 ± 0,5	2,7 ± 0,5	2,9 ± 0,5	2,6 ± 0,5
Taxa de embriões congeláveis (%)	43,7 ± 7,0	43,3 ± 6,8	45,9 ± 6,9	52,4 ± 7,0

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

A concentração plasmática de insulina foi correlacionada negativamente com o número de embriões viáveis ($r = -0,22$) e congeláveis ($r = -0,19$), possivelmente por afetar a resposta superovulatória, pois não houve correlação com a taxa de embriões viáveis ou congeláveis.

Figura 11 – Associação entre número de embriões viáveis e concentração de insulina plasmática no primeiro dia de tratamento com FSH, os resultados são mostrados independente do tratamento, de 132 coletas de embriões em 4 réplicas em esquema crossover

3.5.4 Resultados de concepção e perda embrionária entre as dietas

A concepção aos 30 e 60 dias de gestação foi similar entre os grupos, assim como a perda embrionária (Figura 12). Detectou-se uma correlação negativa entre a concepção aos 53 dias pós inovulação e a concentração plasmática de insulina das doadoras ao início da SOV ($r = -0,16$).

Figura 12 - Média dos quadrados mínimos $\pm$ EP da concepção aos 23 e 53 dias após a inovulação embrionária após desvitrificação e da perda embrionária e fetal entre os dias 23 e 53 dias pós inovulação de 273 receptoras sincronizadas

A concepção variou de acordo com o grau de desenvolvimento embrionário. Conforme o estágio foi avançando, houve um incremento na concepção aos 30 e 60 dias de gestação. O blastocisto e blastocisto expandido apresentaram maior taxa de concepção aos 30 e aos 60 dias comparados a mórula e blastocisto inicial (Figura 12). A perda embrionária não diferiu entre os tratamentos.

Figura 13 – Taxa de concepção aos 23 e 53 dias após a transferência dos embriões após desvitrificação e a perda embrionária/fetal de acordo com o grau de desenvolvimento embrionário, independente das dietas às quais foram submetidas, em 273 receptoras previamente sincronizadas

3.6 Discussão

O grupo E apresentou maior concentração de insulina que os demais grupos alimentados com uma dieta de alto volumoso, e a insulina entre estes grupos não diferiram. De acordo com o produto de fermentação dos carboidratos no rúmen, a liberação de insulina muda e as dietas com maior teor de amido favorecem a produção de propionato, e consequentemente a produção de insulina. As dietas de alto volumoso com maior produção de acetato não afetam a liberação de insulina, podendo ser a provável causa da concentração de insulina ser semelhante entre os três grupos alimentados com a dieta padrão.

3.6.1 Discussão da população folicular; respostas superestimulatória e superovulatória

A população folicular antes da OPU foi similar entre os grupos, corroborando muitos trabalhos que não observaram diferença do nível de IMS/energia na população folicular. De acordo com Sartori e Guardiero *et al.*, (2012) o provável

mecanismo para o aumento da população folicular é o aumento da concentração de insulina e IGF-1 plasmático, entretanto aparentemente fêmeas *Bos indicus*, são menos sensíveis à alteração das dietas.

O número de folículos, no momento do primeiro FSH foi maior no grupo E comparado com os grupos M e 0,7M, entretanto a população de folículos antrais foi prejudicada em todos os grupos, devido à aspiração intra-folicular, sendo que no momento da aplicação de FSH, as doadoras somente apresentavam 42% da população folicular antes da OPU. Contrariando esses dados, Viana, Palhao *et al.*, (2010) relataram que em vacas *Bos indicus*, a população de folículos antrais retornou aos números prévios com dois dias após a OPU, e (Boni, Roelofsen *et al.*, 1997) em *Bos taurus* reportaram que o número de folículos ≥ 3 mm somente retornou com três dias após a OPU. (Gibbons, Wiltbank *et al.*, 1999) demonstraram que o número de folículos antrais após a OPU aumenta gradualmente, seguindo uma hierarquia de folículos terciários. Em um estudo recente realizado em nosso laboratório iniciou-se a superestimulação 1 ou 2 dias após a OPU (Surjus, Prata *et al.*, 2013). Neste estudo, o número de folículos ≥ 3 mm 1 dia após a OPU foi de apenas 23%, no segundo dia o número de folículos aumentou para 40,8%. O número de folículos no momento que se inicia um protocolo de superestimulação é o principal fator que afeta a resposta superovulatória (Singh, Dominguez *et al.*, 2004; Ireland, Ward *et al.*, 2007; Surjus, Prata *et al.*, 2013) e o número de embriões produzidos (Ireland, Ward *et al.*, 2007; Surjus, Prata *et al.*, 2013). A resposta superovulatória ficou muito abaixo dos relatos encontrado em *Bos indicus* (Barros e Nogueira, 2001; Baruselli, De Sá Filho *et al.*, 2006; Nogueira, Fragnito *et al.*, 2007; Mattos, Bastos *et al.*, 2011), comprometendo o número de embriões viáveis e transferidos durante o experimento.

As doadoras do grupo E apresentaram menores respostas superestimulatória e superovulatória que as das demais dietas. Outros estudos demonstram uma queda na resposta superovulatória com o aumento da IMS (Nolan, O'callaghan *et al.*, 1998; Yaakub, O'callaghan *et al.*, 1999; Wrenzycki, De Sousa *et al.*, 2000; Siddiqui, M., Shamsuddin, M. *et al.*, 2002; Lozano, Lonergan *et al.*, 2003; Mollo, Rumpf *et al.*, 2007). Entretanto, neste estudo o aumento da IMS dentro da dieta padrão apresentou as respostas superestimulatória e superovulatória similares. O possível mecanismo que pode explicar a não diferença dentro da dieta padrão, e o grupo E apresentar menores respostas superestimulatória e superovulatória possivelmente é

a concentração de insulina plasmática, que apresentou correlação negativa com a resposta supestimulatória e superovulatória. Mollo, Rumpf *et al.*, (2007) encontraram uma correlação forte e negativa ($r = -0,45$) entre concentração de insulina e resposta superestimulatória quando forneceram a dieta por 63 dias antes de iniciar o protocolo. A diferença entre a população folicular entre o primeiro dia do FSH e o último dia de FSH, foi menor no grupo E, corroborando o possível efeito prejudicial da insulina plasmática.

No presente estudo não houve diferença no número de embriões viáveis e congeláveis entre os grupos, apesar de ter havido um decréscimo na resposta superovulatória no grupo E. Este estudo corrobora os achados de (Nolan, O'callaghan *et al.*, 1998), que encontraram um decréscimo na resposta superovulatória de animais com alta IMS, entretanto os animais apresentaram número de embriões similar, contrariando a hipótese inicial de que doadoras com alta IMS e energia apresentariam um menor número de embriões produzidos, possivelmente devido ao curto período de efeito da dieta/insulina (Santos, Cerri *et al.*, 2008; Sartori, Guardieiro *et al.*, 2012). Yaakub *et al.* (1999) forneceram uma dieta com padrão de fermentação ruminal de propionato (cevada), que resultou em menor número de embriões produzidos, comparada com uma dieta com padrão de fermentação de acetato, apesar de não ser dosada a insulina. Aparentemente o comprometimento no número de embriões produzidos ocorre devido a um longo período de exposição a insulina (Adamiak, Mackie *et al.*, 2005; Velazquez, Newman *et al.*, 2005). Apesar de não haver diferenças entre os tratamentos houve uma correlação negativa entre a o nível de insulina e o número de embriões viáveis, corroborando o estudo de (Velazquez, Newman *et al.*, 2005), que encontraram também a mesma correlação negativa ($r = -0,33$).

Adamiak, Mackie *et al.*, (2005) avaliaram a correlação entre produção de embriões *in vitro* e concentração de insulina durante oito semanas do fornecimento da dieta. Na primeira semana, a correlação era nula ($r = 0,024 \pm 0,02$), entretanto na última semana a correlação foi forte e negativa ($r = -0,71 \pm 0,31$), indicando efeito deletério e crônico do nível de insulina por longos períodos. Novilhas com alto ECC apresentaram menor quantidade de embriões grau 1 e 2 (Kadokawa, Tameoka *et al.*, 2008).

A concepção aos 30 e 60 dias não diferiu entre os grupos, assim como a perda embrionária, entretanto a insulina afetou negativamente a concepção.

Camundongas de linhagem que apresentavam resistência a insulina apresentaram embrião menores e anormalidades placentárias (Nandi, Wang *et al.*, 2012). Em humanos, a insulina tem sido relatada como uma queda no número de embriões produzidos *in vitro*, assim como uma redução na concepção.

3.7 Conclusão

- O grupo energia apresentou queda na resposta superovulatória.
- A insulina comprometeu a maioria dos parâmetros que influenciam na produção embrionária, assim como na taxa de prenhez, como resposta superovulatória, número de embriões viáveis e taxa de concepção aos 53 dias após a transferência dos embriões.
- A aspiração intrafolicular comprometeu os resultados do experimento em geral, pois diminuiu consideravelmente os parâmetros que poderiam ser alterados com a dieta. Como exemplo esperava-se de 400 a 500 embriões transferidos, entretanto o número foi abaixo do esperado.

4 Considerações Finais

O presente estudo, na parte de fisiologia ovariana, apresentou resultados que comprovam a influencia da nutrição no tamanho dos folículos e possivelmente alterações nas dietas que aumentem a circulação de hormônios esteroides em categorias como vaca alta produtora de leite. Assim como, aumentar a IMS em vacas de corte, aumenta o tamanho do folículo gerando benefício à fertilidade.

No experimento 2, comprovou-se o efeito deletério da insulina plasmática, pois além de comprometer a superovulação, comprometeu a taxa de concepção, corroborando os estudos com mulheres diabéticas, que tem uma fertilidade inferior a mulheres com insulina circulante normal. O presente estudo é pioneiro em demonstrar a influencia do grau de desenvolvimento embrionário na taxa de concepção em embriões vitrificados.

Como aplicações práticas relevantes baseadas nos resultados obtidos neste estudo, sugere-se fornecer dietas a doadoras de embriões que favoreçam a produção de acetato, ou seja, não aumente a concentração de insulina plasmática.

REFERÊNCIAS

ADAMIAK, S.J.; MACKIE, K.; WATT, R.G.; WEBB, R.; SINCLAIR, K.D. Impact of nutrition on oocyte quality: cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle. **Biology of Reproduction**, Madison, WI, v. 73, n. 5, p. 918-926, Nov 2005. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15972884> >.

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, WI, v. 52, n. 5, p. 1129-1135, May 1995. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7626713> >.

ARMSTRONG, D.G.; MCEVOY, T.G.; BAXTER, G.; ROBINSON, J.J.; HOGG, C.O.; WOAD, K.J.; WEBB, R.; SINCLAIR, K.D. Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production in vitro: associations with the ovarian insulin-like growth factor system. **Biology of Reproduction**, Madison, WI, v. 64, n. 6, p. 1624-32, Jun 2001. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11369588> >.

ARÉCHIGA, C.F.; ORTÍZ, O.; HANSEN, P.J. Effect of prepartum injection of vitamin E and selenium on postpartum reproductive function of dairy cattle. **Theriogenology**, Philadelphia, PA, v. 41, n. 6, p. 1251-1258, 1994. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16727478> >.

ARECHIGA, C.F.; VAZQUEZ-FLORES, S.; ORTIZ, O.; HERNANDEZ-CERON, J.; PORRAS, A.; MCDOWELL, L.R.; HANSEN, P.J. Effect of injection of beta-carotene or vitamin E and selenium on fertility of lactating dairy cows. **Theriogenology**, Philadelphia, PA, v. 50, n. 1, p. 65-76, Jul 1998. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10734475> >.

BARROS, C.; NOGUEIRA, M. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, Philadelphia, PA, v. 56, n. 9, p. 1483-1496, DEC 1 2001 2001. ISSN 0093-691X.

BARUSELLI, P.S.; SÁ FILHO, M.F.; MARTINS, C.M.; NASSER, L.F.T.; NOGUEIRA, M.F.G.; BARROS, C.M.; BÓ, G.A. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, Philadelphia, PA, v. 65, n. 1, p. 77-88, Jan 2006. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16290257> >.

BASTOS, M.R.; MARTINS, A.C.; MELO, L.F.; CARRIJO, L.H.D.; RUMPF, R.; SARTORI, R. Effect of body condition score and feed intake on the superovulatory response and embryo production in nelore heifers. n:REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 21.; 2007. Costa do Sauípe. **Proceedings...** Costa do Sauípe, 2007. 1242p.

BASTOS, M.R.; MARTINS, A.C.; MELO, L.F.; CARRIJO, L.H.D.; RUMPF, R.; SARTORI, R. Effect of nutritional flushing on the superovulatory response of crossbred cows. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 21.; 2007. Costa do Sauípe. **Proceedings...** Costa do Sauípe, 2007. 1243p.

BASTOS, M.R.; MATTOS, M.C.C.; MESCHIATTI, M.A.P.; SURJUS, R.S.; GUARDIEIRO, M.M.; FERREIRA, J.C.P.; MOURÃO, 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: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 21.; 2007. Costa do Sauípe. **Proceedings...** 776p.

BISINOTTO, R.S.; CHEBEL, R.C.; SANTOS, J.E. Follicular wave of the ovulatory follicle and not cyclic status influences fertility of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, IL, v. 93, n. 8, p. 3578-3587, Aug 2010. ISSN 1525-3198. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20655426> >.

BISINOTTO, R.S.; SANTOS, J.E. The use of endocrine treatments to improve pregnancy rates in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, Phoenix, AZ, v. 24, n. 1, p. 258-266, Dec 2011. ISSN 1031-3613. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22394967> >.

BLEACH, E.C.; GLENCROSS, R.G.; KNIGHT, P.G. Association between ovarian follicle development and pregnancy rates in dairy cows undergoing spontaneous oestrous cycles. **Reproduction**, Champaign, IL, v. 127, n. 5, p. 621-9, May 2004. ISSN 1470-1626. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15129018> >.

BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; CACCIA, M.; MARTINEZ, M.; PIERSON, R.A.; MAPLETOFT, R.J. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, NL, v. 39, n. 3, p. 193-204, AUG 1995. ISSN 0378-4320.

BONI, R.; ROELOFSEN, M.W.; PIETERSE, M.; KOGUT, J.; KRUIP, T.A. Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. **Theriogenology**, Philadelphia, PA, v. 48, n. 2, p. 277-289, Jul 1997. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16728127> >.

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 during realimentation and resumption of ovulation. **Biology of Reproduction**, Madison, WI, v. 62, n. 5, p. 1436-1444, May 2000. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10775198> >.

BOSSIS, I.; WETTEMANN, R.P.; WELTY, S.D.; VIZCARRA, J.A.; SPICER, L.J. Nutritionally induced anovulation in beef heifers: ovarian and endocrine function preceding cessation of ovulation. **Journal of Animal Science**, Champaign, IL, v. 77, n. 6, p. 1536-1546, Jun 1999. ISSN 0021-8812. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10375231> >.

BRIDGES, G.A.; MUSSARD, M.L.; BURKE, C.R.; DAY, M.L. Influence of the length of proestrus on fertility and endocrine function in female cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam,NL v. 117, n. 3/4, p. 208-215, Feb 2010. ISSN 1873-2232. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19500921> >.

BRIDGES, G.A.; MUSSARD, M.L.; PATE, J.L.; OTT, T.L.; HANSEN, T.R.; BURKE, C.R.; DAY, M.L. Impact of preovulatory estradiol concentrations on conceptus development and uterine gene expression. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam,NL, v. 133, n. 1/2, p. 16-26, Jul 2012. ISSN 1873-2232. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22789700> >.

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, PA , v. 54, n. 3, p. 421-431, Aug 2000. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11051325> >.

BURNS, D.S.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J.L.; KNIGHT, P.G; IRELAND, J.J. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. **Biology of Reproduction**, Madison, WI , v. 73, n. 1, p. 54-62, Jul 2005. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15744026> >.

BUTLER, W.R. Review: effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, IL, v. 81, n. 9, p. 2533-2539, Sep 1998. ISSN 0022-0302. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9785246> >.

BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MARTÍNEZ, M.F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science,NL**, v. 78, n. 3/4, p. 307-326, Oct 2003. ISSN 0378-4320. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12818651> >.

CARVALHO, J.B.P.; CARVALHO, N.A.T.; REIS, E.L.; NICHI, M.; SOUZA, A.H.; BARUSELLI, P.S. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, Philadelphia, PA, v. 69, n. 2, p. 167-175, Jan 2008. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17980904> >.

CASTRO NETO, A.S.; SANCHES, B.V.; BINELLI, M.; SENEDA, M.M.; PERRI, S.H.; GARCIA, J.F. Improvement in embryo recovery using double uterine flushing. **Theriogenology**, Philadelphia, PA , v. 63, n. 5, p. 1249-1255, MAR 15 2005 2005. ISSN 0093-691X.

CERRI, R.L.; RUTIGLIANO, H.M.; CHEBEL, R.C.; SANTOS, J.E. Period of dominance of the ovulatory follicle influences embryo quality in lactating dairy cows. **Reproduction**, Champaign, IL, v. 137, n. 5, p. 813-823, May 2009. ISSN 1741-7899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19204087> >.

CHEBEL, R.C.; AL-HASSAN, M.J.; FRICKE, P.M.; SANTOS, J.E.P.; LIMA, J.R.; MARTEL, C.A.; STEVENSON, J.S.; GARCIA, R.; AX, R.L. Supplementation of progesterone via controlled internal drug release inserts during ovulation synchronization protocols in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, IL, v. 93, n. 3, p. 922-931, Mar 2010. ISSN 1525-3198. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20172212> >.

CLEMENTE, M.; DE LA FUENTE, J.; FAIR, T.; AL NAIB, A.; GUTIERREZ-ADAN, A.; ROCHE, J.F.; RIZOS, D.; LONERGAN, P. Progesterone and conceptus elongation in cattle: a direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium? **Reproduction**, New York, v. 138, n. 3, p. 507-517, Sep 2009. ISSN 1741-7899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19556439> >.

DAVOREN, J.B.; HSUEH, A.J. Insulin enhances FSH-stimulated steroidogenesis by cultured rat granulosa cells. **Molecular Cell Endocrinology**, Nottingham, UK, v. 35, n. 2/3, p. 97-105, May 1984. ISSN 0303-7207. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6428947> >.

DAWUDA, P.M.; SCARAMUZZI, R.J.; LEESE, H.J.; HALL, C.J.; PETERS, A.R.; DREW, S.B.; WATHES, D.C. Effect of timing of urea feeding on the yield and quality of embryos in lactating dairy cows. **Theriogenology**, Philadelphia, PA, v. 58, n. 8, p. 1443-55, Nov 2002. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12374116> >.

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**, cidade, v. 69, p. 411-417, OCT 1999. ISSN 1357-7298.

Echternkamp, S.E.; Howard, H.J.; Roberts, A.J.; Grizzle, J.; and Wise, T. Relationships among concentrations of steroids, insulin-like growth factor-I, and insulin-like growth factor binding proteins in ovarian follicular fluid of beef cattle. **Biology of Reproduction**, Madison, WI, v. 51, n. 5, p. 971-981, Nov 1994. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7531509> >.

FONSECA, F.A.; BRITT, J.H.; MCDANIEL, B.T.; WILK, J.C.; RAKES, A.H. Reproductive traits of Holsteins and Jerseys. Effects of age, milk yield, and clinical abnormalities on involution of cervix and uterus, ovulation, estrous cycles, detection of estrus, conception rate, and days open. **Journal of Dairy Science**, Champaign, IL, v. 66, n. 5, p. 1128-1147, May 1983. ISSN 0022-0302. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6683729> >.

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**, Champaign, IL, v. 131, n. 4, p. 783-794, Apr 2006. ISSN 1470-1626. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16595729> >.

GADDUM-ROSSE, P. Some observations on sperm transport through the uterotubal junction of the rat. **Animal Journal Anatomy**, New York, NY, v. 160, n. 3, p. 333-341, Mar 1981. ISSN 0002-9106. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6894349> >.

GIBBONS, J.R.; WILTBANK, M.C.; GINTHER, O.J. Relationship between follicular development and the decline in the follicle-stimulating hormone surge in heifers. **Biology of Reproduction**, Madison, WI, v. 60, n. 1, p. 72-77, Jan 1999. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9858488> >.

GONG, J. Influence of metabolic hormones and nutrition on ovarian follicle development in cattle: practical implications. **Domestic Animal Endocrinology**, cidade, v. 23, n. 1/2, p. 229-241, JUL 2002 2002. ISSN 0739-7240.

GONG, J.G.; ARMSTRONG, D.G.; BAXTER, G.; HOGG, C.O.; GARNSWORTHY, P.C.; WEBB, R. The effect of increased dietary intake on superovulatory response to FSH in heifers. **Theriogenology**, Philadelphia, PA, v. 57, n. 6, p. 1591-1602, APR 1 2002 2002. ISSN 0093-691X.

GONG, J.; BRAMLEY, T.; WEBB, R. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian-function in heifers - follicular populations and peripheral hormones. **Biology of Reproduction**, Madison, WI, v. 45, n. 6, p. 941-949, DEC 1991 1991. ISSN 0006-3363.

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, IL, v. 75, n. 7, p. 1876-1884, JUL 1997 1997. ISSN 0021-8812.

HARRISON, R.O.; FORD, S.P.; YOUNG, J.W.; CONLEY, A.J.; FREEMAN, A.E. Increased milk production versus reproductive and energy status of high producing dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, IL, v. 73, n. 10, p. 2749-2758, Oct 1990. ISSN 0022-0302. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2283405> >.

HAWK, H.W.; COOPER, B.S. Improvement of sperm transport by the administration of estradiol to estrous ewes. **Journal of Animal Science**, Champaign, IL, v. 41, n. 5, p. 1400-1406, Nov 1975. ISSN 0021-8812. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1238386> >.

INGRAHAM, R.H.; KAPPEL, L.C.; MORGAN, E.B.; SRIKANDAKUMAR, A. Correction of subnormal fertility with copper and magnesium supplementation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, IL, v. 70, n. 1, p. 167-180, Jan 1987. ISSN 0022-0302. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3571619> >.

IRELAND, J.; WARD, F.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J.; SMITH, G.; LONERGAN, P.; EVANS, A. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. **Human Reproduction, Washington**, v. 22, n. 6, p. 1687-1695, JUN 2007 2007. ISSN 0268-1161.

JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J.; SMITH, G.; LONERGAN, P.; EVANS, A. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, Phoenix, AZ, v. 23, n. 1, p. 1-14, 2011. ISSN 1031-3613. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21366975> >.

IRELAND, J.L.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J.; SMITH, G.; LONERGAN, P.; EVANS, A. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. **Biology of Reproduction**, Madison, WI, v. 79, n. 6, p. 1219-1225, Dec 2008. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18768912> >.

KADOKAWA, H.; TAMEOKA, N.; UCHIZA, M.; KIMURA, Y.; YONAI, M. Short communication: a field study on the relationship between body condition and embryo production in superovulated Holstein yearling heifers. **Journal of Dairy Science**, Champaign, IL, v. 91, n. 3, p. 1087-1091, Mar 2008. ISSN 1525-3198. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18292264> >.

KELLER, D.; TEEPKE, G. Effect of variability in response to superovulation on donor cow selection differentials in nucleus breeding schemes. **Journal of Dairy Science**, Champaign, IL, v. 73, n. 2, p. 549-554, FEB 1990 1990. ISSN 0022-0302.

KULICK, L.J.; KOT, K.; WILTBANK, M.C.; GINTHER, O.J. Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. **Theriogenology**, Philadelphia, PA, v. 52, n. 5, p. 913-921, Oct 1999. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10735130> >.

KUWAYAMA, M. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. **Reprod Biomed Online**, v. 11, n. 5, p. 608-614, Nov 2005. ISSN 1472-6483. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16409712> >.

LEMLEY, C.O.; VONNAHME, K.A.; TAGER, L.R.; KRAUSE, K.M.; WILSON, M.E. Diet-induced alterations in hepatic progesterone (P4) catabolic enzyme activity and P4 clearance rate in lactating dairy cows. **Journal of Endocrinology**, Londres v. 205, n. 3, p. 233-241, Jun 2010. ISSN 1479-6805. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20223860> >.

LOONEY, C. Superovulation in beef females. In: ANNUAL CONVENTION OF AETA, 15.; 1986. Fort Worth, TX: AETA.; 1986. p.16-29.

LOPEZ, H.; SATTER, L.D.; WILTBANK, M.C. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science**, NL, v. 81, n. 3/4, p. 209-223, Apr 2004. ISSN 0378-4320. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14998648> >.

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**, Champaign, IL, v. 53, p. 125 - 543. 2003.

LÓPEZ-GATIUS, F. Is fertility declining in dairy cattle? A retrospective study in northeastern Spain. **Theriogenology**, Philadelphia, PA, v. 60, n. 1, p. 89-99, Jun 2003. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12620583> >.

MACKEY, D.R.; WYLIE, A.R.; SREENAN, J.M.; ROCHE, J.F.; DISKIN, M.G. The effect of acute nutritional change on follicle wave turnover, gonadotropin, and steroid concentration in beef heifers. **Journal of Animal Science**, Champaign, IL v. 78, n. 2, p. 429-442, Feb 2000. ISSN 0021-8812. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10709935> >.

MANI, A.M. IGF1 induces up-regulation of steroidogenic and apoptotic regulatory genes via activation of phosphatidylinositol-dependent kinase/AKT in bovine granulosa cells. **Reproduction**, Champaign, IL, v. 139, n. 1, p. 139-151, Jan 2010. ISSN 1741-7899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19819918> >.

MANN, G.E.; LAMMING, G.E. The role of sub-optimal preovulatory oestradiol secretion in the aetiology of premature luteolysis during the short oestrous cycle in the cow. **Animal Reproduction Science**, NL, v. 64, n. 3/4, p. 171-180, Dec 2000. ISSN 0378-4320. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11121894> >.

MANN, G.E. The regulation of interferon-tau production and uterine hormone receptors during early pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, New York, NY, v. 54, p. 317-328, 1999. ISSN 0449-3087. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10692864> >.

MAPLETOFT, R.; STEWARD, K.; ADAMS, G. Recent advances in the superovulation in cattle. **Reproduction Nutrition Development**, Chicago, v. 42, n. 6, p. 601-611, NOV-DEC 2002. ISSN 0926-5287.

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**. 2007. v.1 1026 p.

MATTOS, M.C.C.; BASTOS, M.R.; GUARDIEIRO, M.M.; CARVALHO, J.O.; FRANCO, M.; MOURAO, G.B.; BARROS, C.M.; SARTORI, R. Improvement of embryo production by the replacement of the last two doses of porcine follicle-stimulating hormone with equine chorionic gonadotropin in Sindhi donors. **Animal Reproduction Science**, Amsterda, NL, v. 125, n. 1/4, p. 119-123, MAY 2011 2011. ISSN 0378-4320.

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

MEISTERLING, E.M.; DAILEY, R.A. Use of concentrations of progesterone and estradiol-17 beta in milk in monitoring postpartum ovarian function in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, IL v. 70, n. 10, p. 2154-2161, Oct 1987. ISSN 0022-0302. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3680735> >.

MENEGHETTI, M. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for Bos indicus cows I: basis for development of protocols. **Theriogenology**, Philadelphia, PA , v. 72, n. 2, p. 179-189, Jul 2009. ISSN 1879-3231. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19344942> >.

MOLLO, M.R.; RUMPF, R.; MARTINS, A.C.; MATTOS, M.C.C.; LOPES JR.; G.; CARRIJO, L.H.D.; SARTORI, R. Embryo production in superovulated nelore heifers under low or high feed intake. **Acta Scientiae Veterinariae**, São Paulo SP. v.35, n.3, p.958, 2007.

MOREIRA, F.; DE LA SOTA, R.L.; DIAZ, T.; THATCHER, W.W. Effect of body condition on reproductive efficiency of lactating dairy cows receiving a timed insemination. **Theriogenology**, Philadelphia, PA , v. 53, n. 6, p. 1305-1319, Apr 2000. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10832755> >.

MURPHY, M.G.; ENRIGHT, W.J.; CROWE, M.A.; MCCONNELL, K.; SPICER, L.J.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. Effect of dietary intake on pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle in beef heifers. **Journal Reproduction and Fertility**, New York, NY, v. 92, n. 2, p. 333-338, Jul 1991. ISSN 0022-4251. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1886091> >.

MUSSARD, M.L.; BURKE, C.R.; BEHLKE, E.J.; GASSER, C.L.; DAY, M.L. Influence of premature induction of a luteinizing hormone surge with gonadotropin-releasing hormone on ovulation, luteal function, and fertility in cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, IL, v. 85, n. 4, p. 937-943, Apr 2007. ISSN 1525-3163. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17145968> >.

NASCIMENTO, A.B.; SOUZA, A.H.; GUENTHER J.N.; COSTA, F.P.; SARTORI, R.; WILTBANK, M.C. Effects of treatment with human chorionic gonadotrophin or intravaginal progesterone-releasing device after AI on circulating progesterone concentrations in lactating dairy cows. **Reproduction, Fertility and Development**, Phoenix, AZ, Oct 2012. ISSN 1031-3613. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23058209> >.

NOGUEIRA, M.F.G.; FRAGNITO, P.S.; TRINCA, L.A.; BARROS, C.M. The effect of type of vaginal insert and dose of pLH on embryo production, following fixed-time AI in a progestin-based superstimulatory protocol in Nelore cattle. **Theriogenology**, Philadelphia, PA , v. 67, n. 3, p. 655-660, FEB 2007 2007. ISSN 0093-691X.

NOLAN, R.; O'CALLAGHAN, D.; DUB, 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, PA, v. 50, n. 8, p. 1263-1274, Dec 1998. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10734440> >.

ORIHUELA, P.A.; ORTIZ, M.E.; CROXATTO, H.B. Sperm migration into and through the oviduct following artificial insemination at different stages of the estrous cycle in the rat. **Biology of Reproduction**, Madison, WI, v. 60, n. 4, p. 908-913, Apr 1999. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10084965> >.

PARR, R.A.; DAVIS, I.F.; MILES, M.A. Squires. Feed intake affects metabolic clearance rate of progesterone in sheep. **Res Veterinary Science**, Londres, v. 55, n. 3, p. 306-310, Nov 1993. ISSN 0034-5288. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8284493> >.

PEREA, F.P.; DEONDIZ, A.D.; PALOMARES, R.A.; HERNÁNDEZ, H.J.; GONZÁLEZ, R.; SOTO, E.R. Control of postpartum anestrous with an intra-vaginal progesterone device plus eCG or calf removal for 120 h in suckled crossbred cows managed in a pasture-based system. **Animal Reproduction Science, NL**, v. 106, n. 3/4, p. 298-310, Jul 2008. ISSN 0378-4320. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17573210> >.

PERES, R.F.; CLARO JUNIOR, I.; SÁ FILHO, O.G.; NOGUEIRA, G.P.; VASCONCELOS, J.L.M. Strategies to improve fertility in Bos indicus postpubertal heifers and nonlactating cows submitted to fixed-time artificial insemination. **Theriogenology**, Philadelphia, PA , v. 72, n. 5, p. 681-689, Sep 2009. ISSN 1879-3231. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19559472> >.

REVAH, I.; BUTLER, W.R. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. **Journal Reproduction and Fertility, NL**, v. 106, n. 1, p. 39-47, Jan 1996. ISSN 0022-4251. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8667344> >.

RHOADS, M.L.; RHOADS, R.P.; GILBERT, R.O.; TOOLE, R.; BUTLER, W.R. Detrimental effects of high plasma urea nitrogen levels on viability of embryos from lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science**, NL, v. 91, n. 1/2, p. 1-10, Jan 2006. ISSN 0378-4320. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16310096> >.

RIBEIRO, E.S.; MONTEIRO, P.A.; LIMA, F.S.; AYRES, H.; BISINOTTO, R.S.; FAVORETO, M.; GRECO, L.F.; MARSOLA, R.S.; THATCHER, W.W.; SANTOS, J.E.P. Effects of presynchronization and length of proestrus on fertility of grazing dairy cows subjected to a 5-day timed artificial insemination protocol. **Journal of Dairy Science**, Champaign, IL, v. 95, n. 5, p. 2513-2522, May 2012. ISSN 1525-3198. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22541478> >.

RIVERA, F.A.; MENDONÇA, L.G.D.; LOPES, G.; SANTOS, J.E.P.; PEREZ, R.V.; AMSTALDEN, M.; CORREA-CALDERON, A.; CHEBEL, R.C. Reduced progesterone concentration during growth of the first follicular wave affects embryo quality but has no effect on embryo survival post transfer in lactating dairy cows. **Reproduction**, Champaign, IL, v. 141 p.333-342, 2011. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20338427> >.

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, IL, v. 85, n. 11, p. 2831-2842, Nov 2002. ISSN 0022-0302. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12487450> >.

SANTOS, J.E.P.; THATCHER, W.W.; CHEBEL, R.C.; CERRI, R.L.A.; GALVÃO, K. N. Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of Holstein dairy cows. **Animal Reproduction Science**, NL, v. 80, n. 1/2, p. 31-45, Jan 2004. ISSN 0378-4320. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15036513> >.

SANTOS, J.E.; CERRI, R.L.; SARTORI, R. Nutritional management of the donor cow. **Theriogenology**, Philadelphia, PA, v. 69, n. 1, p. 88-97, Jan 2008. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17959235> >.

SARTORI, R.; BARROS, C. Reproductive cycles in Bos indicus cattle. **Animal Reproduction Science**, Dordrecht, v. 124, n. 3/4, p. 244-250, APR 2011 2011. ISSN 0378-4320.

SARTORI, R. GUARDIERO, M.M.; MOLLO, M.R.; SURJUS, R.S. Feed intake in reproduction in cattle. In: _____ (Ed.). **Recent advances in Animal nutrition**. Nottingham: Nottingham University, v.1, 2012.

SARTORI, R.; HAUGHIAN, J.M.; SHAVER, R.D.; ROSA, G.J.; WILTBANK, M.C. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, IL, v. 87, n. 4, p. 905-920, Apr 2004. ISSN 0022-0302. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15259225> >.

SARTORI, R.; ROSA, G.J.; WILTBANK, M.C. Ovarian structures and circulating steroids in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. **Journal of Dairy Science**, Champaign, IL, v. 85, n. 11, p. 2813-2822, Nov 2002. ISSN 0022-0302. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12487448> >.

SARTORI, R.; SUAREZ-FERNANDEZ, C.A.; MONSON, R.L.; GUENTHER, J.N.; ROSA, G.J.M.; WILTBANK, M.C. Improvement in recovery of embryos/ova using a shallow uterine horn flushing technique in superovulated Holstein heifers. **Theriogenology**, Philadelphia, PA, v. 60, n. 7, p. 1319-1330, Oct 2003. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14511785> >.

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 Domestic Animals**, Dordrecht, v. 37, p. 37-41 p, 2002.

SINGH, J.; DOMINGUEZ, M.; JAISWAL, R.; ADAMS, G P. A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. **Theriogenology**, Philadelphia, PA, v. 62, n. 1/2, p. 227-243, JUL 2004 2004. ISSN 0093-691X.

SOUZA, A.H.; VIECHNIESKI, S.; LIMA, F.A.; SILVA, F.F.; ARAUJO, R.; BÓ, G.A.; WILTBANK, M.C.; BARUSELLI, P.S. Supplementation with estradiol-17beta before the last gonadotropin-releasing hormone injection of the Ovsynch protocol in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, IL, v. 90, n. 10, p. 4623-4634, Oct 2007. ISSN 1525-3198. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17881683> >.

STEVENSON, J. Treatment of cycling and noncycling lactating dairy cows with progesterone during Ovsynch. **Journal of Dairy Science**, Champaign, IL, v. 89, n. 7, p. 2567-2578, JUL 2006 2006. ISSN 0022-0302.

STEVENSON, J.L.; DALTON, J.C.; SANTOS, J.E.P.; SARTORI, R.; AHMADZADEH, A.; CHEBEL, R.C. Effect of synchronization protocols on follicular development and estradiol and progesterone concentrations of dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, Champaign, IL, v. 91, n. 8, p. 3045-3056, Aug 2008. ISSN 1525-3198. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18650281> >.

SURJUS, R.S.; PRATA, A.B.; BORSATO, M.; MARTINS DA SILVEIRA, M.; MATTOS, M.C.; MATTOS, F.C.S.Z.; MONTEIRO JR, P.L.; MOURÃO, G.B.; SANTOS, F.A.P.; SARTORI, R. Influence of high or low intake of dry matter and energy on *in vivo* production of bovine embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, Phoenix, AZ, v. 1, p. 227, 2012.

SURJUS, R.S. PRATA, A.B.; BORSATO, M.; MATTOS, F.C.S.Z.; MARTINS DA SILVEIRA, M.; MOURÃO, G.B.; PIRES, A.V.; WILTBANK, M.C.; SARTORI, R. ***In vivo* embryo production in cows superovulated 1 or 2 days after OPU**: Reproduction, Fertility and development 2013.

SÁ FILHO, M.F. GIROTTTO, R.; ABE, E.K.; PENTEADO, L.; CAMPOS FILHO E.P.; MORENO, J.F.; SALA, R.V.; NICHI, M.; BARUSELLI, P.S. Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled Bos indicus cows submitted to estradiol/progesterone-based timed insemination protocols. **Theriogenology**, Philadelphia, PA , V. 76, N. 3, P. 455-463, AUG 2011. ISSN 1879-3231. DISPONÍVEL em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21497390> >.

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, PA , v. 60, n. 5, p. 795-807, Sep 2003. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12935858> >.

VASCONCELOS, J.L.; SARTORI, R.; OLIVEIRA, H.N.; GUENTHER, J.G.; WILTBANK, M.C. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. **Theriogenology**, Philadelphia, PA v. 56, n. 2, p. 307-314, Jul 2001. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11480622> >.

VELAZQUEZ, M.A.; NEWMAN, M.; CHRISTIE, M.F.; CRIPPS, P.J.; CROWE, M.A.; SMITH, R.F.; DOBSON, H. The usefulness of a single measurement of insulin-like growth factor-1 as a predictor of embryo yield and pregnancy rates in a bovine MOET program. **Theriogenology**, Philadelphia, PA ,v. 64, n. 9, p. 1977-1994, Dec 2005. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15936811> >.

VIANA, J.H.M.; PALHAO, M.P.; SIQUEIRA, L.G.B.; FONSECA, J.F. CAMARGO L.S.A. Ovarian follicular dynamics, follicle deviation, and oocyte yield in Gyr breed (Bos indicus) cows undergoing repeated ovum pick-up. **Theriogenology**, Philadelphia, PA , v. 73, n. 7, p. 966-972, Apr 2010. ISSN 1879-3231. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20071017> >.

VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A. A produção de embriões bovinos no Brasil: Uma nova realidade. **Acta Scientiae Veterinary**, São Paulo, v.35, p.915-924, 2007.

WEBB, R.; GARNSWORTHY, P.C.; GONG, J.G.; ASRMSTRONG, D.G. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. **Journal of Animal Science**, Champaign, IL, v. 82 E-Suppl, p. E63-74, 2004. ISSN 1525-3163. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15471816> >.

WILTBANK, M.; LOPEZ, H.; SARTORI, R.; SANGSRITAVONG, S.; GUMEN, A. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. **Theriogenology**, Philadelphia, PA , v. 65, n. 1, p. 17-29, Jan 2006. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16290258> >.

WILTBANK, M.; SARTORI, R.; VASCONCELOS, J.L.M.; NASCIMENTO, A.B.; SOUZA, A.H.; AYRES, H.; CUNHA, A.P; LOPEZ, H.; GUMEN, A.; KESKIN, A.; GUENTHER, J.N. Managing the dominant follicle in high-producing dairy cows. **Society Reproduction and Fertility**, Nottingham, UK, v. 67, p. 231-245, 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21755676> >.

WILTBANK, M.; SOUZA, A.H.; GIORDANO, J.O.; NASCIMENTO, A.B.; VASCONCELOS, J.L.M.; PEREIRA, M.H.C. SURJUS, R.S.; ZINSLY, F.C.S.; CARVALHO, P.D.; BENDER, R.W.; SARTORI, R. Positive and negative effects of progesterone during time AI protocols in lactating dairy cattle: **Animal Reproduction**, Washinton, v. 9, p. 231-240, 2012.

WOLFENSON, D.; INBAR, G.; ROTH, Z.; KAIM, M.; BLOCH, A.; BRAW-TAL, R. Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. **Theriogenology**, Philadelphia, PA , v. 62, n. 6, p. 1042-1055, Sep 2004. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15289046> >.

WRENZYCKI, C.; DE SOUZA, P.; 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 and Fertility**, Cambridge v. 118, n. 1, p. 69-78, Jan 2000. ISSN 0022-4251. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10793627> >.

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, PA , v. 51, n. 7, p. 1259-1266, May 1999. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10729090> >.