

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

VIABILIDADE DE EMBRIÕES VITRIFICADOS
RESULTANTES DA FERTILIZAÇÃO *in vitro* DE OÓCITOS
DE VACAS SUPLEMENTADAS COM CANOLA EM GRÃO

Autor: Maria Cecília Nunes Domingues

Orientador: Prof. Dr. Luiz Paulo Rigolon

MARINGÁ

Estado do Paraná

Março – 2008



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

VIABILIDADE DE EMBRIÕES VITRIFICADOS
RESULTANTES DA FERTILIZAÇÃO *in vitro* DE OÓCITOS
DE VACAS SUPLEMENTADAS COM CANOLA EM GRÃO

Autor: Maria Cecília Nunes Domingues

Orientador: Prof. Dr. Luiz Paulo Rigolon

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá- Área de concentração: Produção Animal.

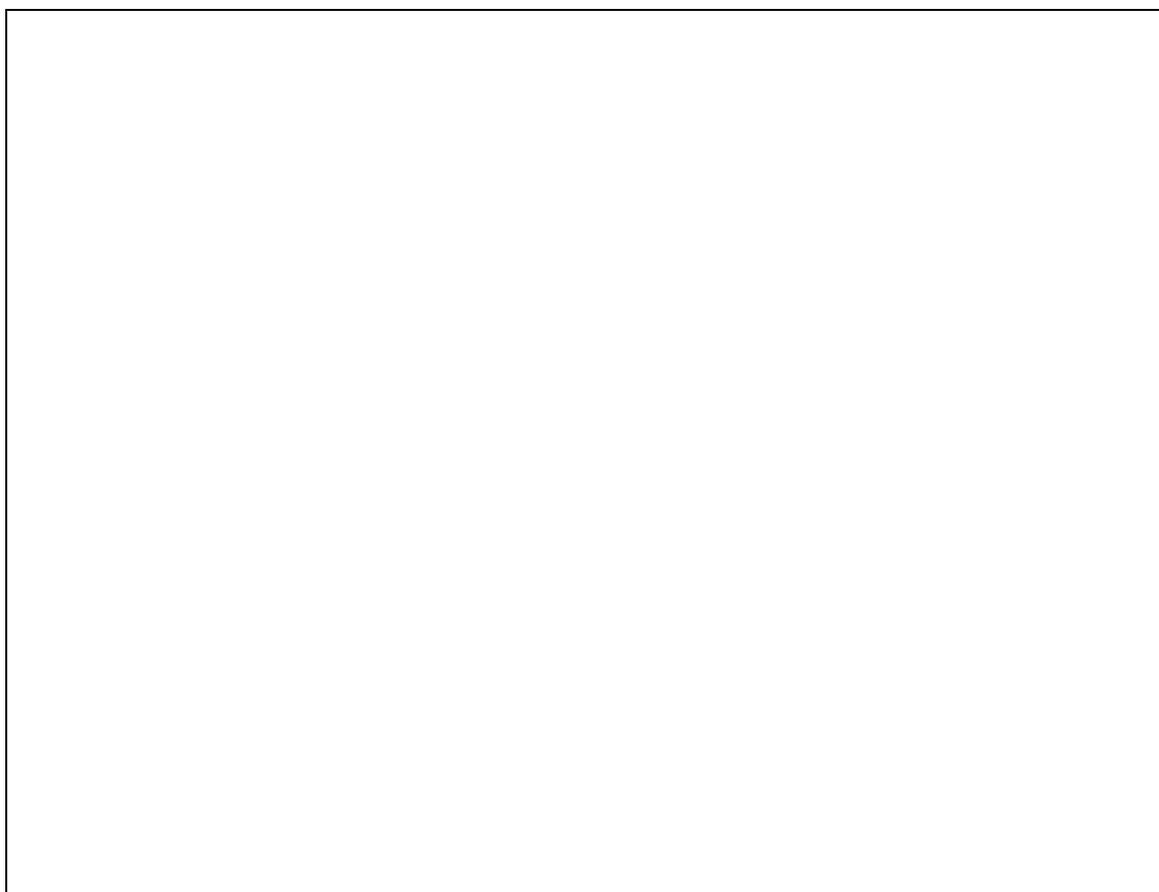
MARINGÁ

Estado do Paraná

Março – 2008



Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e Classificação da
Biblioteca Central da UEM





UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

VIABILIDADE DE EMBRIÕES VITRIFICADOS
RESULTANTES DA FERTILIZAÇÃO *in vitro* DE OÓCITOS
DE VACAS SUPLEMENTADAS COM CANOLA EM GRÃO

Autor: Maria Cecília Nunes Domingues
Orientador: Prof. Dr. Luiz Paulo Rigolon

TITULAÇÃO: Mestre em Zootecnia – Área de concentração

Produção Animal

APROVADA: 26.03.2008

Prof. Dr. Gentil Vanini de Moraes

Profª. Dra Sandra Maria Simonelli

Prof. Dr. Luiz Paulo Rigolon

(Orientador)



Os dois horizontes

Dois horizontes fecham nossa vida:

*Um horizonte, — a saudade
Do que não há de voltar;*

*Outro horizonte, — a esperança
Dos tempos que hão de chegar;*

*No presente, — sempre escuro, —
Vive a alma ambiciosa
Na ilusão voluptuosa
Do passado e do futuro.*

...

Machado de Assis



DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais *Eduardo e Ana Lúcia*... por acreditarem em mim algumas vezes mais do que eu mesma. Agradeço por enraizarem em minha personalidade tantos valores preciosos e por jamais me permitirem desacreditar na felicidade.



AGRADECIMENTOS

A Deus, pela luz;

Aos meus irmãos Carol, André e Tina, que são meus exemplos de garra e perseverança. Meu agradecimento especial a vocês que estiveram incondicionalmente ao meu lado;

À Universidade Estadual de Maringá e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia;

À Fazenda Três Corações, especialmente aos funcionários, pela disponibilidade;

Ao Centro Universitário de Maringá (CESUMAR), de forma especial à Milena e Márcio Tibúrcio, que estiveram envolvidos no experimento com tanta dedicação;

Ao Prof. Dr Luiz Paulo Rigolon, pela confiança em mim depositada. Agradeço pela orientação, paciência e amizade;

Ao Prof. Dr Fábio Luiz Bim Cavaliere, pela co-orientação. Meus agradecimentos pelo incentivo e pelos ensinamentos;

À Profa Dra Sandra Simonelli por acreditar e me dar força nos momentos em que precisei. Obrigada pela sua amizade;

Aos colegas de pós-graduação Fabíola, Marcela, Gustavo, Ana Cláudia e Amanda pela força, parceria e amizade;

Aos meus familiares que, mesmo à distância, estiveram presentes nesta trajetória.

Aos amigos, Wesley, Tatiane, Ana Paula, Carol, Luiz Fernando, Daniela Pilz, Simone Bopp, Ighor, João Conte, Valdemir, Anne, Mirela,



Cláudia Russo e Marcela Araújo, que contribuíram cada um da sua maneira, para a realização deste trabalho.

Às crianças mais encantadoras que já conheci: Dani, Tuta, Bia e Andrezinho, pelo sorriso gratuito que me cativava instantaneamente.

Às amigas campineiras que não me deixaram faltar garra, fazendo de cada obstáculo um novo impulso. Obrigada: Bia, Gê, Jú Nalin, Debora, Carol Loira, Carol Barros, Carol Rogé, Cris, Fá, Dri, Taca, Jú Vulcano, Jú Marzo, Marcela, Rê Schu, Rê Richieri....



BIOGRAFIA

MARIA CECÍLIA NUNES DOMINGUES, filha de Eduardo Michel Domingues e Ana Lúcia Nunes Domingues, nasceu em Campinas, São Paulo, no dia 07 de março de 1977.

Em dezembro de 2001 concluiu o curso de Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais.

Durante o ano de 2002 trabalhou como trainee na empresa Multimix Nutrição Animal Ltda.



Em abril de 2003 foi contratada pela Faculdade Integrada de Campo Mourão – PR, onde exerceu a função de docência nas disciplinas de Embriologia, Patologia e Clínica da Reprodução, Inseminação Artificial, Obstetrícia e Semiologia, até dezembro de 2007. Também, nesse período, trabalhou como Médica Veterinária no Hospital Veterinário dessa mesma Instituição, prestando serviços na área de Reprodução Animal.

Em janeiro de 2006 iniciou o Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, em nível Mestrado, área de concentração Produção Animal, na Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos na área de Reprodução Animal.



INDICE

	Página
LISTAS DE TABELA.	xii
LISTAS DE FIGURAS.	xiii
RESUMO.	1
ABSTRACT.	3
I – INTRODUÇÃO.	5
1.1. Introdução geral.	5
1.2. Fatores limitantes da produção <i>in vitro</i> de embriões.	7
1.3. Lipídios.	8
1.4. Canola: fonte de ácidos graxos poliinsaturados.	10
1.5. Gordura e Reprodução.	11

1.6. Ácidos graxos e taxa de gestação.	13
1.7. Ácidos graxos, crescimento folicular e produção de embriões	14
1.8. Ácidos graxos e prostaglandinas.	16
1.9. Ácidos graxos e criopreservação de embriões.	17
Referências bibliográficas.	20
VIABILIDADE DE EMBRIÕES VITRIFICADOS RESULTANTES DA FERTILIZAÇÃO <i>in vitro</i> DE OÓCITOS DE VACAS SUPLEMENTADAS COM CANOLA EM GRÃO	32
Resumo.	33
Abstract.	34
Introdução.	35
Material e Métodos.	37
Resultados e Discussão.	41
Conclusões.	46
Referências Bibliográficas.	46

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Composição percentual dos ingredientes das dietas experimentais (%/base matéria seca)	38
Tabela 2. Efeito da inclusão de canola em grão na dieta de vacas da raça Nelore no número de oócitos viáveis (NOV), de clivagem (TCL) e taxa de blastocisto (TBL)	41
Tabela 3: Médias e erros-padrão das variáveis: número de oócitos viáveis (NOV), taxa de clivagem (TCL) e taxa de blastocisto (TBL) em função da ordem de punção (OPU) em vacas do grupo controle e suplementadas com canola.	42
Tabela 4. Médias e erros-padrão para taxa de expansão (TEP) e taxa de eclosão (TEC) de embriões de vacas da raça Nelore	45



LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1: Taxa de clivagem em função da ordem de punção em vacas alimentadas com canola	43
Figura 2: Taxa de Blastocisto em função da ordem de punção de vacas alimentadas com Canola	44



RESUMO

Avaliou-se a produção de oócitos e de embriões de vacas Nelore produzidos *in vitro*, bem como a resistência dos embriões à vitrificação, quando os animais foram suplementados com grãos de canola. Foram utilizadas 12 vacas Nelore, com idade média de 4 anos e peso médio de 500 Kg de peso vivo, provenientes do mesmo grupo genético, distribuídas, aleatoriamente, em dois grupos: 1 controle e 2 tratados com canola em grão. Antes do início do período experimental, os animais passaram por um período de adaptação de 15 dias, recebendo silagem e o concentrado, sendo que o grupo 2 recebeu 2 kg de canola em grão. Decorridos 15 dias de alimentação experimental os ovários das vacas foram aspirados (OPU), para padronizar as ondas foliculares. Esta aspiração foi desprezada, e em continuidade foram realizadas mais quatro aspirações em cada animal, com intervalo de quinze dias, para obtenção de óocitos suficientes para fecundação *in vitro*. Os oócitos foram quantificados e classificados em viáveis ou inviáveis. A seguir, realizou-se a maturação e fecundação e os zigotos foram cultivados *in vitro* e, decorridas 48 horas, avaliou-se a taxa de clivagem. Foram realizadas duas outras avaliações, nos estágios de mórula (8 células) e blastocisto inicial. Não houve diferenças ($P>0,05$) no número total de oócitos viáveis, taxa de clivagem e taxa de blastocistos em função do tratamento. Os tratamentos não influenciaram a taxa de re-expansão após vitrificação e descongelamento, todavia houve diferença significativa ($P<0,06$) para a taxa de eclosão. A adição de canola em grãos na dieta de vacas não alterou a produção de



embriões. Entretanto, os embriões resultantes de oócitos coletados de vacas alimentadas com canola em grão são mais resistentes à vitrificação que aqueles que não o foram.

Palavras-chaves: Nelore, ômega-6, ômega-9, criopreservação, embrião.

ABSTRACT

The evaluated production of oocytes and embryos of Nelore cows produced *in vitro*, as well as the resistance of these embryos to vitrification, when these animals had been supplemented with grains of canola (n-9 and n-6). 12 Nelore cows had been used, with average age of 4 years and 500 average weight of kg, proceeding from the same genetic group distributed in two groups: Treatment 1 = control and Treatment 2 = canola. Before the beginning of the experimental period, the animals they had passed for a period of adaptation of 15 days having received ensilage and the concentrate, being that 2 treatment 2 received kg from canola in grain. After 15 days the ovaries of the cows had been inhaled (OPU), to standardize the follicular waves. This first aspiration was rejected and after that four aspirations in each animal had been carried through more, with interval of fifteen days, for attainment of enough oocytes for fertilization *in vitro*. The oocytes had been quantified and classified in viable or impracticable. To follow it was become fulfilled maturation and



fertilization. After the accomplishment of the fertilization, the zygotes had been cultivated in vitro and passed 48 hours, it was evaluated cleavage tax. Two other evaluations had been carried through, in the periods of training of morula (8 cells) and early blastocyst. It didn't have differences ($P>0,05$) for the number of viable oocytes, cleavage rate and blastocyst rate in function of the treatment. The treatments had not differed ($P>0,05$) for the re-expansion rate after vitrification and unfreeze, however it had significant difference ($P<0,06$) for the hatching rate. The addition of canola in grains in the diet of cows did not modify the production of embryos. However, the collected embryos of cows fed with canola in grain seem to be more resistant the vitrification of that those that it had not been

Key-words: Nelore, ω -6, ω -9, cryopreservation



INTRODUÇÃO

1.1 Introdução Geral

A reprodução é um dos principais fatores determinantes no sucesso da atividade de pecuária de corte, embora os índices reprodutivos dos rebanhos brasileiros se mantenham ainda baixos (Buttler, 2000). Atualmente, a área de reprodução bovina vem sendo explorada com maior intensidade, passando por mudanças e inovações biotecnológicas relevantes, resultado dos interesses de pesquisadores e criadores que visam difundir de forma rápida e lucrativa os materiais genéticos de alto potencial. Técnicas como a transferência de embriões (TE) e a fertilização *in vitro* (FIV) possibilitam o aumento dos índices reprodutivos das fêmeas, intensificando a seleção dos animais. A utilização e o desenvolvimento de biotecnologias da reprodução animal são condições indispensáveis para o aumento da eficiência produtiva dos rebanhos (Reichenbach *et al.*, 2002). Os marcadores genéticos, a formação de bancos de sêmen, óvulos, embriões e folículos, a sexagem do sêmen e de embriões, a clonagem e a própria transgenia são ferramentas disponíveis aos programas de melhoramento e conservação de recursos genéticos animais, embora ainda não sejam exploradas em larga escala (Rumpf, 2001).

Diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas a fim de enumerar os fatores associados ao desempenho reprodutivo dos animais, possibilitando a intervenção nos processos biotecnológicos. Nesse contexto, torna-se cada vez mais evidente a influência da nutrição como um dos fatores mais importantes para a expressão do potencial reprodutivo dos animais. No que se refere aos aspectos nutricionais, já se sabe que alguns deles estão envolvidos com o desempenho reprodutivo das fêmeas, como o teor de proteína bruta da dieta que, de acordo com Garcia-bajalil *et al.* (1994), pode afetar o tamanho do folículo pré-ovulatório; níveis de vitamina A que, segundo pesquisas realizadas por Shaw *et al.* (1995), promovem melhoria na qualidade dos embriões de vacas; e níveis de energia na dieta, que podem estimular o crescimento folicular (Nolan *et al.*, 1998). O aporte nutricional parece alterar a dinâmica folicular de diferentes maneiras. Alguns autores encontraram aumento no número de folículos pelo maior consumo de energia, tanto em ovinos como em bovinos não superovulados (Molle *et al.*, 1995; Gutiérrez *et al.*, 1997), enquanto outros autores verificaram que isso não se repetia em animais superovulados (Rigolon *et al.*, 2003).

Outro aspecto cujos pesquisadores têm dado enfoque é o teor de gordura influenciando a fertilidade dos animais (Staples *et al.*, 1998). A inclusão de gorduras na dieta tem sido extensamente estudada, visto que afeta a taxa de gestação, crescimento folicular, concentração de hormônios e produção de embriões (Willians, 1989), porém ainda são necessários estudos mais aprofundados sobre o efeito específico dos ácidos graxos poliinsaturados na reprodução.

A produção *in vitro* de embriões (PIV) vem apresentando avanços consideráveis e está sendo lentamente incorporada aos projetos de produção. Com o desenvolvimento do método de punção folicular, tornou-se possível a recuperação de oócitos de fêmeas vivas para FIV, abrindo novos caminhos para a multiplicação de animais de interesse econômico, superando os atuais índices da TE clássica, no que diz respeito à produção de bezerro/vaca/ano, esta técnica pode ser utilizada em animais jovens, gestantes ou lactantes e com problemas de infertilidade adquiridos (Tervit, 1996; Goodhand *et al.*, 1999; Malard *et al.*, 2001; Taneja *et al.*, 2000).

1.2 Fatores limitantes da produção *in vitro* de embriões

Apesar dos avanços obtidos, a PIV ainda apresenta algumas limitações, tais como os baixos índices de blastocisto, dificuldade na criopreservação dos embriões, menor viabilidade dos oócitos obtidos de bezerras em relação aos de vacas e novilhas e o custo do embrião que é mais alto do que um embrião de TE. Além disso, bezerros com maior peso ao nascer, período de gestação mais longo, aumento na incidência de abortos, aumento da mortalidade perinatal e aumento de anormalidades congênitas têm sido associados à prenhez produzidas por transferência de embriões produzidos *in vitro* (Leibfried-rutledge, 1987; Wagtendonk de Leew *et al.*, 1998).

A imprevisibilidade em assegurar que uma doadora em potencial produza número satisfatório de bons embriões em determinado período de tempo é aspecto limitante desta técnica. De acordo com Armstrong (1993), existe grande variabilidade na taxa de ovulação e na produção de embriões viáveis. Esse autor constatou que os altos custos de programas de FIV resultam de falhas na fertilização e degeneração embrionária em doadoras.

Apesar dos avanços alcançados pela técnica, os embriões produzidos *in vitro* ainda apresentam diferenças morfológicas e metabólicas daqueles produzidos *in vivo*, geralmente provocadas pelas condições de cultivo *in vivo* (Sá *et al.*, 2003). Essas alterações têm tornado os embriões de FIV mais sensíveis à criopreservação do que os obtidos *in vivo*, diminuindo a viabilidade a taxa de gestação (Holm *et al.*, 1998). Os embriões bovinos produzidos *in vitro*, em estágios iniciais de desenvolvimento, possuem grande quantidade de gotas lipídicas no interior do citoplasma, atribuída ao soro adicionado aos meios de cultivo (Tominaga *et al.*, 2000). Os blastômeros apresentam-se aumentados e o espaço perivitelínico diminuído (Holm *et al.*, 1998). Além disso, possuem citoplasma mais escuro, menor densidade, menor taxa de crescimento e maior sensibilidade térmica (Rizos *et al.*, 2001).

Evidências sugerem que a maior sensibilidade dos embriões de FIV ao congelamento esteja relacionada ao conteúdo elevado de lipídios contido nos mesmos. Estudos realizados com zigotos suínos, no quais foram removidas as gotas lipídicas do citoplasma, mostraram maior taxa de sobrevivência no pós-descongelamento. Tratamentos similares foram feitos em bovinos, obtendo-se resultados semelhantes (Holm *et al.*, 1998). De acordo com Twagiraumngu *et al.* (1997), a congelabilidade dos embriões de FIV está relacionada ao meio

de cultivo utilizado no processo. A maior quantidade de lipídios tem sido atribuída à presença de soro no meio de cultivo, influenciando, negativamente, a criopreservação desses embriões.

No intuito de explorar o potencial da FIV, diversas pesquisas vêm sendo realizadas a fim de enumerar os possíveis fatores que, de alguma forma, possam aperfeiçoar essa técnica, bem como, desenvolver metodologias para viabilizá-los. A nutrição diferenciada para animais incluídos em programas de FIV tem se mostrado eficiente em vários aspectos. Experimentos realizados com dietas ricas em ácidos graxos poliinsaturados, por exemplo, demonstraram aumento no número de folículos médios (Thomas e Willians, 1996).

1.3 Lipídios

Lipídios são compostos relativamente insolúveis em água e solúveis em solventes não-polares, como o éter dietílico e o clorofórmio. No plasma sanguíneo os lipídios podem originar-se de absorção intestinal da dieta, mobilização de lipídios de reserva em tecido adiposo ou processos sintéticos (Swenson e Reece, 1996). Os lipídios são produtores de mais energia, durante a metabolização, do que os carboidratos e proteínas (Grunert *et al.*, 2005).

A dieta dos ruminantes é suplementada com fontes de lipídios com o objetivo de aumentar a concentração de energia, melhorando o desempenho produtivo dos animais (Grunert *et al.*, 2005). A classificação básica desses compostos os separa em: ácidos graxos, triacilglicerídios, fosfolipídios, esfingolipídios, esteróides e prostaglandinas (Mattos *et al.*, 2000).

A hidrólise ácida dos triacilglicerídios leva aos correspondentes ácidos carboxílicos, chamados ácidos graxos, grupo mais abundante de lipídios nos seres vivos. Os ácidos graxos são classificados em saturados ou insaturados, dependendo da ausência ou presença de ligações duplas carbono-carbono. Ácidos graxos saturados não possuem duplas ligações, enquanto os insaturados as possuem em sua cadeia. A classificação dos ácidos graxos insaturados é baseada na localização da primeira dupla ligação em relação ao grupo metil final. O ácido linoléico, por exemplo, tem 18 carbonos e duas duplas ligações. Quando a primeira dupla ligação localiza-se no sexto carbono a partir do grupo metil final, este ácido graxo é classificado na família ômega 6. Da mesma forma, quando essa dupla ligação está localizada no terceiro carbono este ácido graxo é classificado na família ômega-3. Além disso,

o processamento dos ácidos graxos de uma família gera somente ácidos graxos da mesma família (Mattos *et al.*, 2000).

O ambiente ruminal é responsável por algumas transformações nos lipídios da dieta, alterando, com isso, sua composição e o perfil de ácidos graxos que chega ao duodeno devido aos processos de lipólise e biohidrogenação. A lipólise é a primeira etapa do metabolismo dos lipídios no rúmen, sendo necessária para a posterior reação de biohidrogenação (Franco, 2007).

A adição de lipídios na dieta pode ser oferecida com o uso de sementes de oleaginosas, como soja e canola. Essas sementes são bastante utilizadas pelas altas concentrações de lipídios e por apresentarem características desejáveis quanto à taxa de liberação do óleo, que ocorre à medida que o animal consome o alimento através da mastigação, chegando a pequenas frações ao rúmen (Coppock e Wilks, 1991). Sais de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa também são boas fontes de gordura que permitem aumentar a densidade energética da dieta sem deprimir a função microbiana ruminal, pode ainda evitar a hidrogenação ruminal dos ácidos graxos insaturados, principalmente o ácido linoléico (18:2) e linolênico (18:3) (Berchielli, 2006). Menos de 10% dos ácidos graxos poliinsaturados escapam da biohidrogenação no rúmen, fazendo com que cheguem ao intestino delgado, basicamente, ácidos graxos saturados, pequenas quantidades de ácidos graxos poliinsaturados e lipídios microbianos (Cavalieri *et al.*, 2005).

Os ácidos graxos são ácidos orgânicos que possuem de 4 a 24 átomos de carbono e um grupo carboxílico (Bondi, 1988). Nos animais vertebrados são obtidos a partir da síntese *de novo* do acetato ou absorvidos pelo intestino através da dieta. O produto final da síntese de ácidos graxos é o ácido palmítico (C16:0), que pode ser alongado para ácido esteárico (C18:0). Porém, nas células animais, para manter a estrutura, fluidicidade e função das membranas, são necessários ácidos graxos insaturados (Miles e Calder, 1998). Sendo assim, o metabolismo animal tem condições de adicionar uma dupla ligação no carbono 9, transformando o ácido esteárico (C18:0) em ácido oléico (C18:1) (Lehninger, 1995). Diferente dos animais, os vegetais podem inserir outras duplas ligações no carbono 9, transformando o ácido oléico em linoléico (ômega 6) e linolênico (ômega 3) (Teitelbaum e Walker, 2001). Por serem considerados essenciais esses ácidos graxos devem estar presentes na dieta dos animais. na célula animal, o ácido linoléico (C18:2) pode dar origem ao ácido dihomo- γ -linolênico (C20:3), precursor das prostaglandinas da série 1, ou ainda, ao ácido

araquidônico (C20:4), precursor da síntese de prostaglandinas da série 2 (Thatcher *et al.*, 1997). Já o ácido linolênico pode ser convertido em ácido eicosapentanóico (EPA), precursor da síntese de prostaglandinas da série 3 (Teitelbaum e Walker., 2001).

O produto final da hidrólise dos lipídios no rúmen são ácidos graxos livres, galactose e glicerol, os quais são rapidamente metabolizados até ácidos graxos voláteis. Os ácidos graxos poliinsaturados como o oléico e o linoléico são hidrogenados pelas bactérias ruminais, produzindo em primeiro lugar o ácido esteárico, o qual é completamente saturado apesar da maior parte dos ácidos graxos essenciais da ração ser destruída por hidrogenação, os ruminantes não parecem apresentar deficiência dos mesmos, levando à hipótese de que essa pequena quantidade que passa inerte pelo rúmen seja suficiente para atender as exigências (Bondi, 1988).

Segundo Oliveira *et al.* (2004), para reduzir a biohidrogenação e assim, aumentar a quantidade de ácidos graxos poliinsaturados que chegam ao intestino delgado é necessário fornecer dietas ricas nestes ácidos, mas também, dietas que elevem o pH ruminal. Palmquist e Jenkins (1980) citam que as bactérias celulolíticas, por serem as mais afetadas pela suplementação com gordura e diminuição do pH, sejam os microrganismos responsáveis pela biohidrogenação. Da mesma forma, estudos realizados por Harfoot e Hazlewood (1997), substituindo fibra por carboidrato de rápida degradação ruminal na dieta, verificaram redução nas taxas de lipólise de biohidrogenação, reafirmando a hipótese de ação dos microrganismos celulolíticos sobre o processo de biohidrogenação.

1.4 Canola: Fonte de ácidos graxos poliinsaturados

A canola (*Brassica napus* L. var *oleifera*) é uma oleaginosa que foi desenvolvida por melhoramento genético convencional da colza, grão que apresentava teores elevados de ácido erúico e de glicosinolatos (Tomm, 2006). Canola é um termo genérico internacional para *canadian oil low acid*, pois se difere da colza por apresentar uma porcentagem inferior a dois em ácido erúico, do total de ácidos graxos e menos que 3 mg/g de matéria seca em glicosinolatos (Bett *et al.*, 1999).

A semente da canola possui 38% de lipídios, em média, e 20% de proteína, em média (Rule, 1994). Os lipídios são compostos por 63% de ácido oléico, 20% de ácido linoléico, 8,6% de ácido linolênico e 4,7% de ácido palmítico (Downey, 2000).

Devido às altas taxas de biohidrogenação dos lipídios no rúmen, o fornecimento da canola na dieta de bovinos deve ser feito na forma de grãos, permitindo maior passagem de ácidos graxos não transformados para o duodeno, todavia, mesmo administrando grão, não pode ser totalmente garantida fornecimento de ácidos graxos, insaturados. (Coppock e Wilks, 1991).

1.5 Gordura e Reprodução

A adição de gordura nas dietas surgiu como alternativa à necessidade de incremento de consumo pelos animais, a fim de se ajustar às novas exigências nutricionais (Coscioni, 2005). A suplementação com gordura tem sido utilizada na tentativa de influenciar as vias metabólicas específicas e concentrações hormonais que possam modular diretamente os processos celulares ovarianos (Williams & Stanko, 1998). Segundo Funston (2004), essa gordura pode atuar em diversos tecidos como hipotálamo, hipófise, ovários e útero.

Embora a influência da gordura sobre a reprodução não esteja ainda totalmente elucidada, pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o intuito de desvendá-la. Esse manejo nutricional produziu dados conflitantes na literatura, pois se sabe que a adição de quantidades elevadas de gordura na dieta pode diminuir o consumo de alimentos, o que poderia gerar uma diminuição no consumo de energia total (Berchielli, 2006). A dieta dos ruminantes, especialmente dos bovinos, não deve apresentar grandes concentrações de gorduras porque haveria possibilidade de ocorrer distúrbios na digestão dos carboidratos, como também pelo efeito tóxico sobre os microrganismos do rúmen (Grunert *et al.*, 2005). Estudos realizados por Chilliard (1993) determinaram perda de peso em vacas suplementadas com gordura antes do pico de lactação.

Staples *et al.* (1998) afirmaram que muitos trabalhos desenvolvidos na interação das áreas de nutrição e reprodução vêm de estudos com objetivos nutricionais e não reprodutivos. Além disso, a maioria dos trabalhos não avalia o perfil de ácidos graxos que chega ao intestino delgado e à circulação sangüínea, embora alguns pesquisadores já tenham concluído que a gordura da dieta influencia a reprodução pelo perfil de ácidos graxos e não pelo aumento da energia consumida (Berchielli *et al.*, 2006).

Em decorrência da alta exigência nutricional de novilhas de corte no terço final da gestação e durante o início da lactação, o uso de suplementação baseada em lipídios para

suplementação pode ser adequado para se atingir a demanda de crescimento, lactação e reprodução pós-parto de vacas primíparas. A suplementação pré-parto com sementes de oleaginosas eleva a subsequente taxa de concepção de fêmeas primíparas de corte. Contudo, diferentes respostas no aspecto reprodutivo parecem ocorrer devido ao tipo de lipídio usado na suplementação, o que altera o fluxo duodenal de ácidos graxos insaturados e a composição de ácidos graxos no plasma (Berchielli, 2006).

Os principais mecanismos pelos quais a inclusão de gordura na dieta influencia as variáveis reprodutivas pode ser o aumento da concentração sanguínea de progesterona, hormônio fundamental na manutenção da gestação. Aswhort (1995) afirmou que a concentração circulante de progesterona modifica a quantidade e a composição dos polipeptídeos secretados pelo endométrio, muitos dos quais são responsáveis pelo desenvolvimento do embrião, também se relaciona diretamente com a qualidade do oócito (Sávio *et al.*, 1993, citados por Mcevoy *et al.*, 1995). O'Callaghan *et al.* (2000) também afirmaram que pequenas mudanças na concentração de progesterona no período inicial de desenvolvimento embrionário podem comprometer a sobrevivência do embrião. Esse aumento da progesterona, possivelmente, está relacionado com o aumento de colesterol na circulação, sendo o HDL-colesterol (lipoproteína de alta densidade ligada ao colesterol) a principal fração lipídica que estimula a síntese de progesterona (Willians, 1989).

O fornecimento de alimentos ricos em ácidos graxos poliinsaturados para vacas doadoras também pode se justificar pelo aumento na resistência dos embriões ao congelamento. Segundo Petit (2002), os ácidos graxos fornecidos na dieta poderiam aumentar a quantidade de ácidos graxos também na membrana das células embrionárias auxiliando, dessa forma, na diminuição das injúrias causadas pelos crioprotetores durante o processo de congelamento.

Segundo Staples *et al* (1996), o aumento da concentração de gordura na dieta (acima de 3% da matéria seca) tem influência positiva na reprodução de vacas. A resposta positiva inclui aumento da concentração plasmática de progesterona, aumento no tamanho do folículo ovulatório, aumento no número de folículos ovarianos, aumento ou diminuição na concentração de prostaglandina 2 α (PGF2 α) e, concomitantemente, um aumento na taxa de gestação. Ainda Staples *et al* (1998), destacaram quatro possíveis mecanismos de ação dos lipídios melhorando o desempenho reprodutivo: 1) melhoria no escore corporal; 2) aumento na esteroidogênese; 3) manipulação da insulina como estimuladora do desenvolvimento

folicular ovariano e 4) estimulação ou inibição da produção e liberação de $\text{PGF2}\alpha$, que influencia a persistência do corpo lúteo.

1.6 Ácidos Graxos e taxa de gestação

Diversos autores verificaram aumento na taxa de gestação de vacas que receberam suplementação de diferentes fontes de gordura na dieta. De Fries *et al.* (1996) utilizaram óleo de arroz como fonte de gordura em vacas Brahman e verificaram 91,5% de gestação nas vacas suplementadas e 71,4% naquelas que não o foram. Da mesma forma Sklan *et al.* (1991), trabalhando com óleo palmítico complexado com cálcio, observaram aumento na taxa de gestação nos animais suplementados. Petit *et al.* (1998) verificaram os efeitos da fonte de ácidos graxos ômega-6 (ácido linoléico) ou ômega-3 (ácido linolênico) na taxa de gestação. Verificaram taxa de 50% de gestação em vacas alimentadas com fontes de ácidos graxos ômega 9 e 6 e 89% de gestação naquelas alimentadas com ômega 3.

Ainda, Ambrose *et al.* (2006) observaram maiores taxas de gestação, em vacas inseminadas e alimentadas com linhaça em grãos comparadas com aquelas tratadas com semente de girassol. Os mesmos autores observaram, também o aumento no folículo ovulatório ao adicionar linhaça em grãos à dieta.

A suplementação com gordura estimula a síntese e o acúmulo de colesterol ligado a lipoproteínas e ésteres de colesterol nos tecidos e fluidos corporais, incluindo o ovário (Williams e Stanko, 1999). Em ruminantes a lipoproteína circulante predominante é a HDL, que é a única lipoproteína com acesso ao compartimento intrafolicular, independente da espécie (Caravaglios e Cilotti, 1957). Como o colesterol circulante é o substrato primário para a síntese de progesterona em mamíferos, a inclusão de gordura poderia propiciar um aumento na síntese de progesterona (Staples *et al.*, 1998).

Esse aumento na síntese de progesterona, possivelmente, está relacionado com o aumento de colesterol na circulação, sendo o HDL a principal fração lipídica estimuladora da síntese de progesterona na circulação (Williams, 1989). Seguindo a mesma hipótese, Mancio *et al.* (1999) também encontraram correlação positiva da concentração de colesterol total e HDL colesterol na concentração de progesterona. Com relação ao perfil dos ácidos graxos na dieta, Petit *et al.* (1998) demonstraram que vacas alimentadas com fontes de ácidos graxos

ômega-3 (grãos de linhaça) apresentaram menor concentração de colesterol total e HDL colesterol comparado aos animais que receberam fontes de ácidos graxos ômega-9 e 6, embora os animais suplementados com linhaça tenham apresentado maior taxa de gestação.

Aproximadamente 50% dos embriões de mamíferos morrem no início da gestação, e, muitas dessas mortes decorrem do mau funcionamento do corpo lúteo (Niswender *et al.*, 1994). Dessa forma, supõe-se que aumentos na concentração plasmática de progesterona estão associados a melhorias nas taxas de concepção de ruminantes (Staples *et al.*, 1998). Aswhort (1995) afirmou que a concentração circulante de progesterona modifica a quantidade e a composição dos polipeptídeos secretados pelo endométrio, muitos dos quais são responsáveis pelo desenvolvimento do embrião e também se relaciona diretamente com a qualidade do oócito.

1.7 Ácidos Graxos, crescimento folicular e produção de embriões

O padrão de crescimento folicular também pode ser potencializado como consequência do aumento de gordura na dieta. Thomas *et al.* (1997) concluíram que a suplementação com gordura na dieta regula diferencialmente o crescimento folicular, mediado por mudanças nas concentrações sanguíneas de insulina, HDL-colesterol, GH (hormônio do crescimento) e IGF-I (fator de crescimento semelhante à insulina) no fluido folicular. De acordo com Spicer e Echterkamp (1995), a insulina e IGF-I exercem efeito mitogênico e esteroidogênico nas células da granulosa. Moniaux *et al.* (1997) também afirmaram que o IGF-I atua como um amplificador dos receptores de FSH nas células da granulosa, potencializando a ação desse hormônio.

A adição de gordura, na dieta, eleva no número de folículos de tamanho médio ou ainda aumento do tamanho do folículo dominante (De Fries *et al.*, 1996). Thomas *et al.* (1997) forneceram dieta controle, dietas suplementadas com gordura saturada animal, ácidos graxos poliinsaturados (óleo de soja) e ácidos graxos altamente poliinsaturados (óleo de peixe). Observaram que o grupo alimentado com óleo de soja apresentou quatro vezes mais folículos médios do que o grupo controle, enquanto os demais grupos não apresentaram diferença expressiva.

Ryan *et al.* (1992) avaliaram o número de folículos responsivos ao tratamento superovulatório e o número e qualidade de embriões produzidos, fornecendo dietas com e sem

suplementação de óleo de soja. Observaram que aumentou o número de folículos médios, a concentração de colesterol total e a progesterona do líquido folicular de novilhas que receberam a suplementação. Todavia, não houve variação na resposta superovulatória e no número e qualidade de embriões produzidos. Esses resultados confirmam as hipóteses de Mihm e Austin (2002) que acreditam que este incremento no número de folículos recrutados pode ser explicado pelo aumento nos níveis plasmáticos e foliculares de HDL-colesterol provenientes do aumento na ingestão de gordura. O HDL-colesterol, livre nas células luteais da granulosa, estimularia a produção de IGF-I e outros fatores de crescimento. Segundo Monniaux *et al.* (1997), os fatores de crescimento modulam o crescimento, maturação e atresia folicular. Estes fatores são determinantes do desenvolvimento de folículos pequenos até que se tornem dependentes das gonadotrofinas.

Coscioni *et al.* (2002) realizaram uma pesquisa e verificaram que o número de embriões coletados por vaca leiteira foi maior nos animais alimentados com 8% de extrato etéreo. Todavia, Cavalieri *et al.* (2005b), observaram que a alteração do perfil de ácidos graxos da dieta, pela adição de linhaça em grãos (fonte de ômega-3) ou Megalac® (fonte de ômega-6), não alterou a qualidade e quantidade de embriões produzidos.

Pode-se verificar que a alteração na dinâmica folicular com a utilização na dieta de ácidos graxos poliinsaturados é acompanhada de mudanças nas concentrações sanguíneas de insulina, colesterol, GH e nas concentrações intrafoliculares de IGF-I e HDL-colesterol (Thomas *et al.*, 1997). Sabe-se que o desenvolvimento folicular, em diferentes espécies animais é controlado pelas gonadotrofinas da hipófise, além de esteróides produzidos pelos ovários e fatores de crescimento, produzidos nos ovários, e em outros órgãos sistêmicos (Ponchirolli, 2003). O desenvolvimento dos folículos ocorre em um padrão de ondas de crescimento e, em cada onda, ocorre a emergência de um folículo dominante. Essas ondas são precedidas por aumentos na secreção do FSH responsável pelo recrutamento dos folículos (Sunderland *et al.*, 1996). Porém, Webb *et al.* (1994), já demonstraram que outros fatores sistêmicos e locais influenciavam a função ovariana.

A insulina, nas células do ovário, estimula a proliferação das células da granulosa e a produção de progesterona. Em bovinos, verificou-se que o IGF-I, além de estimular a proliferação mitótica das células da granulosa, aumenta a produção de esteróides por essas células, induzida pelo FSH (Spicer *et al.*, 1993). Todavia, alguns estudos demonstram

correlação positiva ou negativa entre as concentrações de IGF-I e estradiol no fluido folicular (Spicer e Echterkamp, 1995).

1.8 Ácidos Graxos e Prostaglandinas

As gorduras também podem afetar os índices reprodutivos por mecanismos relacionados com a síntese e metabolismo de prostaglandina (Willians e Stanko, 1999). Os ácidos graxos de cadeia longa eicosapentanoico, docoexaenoico e seu precursor, o ácido linolênico (ômega-3), presentes na farinha de peixe, na canola e na linhaça, respectivamente, são precursores de prostaglandina da série 3. Entretanto, podem inibir a síntese de prostaglandinas da série 2, que são luteolíticas (Staples *et al.*, 1998). Dessa maneira, a inibição da síntese de prostaglandina, pela adição de gordura, com altas quantidades de ácidos graxos ômega-3, pode auxiliar a sobrevivência embrionária, pois manteria a integridade do corpo lúteo e a concentração de progesterona, podendo diminuir a mortalidade embrionária precoce (Mattos *et al.*, 2000).

As prostaglandinas são derivadas de ácidos graxos essenciais produzidos pelo organismo. Esses precursores são os ácidos 8,11,14-eicosatrienoico ou ácido di-omo-Y-linolênico, o ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico ou ácido araquidônico e o ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico (EPA). Desses precursores, o ácido araquidônico é o mais importante por originar a PGF2 α estando presente em maior quantidade no organismo animal e, principalmente, envolvido na reprodução (Neto, 1999).

A PGF2 α é que inicia a regressão do corpo lúteo. Quando ocorre a fecundação, o embrião sinaliza ao endométrio, impedindo a liberação de prostaglandina e a regressão do corpo lúteo (Hafez e Hafez, 2004). O ácido araquidônico e o ácido linoléico é quem regulam a síntese de PGF2 α (Thatcher *et al.*, 1997).

A adição de gordura na dieta aumentare/ou diminui a concentração da prostaglandina. A infusão de lipídios aumentou a concentração de progesterona e prostaglandina e encurtou o ciclo estral (Burke *et al.*, 1996). Da mesma forma, Lammoglia *et al.* (1997) detectou um aumento dos níveis de PGF2 α no plasma, após suplementar vacas Bhraman com gordura. Esses autores afirmaram que o aumento nas concentrações sanguíneas de ácido linoléico pode estimular a síntese de prostaglandina, já que o mesmo é precursor imediato do ácido araquidônico.

O ácido linoléico sofre dessaturação e alongação para formar o ácido araquidônico. As enzimas regulatórias essa conversão são a D-6-dessaturase e a cicloxigenase. O ácido linoléico, geralmente, compete com o ácido araquidônico com a cicloxigenase. Ele tem demonstrado efeitos inibitórios *in vivo* e *in vitro*. Assim, tem sido especulado que mudanças na síntese de prostaglandina pode explicar como a suplementação com gordura aumenta a função luteal e as taxas de gestação (Staples *et al.*, 1998).

1.9 Ácidos Graxos e Criopreservação de embriões

A criopreservação de embriões permite o aproveitamento de receptoras com estros naturais, reduzindo custos com a sincronização dos mesmos, além de permitir o transporte de embriões congelados e a programação de nascimentos adequada ao manejo de cada propriedade. Além disso, oferece condições de armazenamento dos embriões durante o período de teste de progênie e viabiliza a criação de bancos de embriões originados de animais geneticamente superiores (Ramos, 2006).

A técnica utilizada para congelar os embriões deve ser adequada já que os mesmos são pouco tolerantes às injúrias causadas pelo processo. O congelamento lento controlado tem sido a técnica mais utilizada, entretanto, os embriões produzidos *in vitro* são mais sensíveis a criopreservação, resultando em menores taxas de gestação (Ramos, 2006). Estes embriões apresentam diferenças morfológicas e metabólicas daqueles *in vivo*, geralmente, provocadas pelas condições de cultivo *in vitro* (Holm, 1998).

A taxa de gestação de embriões transferidos logo após a colheita é sempre superior a embriões congelados. Isso está diretamente relacionado com as lesões celulares que ocorrem durante o congelamento do embrião (Reichenbach *et al.*, 2002). As membranas celulares parecem ser o principal local lesado no resfriamento dos embriões. A fluidez da membrana determina a concentração de lesão durante o congelamento do embrião (Zeron *et al.*, 2001).

A membrana plasmática, devido a semipermeabilidade, mantém gradiente químico adequado de íons e outros componentes solúveis. Ela é composta de lipídios, proteínas e carboidratos, sendo os lipídios responsáveis pela integridade estrutural. A fluidez da membrana depende da temperatura, do conteúdo de colesterol, e de sua composição lipídica, sendo o comprimento e o grau de insaturação das cadeias de ácidos graxos de extrema importância. Os ácidos graxos saturados na membrana favorecem o estado rígido pela

interação das caudas hidrocarbonadas retas. Uma dupla ligação produz uma dobra na cauda, dificultando organização entre as cadeias (Alberts *et al.*, 1989, citado por Almeida, 2006). Todavia, de acordo com Darnell *et al.* (1990), a insaturação e o menor comprimento das cadeias lipídicas aumentam a fluidez dos ácidos graxos e, geralmente, lipídios com essas características passam pela fase de transição a temperaturas menores que aqueles com cadeias longas ou saturadas.

Alguns autores observaram uma relação íntima entre os ácidos graxos da membrana plasmática e a suscetibilidade das células de mamíferos a criopreservação. Imai *et al.* (1997) realizaram pesquisas adicionando ácido linoléico no meio de cultivo de embriões bovinos *in vitro* e observaram aumento de 28% na taxa de sobrevivência embrionária pós-descongelamento comparado aos embriões que não receberam ácido linoléico no meio de cultivo. Da mesma forma, Vam Soom *et al.* (2001) observaram aumento na resistência dos embriões bovinos ao congelamento, alterando o conteúdo de lipídios do meio de cultivo dos embriões. Mattos *et al.* (2000) relataram que a fonte de gordura da dieta dos animais pode alterar o perfil de ácidos graxos das membranas plasmáticas das células.

Cavalieri *et al.* (2005a) demonstraram que novilhas que receberam embriões de vacas alimentadas com linhaça apresentaram aumento na taxa de gestação, sugerindo que embriões congelados oriundos de doadoras suplementadas com linhaça em grãos podem ser mais resistentes a criopreservação que aqueles que não o foram.

Albuquerque *et al.* (2005) observaram que, os ácidos graxos da série n-3 e n-6, o tratamento de vacas com canola foi de 18,32% e 5,26% comparados aos testemunha (5,24% e 1,58%) e linhaça de 6,55% e 0,42%. Esses favoreceram a criopreservação dos embriões, pois a maior quantidade de ácidos graxos poliinsaturados na membrana plasmática eleva a fluidez da mesma (Stubbs e Smith, 1984). E, de acordo com Zeron *et al.* (2002), a maior fluidez aumenta a eficiência de troca da água intracelular pelo crioprotetor, favorecendo a proteção do embrião.

A maior sensibilidade dos embriões de FIV aos congelamento é devido a mudança, na estrutura embrionária, como menor número de células no embrioblasto, maior número de gotas de lipídios intracelulares e aumento da permeabilidade da zona pelúcida (Abe *et al.*, 1999; Diez *et al.*, 2001). Segundo Massip, (2001), com a sensibilidade dos embriões a mudança de temperatura aumenta com o aumento da quantidade de lipídios. Além disso, o

número de junções GAP nos embriões produzidos *in vitro* diminui, reduzindo o grau de compactação do embrioblasto e elevando a susceptibilidade dos embriões as crioinjúrias.

O congelamento bem sucedido de embriões de mamíferos, com resultados satisfatórios, ainda representa um desafio para os pesquisadores. Na criopreservação, os embriões são expostos a temperaturas muito baixas, quase imediatamente após o seu contato com a solução crioprotetora e são depositados em palhetas. As soluções concentradas de crioprotetores, necessárias para o procedimento, são bastante tóxicas, por isso, pode haver comprometimento da viabilidade do embrião (Galbinski, 2003). Alguns autores afirmam que a criopreservação por meio da vitrificação é mais eficiente do que o método convencional de congelamento lento para embriões de FIV (Reinders *et al.*, 1995).

A vitrificação tem se mostrado apropriada para conservar embriões de FIV, proporcionando taxas de sobrevivência dos embriões, maiores que as obtidas por congelamento lento. É uma técnica que pode ser realizada com contêiner de nitrogênio líquido e que requer pouco tempo para o resfriamento. Com a aplicação deste método, a necessidade de equipamento é menor, pois é possível obter considerável economia no custo do embrião transferido (Ramos, 2006). A vitrificação caracteriza-se por utiliza, solução altamente viscosa, congelamento rápido, pequenos volumes de solução e altas concentrações de crioprotetor. Com esse procedimento não se formam cristais de gelo intracelulares, responsáveis por graves injúrias ao embrião (Vajta *et al.*, 2000). Essa alternativa se tornou atrativa por ser relativamente rápida e de baixo custo, além de ter se mostrado benéfica para embriões com pequena taxa de sobrevivência a criopreservação, como aqueles produzidos *in vitro* (Campos-Chillón *et al.*, 2005).

Estudos mostram que a remoção do soro do meio de cultivo embrionário aumentou a resistência dos blastocistos à criopreservação. Abe *et al.* (2002) relatou que gotas lipídicas no citoplasma se acumularam em demasia em mórulas e blastocistos quando zigotos foram cultivados em meio com soro. A adição de ácido linoléico conjugado com albumina nos meios de cultivo resultou em embriões mais resistentes à criopreservação. Essa melhora possivelmente se deve às modificações na composição lipídica da membrana, facilitando a perda de água pela célula (Laowtammathron *et al.*, 2005). Da mesma forma Imai *et al.* (1997), verificaram que, adicionando ácido linoléico conjugado no meio de cultivo de embriões de FIV houve aumento na taxa de sobrevivência após a criopreservação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, H., OTOI, T.; TACHIKAW, S.. Fine structure of bovine morulae and blastocyst *in vivo* and *in vitro*. *Anatomy and Embriology*. v. 199, n. 16, p. 516-527, 1999.

ABE,H.; YAMASHITA, S.; SATOH, T.; HOSHI, H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different systems using serum-free or serum-containing media. *Mol. Reprod. Dev.*, v.61, p.57-66, 2002.

ALBUQUERQUE, K.P. Concentração de ácidos graxos no plasma sanguíneo e no líquido folicular de vacas suplementadas com linhaça ou canola em grãos. 2007. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringé, Maringá, 2007.

ALMEIDA, J.L. Efeito de diferentes concentrações de plasma seminal na criopreservação de sêmen eqüino. 2006. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)- Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária-Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

AMBROSE, D.J.; KASTELIC, J.P.; CORBETT, R.. Lower pregnancy losses in lactating dairy cows fed a diet enriched in α -linolenic acid. *Journal of Dairy Science*, v.89, p.3066-3074, 2006.

ARMSTRONG, D.T. Recent advances in superovulation of cattle. *Theriogenology*. v.39, p.7-23, 1993.

ASWORTH, C.J. Maternal and conceptus factors affecting historophic nutrition and survival of embryos. *Livestok Production Science*, v.44, p.99-105, 1995.

BERCHIELLI, T.T., PIRES, A.V., OLIVEIRA, S.G., Nutrição de Ruminantes. Cap. 17, p. 513-536, Funep, 2006.

BETT, V.; SANTOS, G.T.; AROEIRA, L.J.M. *Digestibilidade in vivo de cordeiros alimentados com canola em grão integral em diferentes formas*. In: REUNIÃO ANUAL DA

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 36., 1999. Porto Alegre. *Anais...Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Zootecnia, [1999] CD-Rom. Nutrição de Ruminantes.*

BONDI, A.A. *Nutricion animal. Zaragoza: Acribia, 1988. 546p.*

BUTLER, W.R. Effect of Protein Nutrition on Ovarian and Uterine Physiology in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science. v.81, n° 9, p. 2533-2539, 1998.*

BURKE, J.M.; CARROL, D.J.; ROWE, K.E. Intravascular infusion of lipid into ewes stimulates production of progesterone and prostaglandin. *Biol. Repr., v.55, p.169-175, 1996.*

CAMPOS-CHILLÒN, L.F.; WALKER, D.J.; DE LA TORRE-SANCHEZ, J.F.; SEIDEL JR, G.E. In vitro assessment of a direct transfer vitrification procedure for bovine embryos. *Theriogenology. v.65, p.1200-1214, 2006.*

CARAVAGLIOS, R.; CILOTTI, R. A study of the proteins in the follicular fluido f the cow. *Endocrinology. v.15, p.273-279, 1957.*

CAVALIERI, F.L.B.; SANTOS, G.T.; PETIT, H.. Taxa de gestação de novilhas alimentadas com duas fontes de gordura (Megalac® ou linhaça em grão) na dieta recebendo embriões congelados de vacas leiteiras alimentadas com LAC-100 ou linhaça em grão. *Acta Scientiae Veterinariae (Suplemento 1) n.33, p.216, 2005a.*

CAVALIERI, F.L.B.; SANTOS, G.T.; PETIT, H.. Efeito de duas fontes de gordura (Megalac® ou linhaça em grão) na dieta na produção de embriões em vacas leiteiras da raça Holandesa. *Acta Scientiae Veterinariae (Suplemento 1) n.33, p.217, 2005b.*

CHILLIARD, Y. Dietary fat and adipose tissue metabolism in ruminants, pigs, ad rodents: A review: *Journal of Dairy Science, v.76, p.3897, 1993.*

COPPOCK, C.E., WILKS, D.L. Supplemental Fat in High-Energy Rations for Lactating Cows: Effects on Intake, Digestion, Milk Yield, and Composition. *Journal of Animal Science*, v. 69, p.3826-3837, 1991

COSCIANI, A.C.; PEGORARO, L.M.C.; DURR, J.C. et al., Effect of supplemental fat on superovulatory response embryo quality in jersey cow. *Theriogenology*, v.57, n.1, p.537, 2002.

COSCIANI, A.C.; PEGORARO, L.M.C.; PIMENTEL, C.A.; FISHER, V.; SANTOS, J.E.P.; STUMPF JÚNIOR, W. Diferentes níveis de gordura na dieta de vacas Jersey em lactação influenciam a resposta superovulatória? *Ciência Rural*, Santa Maria, v.35, n.3, p.644-649, 2005.

DARNELL, J.; LODISH, H.; BALTIMORE, D. *The plasma membrane*. In: Molecular cell biology. 2.ed. New York: Scientific American Books, 1990. cap.13, p. 491- 530.

DE FRIES, C.A., NEUENDORFF, D.A., RANDEL, R.D. Fat supplementation influences postpartum reproductive performance in Brahman cows. *Journal of Animal Science*. v.36, p. 864-870, 1996.

DIEZ, C.; NEYMAN, Y.; LEBOURHIS, D.. Delipidating *in vitro* produced bovine zygote: Effect on further development and consequences for freazability. *Theriogenology*. v.56, p.923-936, 2001.

DOWNEY, R.K. Canola: a quality brassica oilseed. In: Advances in new crops, 1990. Disponível em: < <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/proceedings> >. Acesso em: 05 jan. 2008.

FRANCO, G.L.; DAVY, F.C.A. *Interação entre nutrição e reprodução em vacas de corte*. In: OLIVEIRA, R.L.; BARBOSA, M.A.A. Bovinocultura de corte: desafios e tecnologias. Salvador: EDUFBA, 2007. Cap.2, p.82-112.



FUNSTON, R.N. Fat supplementation and reproduction in beef females. *Journal of Animal Science*. v.82, n.13, Suppl.1, p.E154-161, 2004.

GALBINSKI, S., BOS-MIKICH, A., FERRARI, A.N. Viabilidade e Fertilização *in vitro* de Oócitos Bovinos após Vitriificação. *RBGO*. v.25, n.8, p.553-559, 2003.

GARCIA-BAJALIL, C.M., STAPLES, C.R., THATCHER, W.W. Protein Intake and Development of Ovarian Follicles and Embryos of Superovulated Nonlactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*. v.77, nº 9, p. 2537-2548, 1994.

GOODHAND, K.L., WATT, R.G.; STAINES, M.E.. *In vivo* oocyte recovery and *in vitro* embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. *Theriogenology*, v.51, p.951-961, 1999.

GRUNERT, E.; BIRGEL, E.H.; VALE, W.G.; BIRGEL JÚNIOR, E.H. Patologia e Clínica da Reprodução dos Animais Mamíferos Domésticos – Ginecologia. São Paulo: Varela, 2005.

GUTIÉRREZ, C.G.; OLDHAM, J.; BRAMLEY, T.A. . The recruitment of ovarian follicles is enhanced by increased dietary intake in heifers. *Journal of Animal Science*, v.75, p. 1876-1884, 1997.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. Reprodução Animal. 7 ed. São Paulo: Manole, 2004.

HARFOOT, C.G.; HAZLEWOOD, G.P. *Lipid metabolism in the rumen*. In: Hobson P N et Stewart CS (eds). The rumen microbial ecosystem. Blackie Academic, 1997, p.382-426.

HOLM, P.; CALLESEN, H. *In vivo* versus *in vitro* produced bovine ova: similarities and differences relevant for practical application. *Reprod. Nutr. Dev.* v.38, p.579-594, 1998.



IMAI, K.; KOBAYASHI, S.; GOTO, Y.. Cryopreservation of bovine embryos obtained by *in vitro* culture of ivm-ivf oocytes in the presence of linoleic-acid albumin. *Theriogenology*, v.47, p.347, 1997.

LAMMOGLIA, M.A.; WILLARD, S.T.; HALLFORD, D.M.. Effects of dietary fat follicular development and circulating concentration of lipids, insulin, progesterone, estradiol 17 b, 13, 14-dihydro-15-keto-prostaglandin f2 α and growth hormone in estrus cyclic Brahman cows. *J. Anim. Sci.*, v.75, p.1591-1600, 1997.

LAOWTAMMATHRON, C.; LORTHONGPANICH, C.; KETUDAT-CAIRNS, M.; HOCHI, S.; PARNPAI, R. Factors affecting cryosurvival of nuclear-transferred bovine and swamp buffalo blastocysts: effects of hatching stage, linoleic acid-albumin in IVC médium and Ficoll supplementation to vitrification solution. *Theriogenology*. v.64, p.1185-1196, 2005.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Princípios de Bioquímica. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 1995, 839p.

LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; CRITSER, E.S.; EYESTONE, W.H.; NORTHEY, D.L.; FIRST, N.L. Development potential of bovine oocytes matured in vitro or in vivo. *Bio. Reprod.* v.36, p.376-383, 1987

MALARD, P.F., PEIXER, M.A.S., MARQUES JUNIOR, A.P., RUMPF, R. Índice de recuperação e qualidade de ovócitos de bezerra Nelore, superovuladas e não superovuladas, de dois a três meses de idade. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v.53, nº 6, p. 677-682, 2001.

MANCIO, A.B., LONDONO-HERNANDEZ, F.I., FONSECA, F.A.. Fontes lipídicas dietéticas associadas ou não a gonadotrofina coriônica humana (HCG) na função reprodutiva e no metabolismo de lípidos de novilhas. *Arq. Bra. Vet. Zootec.* v.51, n.2, p.163-170, 1999.



MASSIP, A. Cryopreservation of embryos of farm animals. *Reprod. Dom. Anim.* v.36, p.49-55, 2001.

MATTOS, R., STAPLES, C.R., THACTHER, W.W. Effects of dietary on reproduction in ruminants. *Reviews of Reproduction.*, v.5, p.38-45, 2000.

McEVOY, T.G.; ROBINSON, J.J.; AITKEN, R.P. et al. Dietary-induced suppression of pre-ovulatory progesterone concentrations in superovulated ewes impairs the subsequent in vivo and in vitro development of their ova. *Anim. Reprod. Sci.*, v.39, n.2, p.89-107, 1995.

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

MILES, E.A.; CALDER, P.C. Modulation of immune function by dietary fatty acids. *Society. Production and Nutrition*, v.57, p. 277-292. 1998.

MOLLE, G.;BRANCA, A.; LIGIOS, S. et al. Effect of grazing background and flushing supplementation on reproductive performance in Sarda ewes. *Small Ruminant. Reserch*, v.17, p.245-254, 1995.

MONNIAUX, D.;MONGET, P. BESNARD, N. HUET, C.; PISSELET, C. Growth factors and antral follicular development in domestic ruminants. *Theriogenology*. v.47, p.3-12, 1997.

NETO, J.P. *Prostaglandinas*. In. *Farmacologia aplicada a medicina veterinária*. São Paulo: Guanabara Koogan, 1999.

NISWENDER, G.D.; NETT, T.M. *Corpus luteum and its control in infraprimate species*. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. *The Physiology of Reproduction*. 2 ed, New York: Raven Press Ltda, 1994, 781p.

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

O'CALLAGHAN, D.; YAAKUB, H.; HYTTEL, P. Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition hormone concentration in ewes. *J. Reprod. Fert.*, v.118, p.303-313, 2000.

OLIVEIRA, S.G.; SIMAS, J.M.C.; SANTOS, F.A.P. Main aspects related to changes in the profile of fatty acids in ruminant milk fat. *Archives of Veterinary Science*, .9, n.1, p.73-80, 2004.

PALMQUIST, D.L.; JENKIS, T.C. Fat in lactation rations. *Journal of Dairy Science*, v.63, p.1-14, 1980.

PETIT, H.V.; DEWHURST, J.G.; PROULX, J.G., et al. Milk yield and reproduction of dairy cows fed saturated or unsaturated fat. *Journal of Dairy Science*, v.81, p.302, 1998.

PETIT, H.V. Digestion, milk composition, and blood composition of dairy cows fed whole flaxseed. *Journal Dairy Science*, v.85, p.1482-1490, 2002.

PONCHIROLLI, C.B. Influência dos fatores de crescimento no desenvolvimento folicular. 2003. Monografia (Pós-graduação em Medicina Veterinária)-Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

RAMOS, A.A., POLISSENI, J., SÁ, W.F., FERREIRA, ADEMIR, A.M., CAMARGO, L.S.A., FOLHADELLA, D.S., NOGUEIRA, L.A.G. Efeito do transporte no desenvolvimento

de embriões de bovinos cultivados *in vitro* a fresco ou reaquecidos após vitrificação. *Revista Brasileira de Zootecnia*. v.35, nº 6, 2006.

REICHENBACH, H.D.; OLIVEIRA, M.A.L.; LIMA, P.F. Transferência e criopreservação de embrião bovino. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. São Paulo: Varela, 2002. 560p.

REINDERS, J.M.C.; WURTH, Y.A.; KRUIP, T.A.M. From embryo to a calf after embryo transfer, a comparison of *in vivo* and *in vitro* produced embryos. *Theriogenology*. v.43, p.306 (abstract), 1995.

RIGOLON, L.P.; PRADO, I.N.; CAVALIERI, F.L.B. Efeito de diferentes níveis de energia sobre a produção e viabilidade de embriões em novilhas e vacas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.32, p. 1304-1310, 2003.

RIZOS, D.; WARD, F.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Effect of culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification. *Theriogenology*. v.56, p.1-16, 2001.

RULE, D.C.,BUSBOOM, J.R., KERCHER, C.J. Effect of Dietary Canola on Fatty Acid Composition of Bovine Adipose Tissue, Muscle, Kidney, and Liver. *Journal Animal Science*. v.72, p. 2735-2744, 1994.

RUMPF, R., DODE, M.A.N., FELICIANO SILVA, A.E.D. *Avanços na Biotecnologia da Reprodução de Bovinos*. In: III SIMPÓSIO NACIONAL DE MELHORAMENTO ANIMAL p. 248-253, 2001.

RYAN, D.P.; SPOON, R.R.; WILLIAMS, G.L. *Ovarian follicular characteristics, embryo recovery, and embryo viability* in heifers fed high-fat diets and treated with follicle-stimulating hormone. *J. Anim. Sci.*, v.70, p. 3505-3513, 1992.

SÁ, W.F.; VIZCARRA, V.E.L.; FERREIRA, A.M.; CAMARGO, L.S.A.; ARAÚJO, M.C.C. Desenvolvimento pós-fecundação de oócitos bovinos pré-maturados em fluido folicular. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.55, n.3, 2003.

SHAW, D.W.; FARIN, P.W.; WASHBURN, *Effect of Retinol palmitate rate and embryo quality* in superovulated cattle. *Theriogenology*. v.44, p.51-58, 1995

SKLAN, D.; MOALLEM, U.; FOLMAN, Y. Effects of feeding calcium soaps of fatty acids on production and reproductive responses in high producing lactating cows. *Journal of Dairy Science*. v.74, p.510-517, 1991.

SPICER, L.J. et al. Effects of insulin, insulin-like growth factor-1 and gonadotropins on bovine granulosa cells proliferation, progesterone production, estradiol production, and (or) insulin-like growth factor-1 production *in vitro*. *Journal Animal Science*. v.71, p.1232-1241, 1993.

SPICER, L.J.; ECHTERNKAMP, S.E. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. *Dom. Anim. Endocr.*, n.12, p.223-245, 1995.

STAPLES, C.R.; THATCHER, W.W.; BURKE, J.M. Influence of supplemental fat on reproductive tissues of the dairy cow. *Journal of Dairy Science*, v.79, 1996.

STAPLES, C.R.; BURKE, J.M.; THATCHER, W.W. *Influence of supplemental fats on reproductive tissues and performance of lactating cows*. In: SYMPOSIUM: OPTIMIZING ENERGY NUTRITION FOR REPRODUCING DAIRY COWS. *Journal of Dairy Science*, v.81, n.3, p.856-871, 1998.

STUBBS, C.D.; SMITH, A.D. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochimistry and Biophysic Acta*, v.779, p.89-137, 1984.

SUNDERLAND, S.J.. Alterations in intrafollicular levels of different molecular mass forms of inhibin during development of follicular and luteal-phase dominant follicles in heifers. *Biology of Reproduction*. v.54, p.453-462, 1996.

SWENSON, M.J.; REECE, W.O. Dukes, Fisiologia dos Animais Domésticos. 11.ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 1996.

TANEJA, M.; BOLS, P.E.J.; VELDE, V. Development competence of juvenile calf oocytes *in vitro* and *in vivo*: influence of donor animal, variation and repeated gonadotropin stimulation. *Bio. Reprod.*, v.62, p.206-213, 2000.

TEITELBAUM, J.; WALKER, W.A.. Review: the role of omega 3 fatty acids in the intestinal inflammation. *J. Nutr. Bioch.* v.12, p. 21-32, 2001.

TERVIT, H.R. Laparoscopy/laparotomy oocyte recovery and juvenile breeding. *Animal Reproduction Science*, v.42, p.227-238, 1996.

THATCHER, W.W.; BINELLI, M.; BURKE, J.;. Antiluteolytic signals between the conceptus and endometrium. *Theriogenology*, v.47, p. 131-140, 1997.

THOMAS, M.G., WILLIAMS, G.L. Metabolic hormone secretion and FSH-induced superovulatory responses of beef heifers fed dietary fat supplements containing predominantly saturated or polyunsaturated fatty acids. *Theriogenology*. v.45, p.451-458, 1996.

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

TOMINAGA, K.; HAMADA, Y.; YABUUE, T.; ARIYOSHI, T. Effect of linoleic acid-albumin on post-thaw survival of in vitro-produced bovine embryos at the 16-cell stage. *J. Vet. Med. Sci.* v.62, p. 465-467, 2000.

TOMM, G.O. Canola: alternativa de renda e beneficios para os cultivos seguintes. *Revista Plantio Direto*, v.15, n.94, p.4-8, jul./ago. 2006

TWAGIRAUMNGU, H.; MORIN, N.; BORDIGNON, V.; SMITH, L.C.; BOUSQUET, D. Influence of serum in culture system on the production and cryopreservation of in vitro-derived bovine embryos, *Theriogenology*. v.47, p.356 (abstract), 1997.

VAJTA, G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim. Reprod. Sci.* v.60-61, p.357-364, 2000.

VAN SOOM.; MAHMOUDZADEH, A.R.; CHRISTOPHE, A. Silicone oil used in microdrop culture can affect bovine embryonic development and freeability. *Reproduction in Domestic Animals*, v.36, n.3-4, p.169-176, 2001.

WAGTENDONK DE LEEUW VAN, A.M., AERTS, B.J.G.; DEN DAAS, J.H.G. Abnormal offspring following in vitro production of bovine preimplantation embryos: a field study. *Theriogenology*, v.49, p.883-894, 1998.

WEBB, R. et al., Role of growth hormone and intrafollicular peptides in follicle development in cattle. *Theriogenology*, v.41, p.25-30, 1994.

WILLIAMS, G.L. Modulation of luteal activity in postpartum beef cows through changes in dietary lipid. *Journal of Animal Science*. v.67, p.785-793, 1989.



WILLIAMS, G.L.; STANKO, R.L. Dietary fats as reproductive nutraceuticals in beef cattle. *Proceedings of the American Society of Animal Science*, p. 1-12, 1999.

ZERON, Y., OCHERETNY, A., KEDAR, O., BOROCHOV, A., SKLAN, D., ARAV, A. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. *Reproduction*, v.121, p. 447-454, 2001.

ZERON, Y.; TOMCZAK, M.; CROWE, J. et al. The effect of liposomes on thermotropic membrane phase transitions of bovine spermatozoa and oocytes: implications for reducing chilling sensitivity. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.45, p.143-152, 2002.



VIABILIDADE DE EMBRIÕES VITRIFICADOS
RESULTANTES DA FERTILIZAÇÃO *in vitro* DE OÓCITOS DE
VACAS SUPLEMENTADAS COM CANOLA EM GRÃO

Autor: Maria Cecília Nunes Domingues

(Autor para correspondência)

R: João Pessoa, 374, Jd. São Francisco, Campinas-SP. CEP: 13 105-172

cicavet@hotmail.com

19-32581257

Orientador: Prof. Dr. Luiz Paulo Rigolon

rigolon@wnet.com.br

44-30316301

RESUMO

Produção de oócitos em vacas suplementadas com canola em grão e a resistência dos embriões resultantes da fertilização *in vitro* à vitrificação.

Avaliou-se a produção de oócitos e embriões de vacas Nelore produzidos *in vitro*, bem como a resistência à vitrificação, quando os animais foram suplementados com grãos de canola. Foram utilizadas 12 vacas Nelore, com idade média de 4 anos e peso médio de 500 Kg de peso vivo, provenientes do mesmo grupo genético, distribuídas em dois grupos: 1 = Controle (n=6) e 2 = suplementados com grãos de Canola (n=6). Os animais passaram por um período de adaptação de 15 dias, recebendo silagem de milho e concentrado, sendo que o grupo 2 recebeu 2 kg de canola em grão/dia. Na sequência os ovários das vacas foram aspirados (OPU), para padronizar as ondas foliculares, sendo desprezada e em seguida, foram realizadas mais quatro aspirações em cada animal, com intervalo de quinze dias, para obtenção de óocitos suficientes para fecundação *in vitro*. Os oócitos foram quantificados e classificados em viáveis ou inviáveis. A seguir realizou-se a maturação e fecundação. Após a realização da fertilização, os zigotos foram cultivados *in vitro* e decorridas 48 horas, avaliou-se a taxa de clivagem. Foram realizadas duas outras avaliações, nos estágios de mórula (8 células) e blastocisto inicial. Não houve diferenças ($p>0,05$) no número de oócitos viáveis, taxa de clivagem e taxa de blastocisto em função do tratamento. A taxa de re-expansão após o descongelamento, mas foi influenciada pela canola ($P>0,05$) todavia, houve diferença significativa ($p<0,05$) para a taxa de eclosão. A adição de canola em grãos na dieta de vacas não alterou a produção de embriões. Entretanto, os embriões coletados de vacas alimentadas com canola em grão foram mais resistentes à vitrificação que aqueles que não o foram.

PALAVRAS-CHAVES: Nelore, ômega-6, ômega-9, criopreservação, embrião.

ABSTRACT

Effect of supplementation with grain canola on oocyte and embryo production derived from Nelore cows FIV, and the effect on the embryo vitrification resistance.

The evaluated production of oocytes and embryos of Nelore cows produced *in vitro*, as well as the resistance of these embryos the vitrification, when these animals had been supplemented with grains of canola (n-9 and n-6). 12 Nelore cows had been used, with average age of 4 years and 500 kg average weight, proceeding from the same genetic group distributed in two groups: Treatment 1 = control and Treatment 2 = canola. Before the beginning of the experimental period, the animals they had passed for a period of adaptation of 15 days having received silage and the concentrate, being that 2 treatment 2 kg received from canola in grain. After 15 days the ovaries of the cows had been ovum pick up (OPU), to standardize the follicular waves. This first aspiration was rejected and after that four aspirations in each animal had been carried through more, with interval of fifteen days, for attainment of enough oocytes for fertilization *in vitro*. The oocytes had been quantified and classified in viable or impracticable. To follow it was become fulfilled maturation and fertilization. After the accomplishment of the fertilization, the zygotes had been cultivated *in vitro* and passed 48 hours, it was evaluated cleavage rate. Two other evaluations had been carried through, in the periods of training of morula (8 cells) and early blastocyst. It didn't have differences ($p>0,05$) for the number of viable oocytes, cleavage rate and blastocyst rate in function of the treatment. The treatments had not differed ($p>0,05$) for the re-expansion rate after vitrification and unfreeze, however it had significant difference ($p=0,057$) for the hatching rate. The addition of canola in grains in the diet of cows did not modify the production of embryos. However, the collected embryos of cows fed with canola in grain seem to be more resistant the vitrification of that those that it had not been

KEY-WORDS: Nelore, ω -6, ω -9, cryopreservation



INTRODUÇÃO

Atualmente, a área de reprodução bovina vem sendo explorada com maior intensidade, passando por mudanças e inovações biotecnológicas relevantes, resultado dos interesses de pesquisadores e criadores que visam difundir de forma rápida e lucrativa os materiais genéticos de alto potencial. Técnicas como a transferência de embriões (TE) e a fertilização *in vitro* (FIV) possibilitam o aumento dos índices reprodutivos das fêmeas, intensificando a seleção dos animais (Reichenbach *et al.*, 2002).

Diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas a fim de enumerar os fatores associados ao desempenho reprodutivo dos animais, possibilitando a intervenção nos processos biotecnológicos. A nutrição é importante fator na reprodução dos animais, destacando-se o teor de proteína bruta da dieta (Garcia-Bajalil *et al.*, 1994); níveis de vitamina A (Shaw *et al.*, 1995) e níveis de energia na dieta (Nolan *et al.*, 1998).

O aumento no consumo da energia elevou o número de folículos em ovinos e bovinos não superovulados (Molle *et al.*, 1995; Gutiérrez *et al.*, 1997). Enquanto Rigolon *et al.* (2003) verificaram que isso não se repetia em animais superovulados. Staples *et al.* (1998) Enfatizaram o teor de gordura na melhoria da fertilidade dos animais. As gorduras na dieta interferem na taxa de gestação, crescimento folicular, concentração de hormônios e produção de embriões (Williams, 1989), porém ainda são necessários novos estudos.

De acordo com Armstrong (1993), existe grande variabilidade na taxa de ovulação, e na produção de embriões viáveis. Diante desse contexto, Muller (2003) apontou os benefícios do uso de fontes ricas em ácidos graxos poliinsaturados, como a canola (ácido linoléico n-6), no aumento do número de embriões viáveis. Resultados semelhantes foram encontrados por Capovilla *et al.* (2006), suplementando ovelhas Santa Inês com Lac 100® (ácido linoléico n-6), quando também obtiveram maior número de embriões viáveis nas fêmeas suplementadas. Thomas e Williams (1996), utilizando dietas ricas em ácidos graxos poliinsaturados, demonstraram aumento no número de folículos médios.

Apesar dos avanços na produção de embriões *in vitro* ainda apresentam diferenças morfológicas e metabólicas daqueles produzidos *in vivo*, gerados pelas condições de cultivo *in vivo* (Sá *et al.*, 2003). Essas alterações têm tornado os embriões de FIV mais sensíveis a criopreservação que os obtidos *in vivo*, diminuindo a viabilidade após o descongelamento e a taxa de gestação (Holm *et al.*, 1998). Os embriões bovinos produzidos *in vitro*, nos estágios iniciais, possuem grande quantidade de gotas lipídicas no interior do citoplasma, atribuída ao soro adicionado aos meios de cultivo (Tominaga *et al.*, 2000). Os blastômeros apresentam-se aumentados e o espaço perivitelínico diminuído (Holm *et al.*, 1998). Além disso, possuem citoplasma mais escuro, menor densidade, menor taxa de crescimento e maior sensibilidade térmica (Rizos *et al.*, 2001).

Evidências sugerem que esta maior sensibilidade dos embriões de FIV ao congelamento esteja relacionada ao conteúdo elevado de lipídios contido nos mesmos. Estudos realizados com zigotos suínos, nos quais foram removidas as gotas lipídicas de seus citoplasma, mostraram maior taxa de sobrevivência pós-descongelamento. Tratamentos similares foram feitos em bovinos, obtendo-se resultados semelhantes (Holm *et al.*, 1998). De acordo com Twagiraumngu *et al.* (1997), a congelabilidade dos embriões de FIV está relacionada ao meio de cultivo utilizado no processo. A maior quantidade de lipídios tem sido atribuída à presença de soro no meio de cultivo, influenciando negativamente a criopreservação desses embriões. Estudos mostram que a remoção do soro do meio de cultivo embrionário aumentou a resistência dos blastocistos à criopreservação. Abe *et al.* (2002) relataram que gotas lipídicas no citoplasma se acumularam em demasia em mórulas e blastocistos quando zigotos foram cultivados em meio com soro. A adição de ácido linoléico conjugado com albumina nos meios de cultivo resultou em embriões mais resistentes ao processo de criopreservação. Essa melhora possivelmente se deve às modificações na composição lipídica da membrana, facilitando a perda de água pela célula (Laowtammathron *et al.*, 2005).

Cavalieri *et al.* (2005a) demonstraram que novilhas que receberam embriões de vacas alimentadas com linhaça apresentaram aumento na taxa de gestação, sugerindo que embriões congelados oriundos de doadoras suplementadas com linhaça em grãos podem ser mais resistentes ao processo de criopreservação em relação àqueles que não o foram. Autores observaram uma relação íntima entre os ácidos graxos da membrana plasmática e a susceptibilidade das células de mamíferos ao processo de criopreservação. Imai *et al.* (1997)

realizaram pesquisas adicionando ácido linoléico no meio de cultivo de embriões bovinos *in vitro* e observaram aumento de 28% na taxa de sobrevivência embrionária pós-descongelamento comparado aos embriões que não receberam ácido linoléico no meio de cultivo. Da mesma forma, Vam Soom *et al.* (2001) observaram aumento na resistência dos embriões bovinos ao congelamento alterando o conteúdo de lipídios do meio de cultivo dos embriões. Mattos *et al.* (2000) relataram ainda que, a fonte de gordura da dieta dos animais pode alterar o perfil de ácidos graxos das membranas plasmáticas das células.

Este trabalho foi realizado com objetivo de avaliar o efeito da suplementação de canola em grão na produção de oócitos de vacas Nelore, fertilização dos mesmos em laboratório e resistência destes embriões à vitrificação.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em parte na Fazenda Três Corações, de propriedade da Agropecuária Ipê, município de Mandaguaçu, estado do Paraná, de abril a junho de 2007. Foram utilizadas 12 vacas da raça Nelore, Puro de Origem, com idade média de 4 anos, peso médio de 500 kg de peso vivo e escore corporal três (escala de 1 a 5). As vacas foram alojadas em piquetes com 150 m² e separadas em dois tratamentos: 1 = Controle (n=6) e Tratamento 2 = suplementadas com canola em grão (n=6). As vacas foram tratadas previamente com Ivermectina 1% (Ivomec, Merial®), e passaram 15 dias recebendo silagem de milho e o concentrado.

As dietas (Tabela 1) foram fornecidas na forma de ração total misturada duas vezes ao dia, sendo uma às 08h00min e a outra às 16h00min. Diariamente, pela manhã, antes da distribuição da ração, era realizada a limpeza dos comedouros e observado se existia um mínimo de 5% de alimentos.

As análises bromatológicas foram feitas pela empresa Multimix Nutrição Animal Ltda e a maturação dos oócitos, a FIV e o cultivo e avaliação dos embriões realizaram-se no Centro de Biotecnologia da Reprodução BIOTEC – CESUMAR.

Tabela 1. Composição percentual dos ingredientes das dietas experimentais (% / base matéria seca)

Alimentos (%)	Tratamentos	
	T1 – Controle	T2 – Canola
Silagem de milho	60,00	60,00
Milho grão moído	31,72	29,95
Farelo de soja	7,16	1,95
Canola em grão	-	8,00
Sal mineral	1,13	1,10
Total	100,00	100,00
Composição (%)		
PB ¹	11,10	11,00
NDT ²	68,74	67,95
FDN ³	41,64	41,00
EE ⁴	1,93	6,68
Ca ⁵	0,42	0,43
P ⁶	0,28	0,25

¹Proteína Bruta, ²Nutrientes Digestíveis Totais, ³Fibra detergente neutro, ⁴ Extrato etéreo, ⁵Cálcio, ⁶ Fósforo

Decorridos 15 dias de adaptação, os ovários das vacas foram aspirados (OPU), para padronizar as ondas foliculares que foi desprezada. Em continuidade foram realizadas mais 4 aspirações em cada animal, com intervalo de 15 dias, para obtenção de óocitos suficientes para fecundação *in vitro*. Os oócitos foram quantificados e classificados como viáveis ou inviáveis, sendo os viáveis aqueles com presença de cumulus e ooplasma homogêneo e os inviáveis aqueles desnudos ou picnóticos, heterogêneos e com vesículas apoptóticas.

A maturação foi realizada em TCM199 com sais de Earles, glutamina e NaHCO₃, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 22 µg/mL piruvato, 50 µg/ml de gentamicina, 0,5 µg de FSH/mL, 50 µg de LH/mL e 1 µg de estradiol/ml, mantidos em estufa, a 39°C, 5% de CO₂ em ar com máxima umidade durante 22-24 horas. Os oócitos foram colocados em microgotas de 90µL de meio de maturação coberta por óleo mineral.

A fecundação foi realizada em 100 µl de meio TALP suplementado com 10 µg/ml de heparina, 22 µl/ml de piruvato, 50 µg/ml de gentamicina, albumina sérica bovina-BSA (sem ácidos graxos), solução de PHE (2 µM de penicilina, 1 µM de hipotaurina e 0,25 µM de epinefrina). O sêmen de touro Nelore, descongelado em banho-maria a 35 °C. Para seleção dos espermatozóides móveis e remoção de diluidores e plasma seminal, foi realizada

centrifugação em gradiente percoll (90 e 45%), durante 20 minutos. Utilizou-se 1×10^6 espermatozoides/mL, e os oócitos foram transferidos para as microgotas (20 oócitos/gota), onde permaneceram por 15 a 18 horas, a 39°C, em atmosfera com 5% de CO₂ em ar.

Após a fertilização, os zigotos foram cultivados *in vitro*, no meio SOF suplementado com SFB, com monocamada de células da granulosa. O cultivo foi realizado por 15 horas pós-inseminação, em incubadora, com atmosfera gasosa contendo 20% CO₂ em ar, com máxima umidade. Decorridas 48 horas, avaliou-se a taxa de clivagem e realizou-se a renovação do meio de cultivo. Nesse período, quando ocorre a clivagem, observa-se embriões com 2, 4 e 8 células. Os embriões com 2 células apresentam menor probabilidade de chegar ao estágio de blastocisto. Durante a avaliação da clivagem, retiraram-se as estruturas não clivadas da gota, por liberarem metabólitos prejudiciais aos embriões em desenvolvimento. Foram feitas duas outras avaliações, nos estágios de mórula (oito células) e blastocisto inicial.

Os embriões foram vitrificados em astes de vitrificação (Criotop® ou Vitri-ingá®) com os respectivos protetores. Os protetores das astes foram colocados horizontalmente num suporte no Vitri-Equip (equipamento próprio para o procedimento onde é colocado o nitrogênio líquido) para a estabilização da temperatura. Em uma placa de *Nunc* os embriões foram lavados nos dois primeiros poços contendo 400 µL de meio manutenção (AB Holding-Nutricell®), posteriormente foram transferidos para o terceiro poço e lavados por 5 a 15 minutos em uma solução de equilíbrio. Após esse período os embriões foram transferidos para uma placa de *Petri* e lavados em três gotas de 20 µL cada de solução de vitrificação, passando por estas três gotas num tempo máximo de 1 minuto, ou seja, 20 segundos cada uma. Posteriormente os embriões foram rapidamente colocados na aste de vitrificação previamente identificada com o mínimo de meio possível e mergulhados diretamente no nitrogênio líquido, contido no Vitri-Equip, fechado com o protetor e, finalmente, armazenados no botijão.

Na seqüência, os embriões foram descongelados de acordo com o protocolo descrito a seguir. Fez-se a remoção do protetor da aste de vitrificação sob o nitrogênio líquido, e imersão da tira diretamente em 450 µL na solução de descongelamento contida numa placa de quatro poços aquecida a 38°C por um minuto. Posteriormente, transferiu-se o embrião pra outra placa com solução diluente em temperatura ambiente por 3 minutos. Depois os embriões foram lavados nos dois poços seguintes, por 5 minutos cada, com solução de lavagem, e finalmente, colocados em cultura com meio SOF – Nutricell® com atmosfera gasosa

contendo 5% de CO₂ em ar, com máxima umidade, observando com 06, 12 e 24 horas observando a expansão e a eclosão dos mesmos.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com dois tratamentos e 06 repetições cada, realizando 04 aspirações com um intervalo médio de 15 dias. As características estudadas foram: número de oócitos viáveis (NOV), taxa de clivagem (TCL) e taxa de blastocisto (TBL). Após a vitrificação foram avaliadas as taxas de re-expansão (TEP) e taxa de eclosão (TEC). Todas as características foram testadas para verificação da normalidade dos dados e foi observado que todas as características apresentaram distribuição normal.

Para as características NOV, TCL e TBL, foi utilizado o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + V_j/T_i + A_k + TA_{ik} + e_{ijk}$$

Em que:

Y_{ijk} = valor observado das variáveis estudadas, obtidas do animal “j”, recebendo o tratamento “i”, na aspiração “k”.

μ = Constante geral das observações

T_i = Efeito fixo do tratamento “i”, sendo $i = 1$ e 2 ($1 =$ Controle e $2 =$ Canola em grão)

V_j / T_i = Efeito aleatório da vaca “j” dentro do tratamento “i”.

A_k = Efeito fixo da aspiração “k”, sendo $k = 1, 2, 3, 4$.

TA_{ik} = Efeito fixo da interação tratamento “i” e aspiração “k”.

e_{ijk} = erro aleatório associado a cada observação Y

Para as características observadas após a vitrificação, como TEP e TEC foi utilizado o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

Em que:

Y_{ij} = valor observado das variáveis estudadas, obtidas do animal “j”, recebendo o tratamento “i”

μ = Constante geral das observações

T_i = Efeito fixo do tratamento “i”, sendo $i = 1$ e 2 (1 = Controle e 2 = Canola em grão)

e_{ij} = erro aleatório associado a cada observação Y .

Para avaliar os dados foi realizada análise de variância, utilizando o programa computacional SAEG.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que não houve efeito ($p > 0,05$), de canola em grão na dieta no número de oócitos viáveis. O número de oócitos viáveis é de importância fundamental em programas de FIV, pois está relacionado ao número de folículos presentes nos ovários no momento da aspiração folicular. (Ryan *et al.*, 1992, Staples *et al.*, 1996, Thomas *et al.*, 1997) têm mostrado que animais alimentados com dietas ricas em gordura apresentam aumento no número de folículos médios (5 – 9 mm) e grandes ($> 9,0$ mm), podendo aumentar o número de oócitos produzidos, todavia isto não foi observado nos resultados deste experimento.

Tabela 2. Efeito da inclusão de canola em grão na dieta de vacas da raça Nelore no número de oócitos viáveis (NOV), taxa de clivagem (TCL) e taxa de blastocisto (TBL).

Variáveis	Tratamentos	
	T2-Canola	T1-Controle
NOV	12,66 ± 1,71	11,04 ± 1,77
TCL (%)	60,62 ± 4,72	61,39 ± 4,88
TBL (%)	23,69 ± 5,12	27,04 ± 5,30

Não houve efeito da inclusão ($p > 0,05$) da canola em grão na dieta, na taxa de clivagem e na taxa de blastocisto (Tabela 2). A produção de embriões depende da qualidade do oócito que é aspirado, o que não apresentou diferença entre os tratamentos. A produção e a qualidade dos embriões não se alteraram ao se fornecer dietas com altos teores de gordura comparado com dietas controles (Cavalieri *et al.*, 2005b). No entanto, outros trabalhos mostraram que a inclusão de gordura na dieta aumentou a taxa de gestação em vacas de leite

e corte (De Fries *et al.*, 1996; Petit *et al.*, 1998; Ambrose *et al.*, 2006), sendo assim, este fator positivo parece não estar relacionado com a qualidade do oócito ou do embrião.

Outros fatores como o aumento na concentração de progesterona, modulação da síntese de prostaglandina e aumento do tamanho do folículo ovulatório também parecem afetar diretamente a taxa de gestação em animais alimentados com gordura na dieta.

Son *et al.* (1996) encontraram aumento na produção de progesterona nos animais que receberam gordura animal. Assim, também outros autores obtiveram o mesmo resultado ao fornecer gordura na dieta de vacas em lactação (Williams, 1989; Hawkins *et al.* 1995; Lammoglia, 1997).

Mattos *et al.* (2000) mostraram que a inclusão de gordura rica em omega 3 na dieta, pode auxiliar na sobrevivência embrionária, pois manteria o corpo lúteo íntegro, assim como a concentração de progesterona. Esta seria uma das explicações encontradas por Petit *et al.* (1998) para o aumento da taxa de gestação quando vacas foram alimentadas com Linhaça em grãos comparada ao Megalac®.

Embora não tenha sido verificado efeito significativo de tratamento no número de oócitos viáveis, houve um efeito de vaca dentro de tratamento ($P < 0,05$), o que pode ser explicado pela grande variabilidade individual dos animais quanto à produção de oócitos.

Para a característica taxa de clivagem (TCL) foi observado que não houve efeito significativo para tratamentos e para vacas aninhadas dentro de tratamentos ($p > 0,05$). Porém, observou-se um efeito quadrático da TCL em função da ordem de punção ($P < 0,02$), bem como a interação tratamentos e ordem de punção. Assim, foi realizada uma análise em que as ordens de punções foram desdobradas em cada tratamento. Nesta análise verificou-se que para as vacas do grupo controle, as ordens de punções não diferiram ($P > 0,05$). No entanto, quando as vacas foram alimentadas com canola, houve efeito quadrático ($P < 0,001$) da TCL em função das ordens de punções, mostrando que na terceira punção a TCL foi maior, (Tabela 3) e (Figura 1).

Tabela 3: Médias e erros-padrão das variáveis: número de oócitos viáveis (NOV), taxa de clivagem (TCL) e taxa de blastocisto (TBL) em função da ordem de punção (OPU) em vacas do grupo controle e suplementadas com canola.

OPU	NOV		TCL		TBL	
	Canola	Controle	Canola	Controle	Canola	Controle
1	13,66±3,34	12,66±3,34	8,33±9,21	51,48±9,21	8,33±10,00	17,58±10,00
2	12,66±3,34	11,33±3,34	62,86±9,21	63,67±9,21	36,20±10,00	30,43±10,00
3	12,60±3,66	9,83±3,34	82,46±10,09	68,18±9,21	35,49±10,95	36,01±10,00
4	13,66±3,34	11,50±4,09	85,99±9,21	67,58±11,28	14,90±10,00	29,31±12,24

Estes resultados indicam que na medida em que as vacas são alimentadas com canola, ocorre um incremento na TCL até certo ponto, quando então ocorre uma estabilização, ou seja, a canola seria benéfica até a terceira punção quando passaria a não exercer mais este efeito.

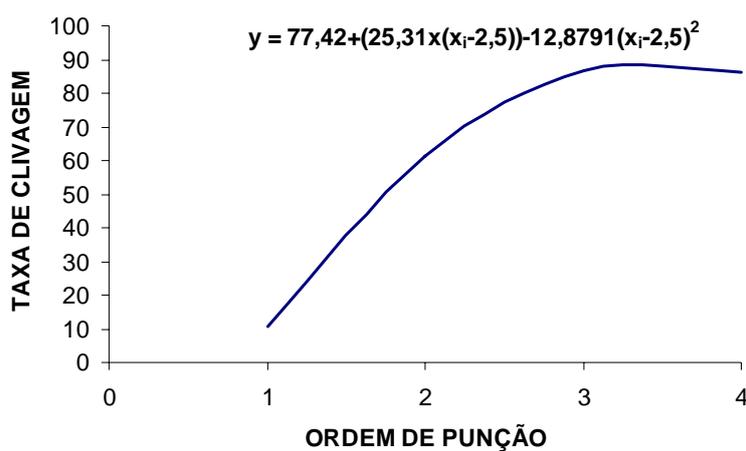


Figura 1: Taxa de clivagem em função da ordem de punção em vacas alimentadas com canola

Quanto a TBL, não foi observado efeito ($P > 0,05$) devidos aos tratamentos e a ordem de punção. Entretanto, a interação tratamento e ordem de punção foi significativo ($P < 0,05$) e, portanto, uma nova análise para o desdobramento das ordens de punções dentro de cada tratamento.

Nos resultados da análise, verificou-se que houve um efeito quadrático ($P < 0,02$) da TBL em função das ordens de punções quando foi utilizado canola nas rações (Figura 2), indicando que a canola teve um efeito favorável na taxa de blastocisto até a segunda punção e isto pode ser observado na Tabela 2.

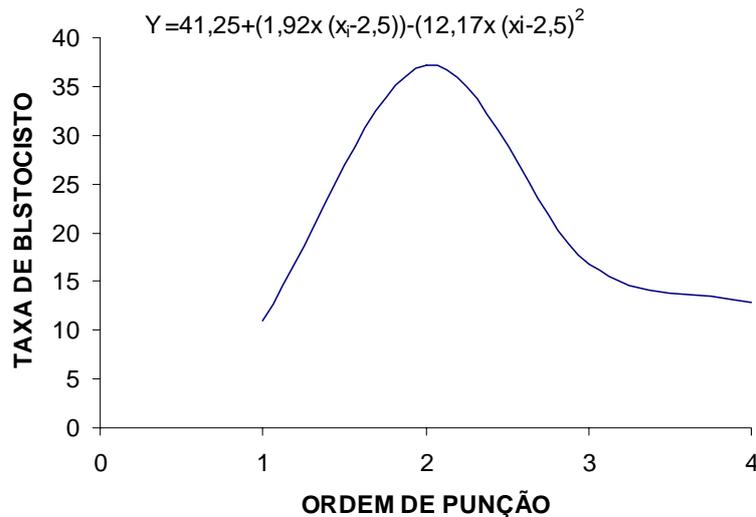


Figura 2: Taxa de Blastocisto em função da ordem de punção de vacas alimentadas com Canola

Com relação à taxa de re-expansão dos embriões (TEP), não houve efeito de tratamentos ($P > 0,05$) após os procedimentos de vitrificação e descongelamento (Tabela 4). A formação da blastocèle se dá por meio da atuação enzima ATPase (sódio e potássio), a qual favorece o acúmulo de sódio na cavidade embrionária, aumentando a pressão osmótica da mesma e permitindo a entrada de líquido na blastocèle (Prestes e Landim-Alvarenga, 2006). No entanto, durante a vitrificação o embrião se compacta devido a saída de líquido e logo após a descongelamento ocorre a re-expansão embrionária. Shu et al., (2008) observaram que a taxa de gestação foi maior nos embriões que re-expandiram mais rapidamente após o descongelamento comparado àqueles que demoraram a se re-expandir. De acordo com os resultados deste experimento, parece que a utilização de canola em grão na alimentação de vacas da raça Nelore não alterou a re-expansão do blastocisto produzido in vitro.

Todavia, em relação à taxa de eclosão (TEC) verificou-se que houve efeito ($P < 0,06$) entre os tratamentos. A eclosão dá-se pela lise de uma porção da zona pelúcida, formando um orifício através do qual o blastocisto se comprime e abandona a zona pelúcida, enquanto se expande (Prestes e Landim-Alvarenga, 2006). Observou-se que os oócitos obtidos de animais tratados com canola deram origem a um número maior de blastocistos eclodidos na vitrificação e descongelamento (Tabela 4), sugerindo maior resistência conferida aos embriões obtidos de oócitos de vacas suplementadas com canola em grão.

Tabela 4. Médias e erros-padrão para taxa de expansão (TEP) e taxa de eclosão (TEC) de embriões de vacas da raça Nelore

Variáveis	Tratamentos	
	Canola	Controle
Taxa de Re-expansão	70,48 ± 6,99 a	59,62 ± 7,09 a
Taxa de Eclosão	69,17 ± 7,43 a	35,66 ± 6,86 b

Médias seguidas de letras diferentes, deferem entre si pelo teste F ($p < 0,06$)

As membranas celulares parecem ser o principal local a ser lesado na criopreservação dos embriões. De acordo com Zeron *et al.* (2002), a fluidez da membrana determina a concentração de lesão a ser causada na mesma durante o congelamento do embrião. Sendo assim, a descoberta de meios que promovam proteção e resistência as membranas plasmáticas são de grande importância para a obtenção de melhores resultados nos processos de congelamento.

Arav *et al.* (2000) observaram aumento na resistência dos espermatozoides de carneiros, aumentando a quantidade de ácidos graxos poliinsaturados na membrana plasmática do mesmo, o que sugere relação estreita entre o perfil de ácidos graxos da membrana e a susceptibilidade dos gametas ao congelamento. Imai *et al.* (1997) observaram que adicionando 1mg/mL de ácido linoléico no meio de cultivo de embriões, obtiveram aumento de 28% na taxa de sobrevivência embrionária pós-descongelamento quando comparado aos embriões que não receberam ácido linoléico. Seguindo a mesma linha, Vam Soom *et al.* (2001), também observaram aumento na resistência dos embriões bovinos ao congelamento alterando o nível de lipídios do meios de cultivo dos embriões. Pereira *et al.* (2006) adicionaram ácido linoleico conjugado em meios de cultivo de embriões e verificaram que houve uma redução no acúmulo de lipídios nos embriões e um aumento significativo na sobrevivência embrionária ao processo de criopreservação.

A fonte de gordura da dieta pode alterar o perfil de ácidos graxos das membranas plasmáticas das células (Mattos *et al.*; 2000), o que se sustenta pelos dados achados por Albuquerque *et al.* (2005), que determinaram a concentração de ácidos graxos no líquido folicular de vacas suplementadas com linhaça e canola em grãos, e observaram que, para os ácidos graxos da série n-3 e n-6 o tratamento com canola apresentou concentrações superiores

(18,32% e 5,26%), comparadas aos tratamentos testemunha (5,24% e 1,58%) e linhaça (6,55% e 0,42%). Estes resultados têm implicações diretas no processo de criopreservação dos embriões, pois a maior quantidade de ácidos graxos poliinsaturados na membrana plasmática determina maior fluidez da membrana plasmática (Stubbs e Smith, 1984). E, de acordo com Zeron *et al.* (2002), esta maior fluidez aumenta a eficiência de troca da água intracelular pelo crioprotetor, favorecendo a proteção do embrião.

Estes dados poderiam explicar a maior taxa de eclosão dos embriões oriundos de oócitos das vacas suplementadas com canola, encontrada neste experimento. Isto porque o fornecimento deste grão deve ter alterado o perfil de ácidos graxos da membrana plasmática dos embriões, conferindo às mesmas maior fluidez e, portanto maior resistência às injúrias provocadas pelo processo de vitrificação e descongelamento.

CONCLUSÕES

Pode-se concluir que o fornecimento de canola em grãos na dieta de vacas Nelore, não altera a produção de oócitos viáveis e as taxas de clivagem, blastocisto e re-expansão. Todavia, os embriões de vacas alimentadas com canola em grão são mais resistentes ao processo de vitrificação do que embriões daquelas que não o foram.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE,H.; YAMASHITA, S.; SATOH, T.; HOSHI, H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different systems using serum-free or serum-containing media. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 61, p. 57-66, 2002.

ALBUQUERQUE, K.P. *Concentração de ácidos graxos no plasma sanguíneo e no líquido folicular de vacas suplementadas com linhaça ou canola em grãos.* 2007. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2007.

AMBROSE, D.J.; KASTELIC, J.P.; CORBETT, R.. Lower pregnancy losses in lactating dairy cows fed a diet enriched in α -linolenic acid. *J. dairy sci*, v. 89, p. 3066-3074, 2006.

ARAV, A.; PEARL, M.; ZERON, Y. Does lipid profile explain chilling sensitivity and membrane lipids phase transition of spermatozoa and oocytes. *Cryo-Lett.*, v. 21, n. 3, p. 179-186, 2000.

ARMSTRONG, D.T. 1993. Recent advances in superovulation of cattle. *Theriogenology*, v. 39, p. 7-23, 1993.

CAPOVILLA, L.C.T.; RIGOLON, L.P.; CAVALIERI, F.L.B. Superovulação e viabilidade de embriões de ovelhas santa Inês alimentadas com ácidos graxos essenciais. *Revista de Ciências Agrárias e Ambientais*, v. 4, n. 3, p. 32-47, 2006.

CAVALIERI, F.L.B.; SANTOS, G.T.; PETIT, H.. Taxa de gestação de novilhas alimentadas com duas fontes de gordura (Megalac® ou linhaça em grão) na dieta recebendo embriões congelados de vacas leiteiras alimentadas com LAC-100 ou linhaça em grão. *Acta Scientiae Veterinariae* (Suplemento 1) n. 33 p. 216, 2005a.

CAVALIERI, F.L.B.; SANTOS, G.T.; PETIT, H. Efeito de duas fontes de gordura (Megalac® ou linhaça em grão) na dieta na produção de embriões em vacas leiteiras da raça Holandesa. *Acta Scientiae Veterinariae* (Suplemento 1) n. 33, p. 217, 2005b.

DE FRIES, C.A., NEUENDORFF, D.A., RANDEL, R.D. Fat supplementation influences postpartum reproductive performance in Brahman cows. *J. anim. sci.* v. 36, p. 864-870, 1996.

GARCIA-BAJALIL, C.M., STAPLES, C.R., THATCHER, W.W. Protein Intake and Development of Ovarian Follicles and Embryos of Superovulated Nonlactating Dairy Cows. *J. dairy sci.* v. 77, n° 9, p. 2537-2548, 1994.

GUTIÉRREZ, C.G.; OLDHAM, J.; BRAMLEY, T.A. et al. The recruitment of ovarian follicles is enhanced by increased dietary intake in heifers. *J. anim sci.*, v. 75, p. 1876-1884, 1997.

HAWKINS, D.E.; NISWENDER, K.D.; OSS, G.M. et al. No increase in serum lipids increases luteal lipid content and alters the disappearance rate of progesterone in cows. *J. anim. sci.*, v. 73, p. 541-545, 1995.

HOLM, P.; CALLESEN, H. *In vivo* versus *in vitro* produced bovine ova: similarities and differences relevant for practical application. *Reprod. Nutr. Dev.* v. 38, p. 579-594, 1998.

IMAI, K.; KOBAYASHI, S.; GOTO, Y.. Cryopreservation of bovine embryos obtained by *in vitro* culture of ivm-ivf oocytes in the presence of linoleic-acid albumin. *Theriogenology*, v. 47, p. 347, 1997.

LAMMOGLIA, M.A.; WILLARD, S.T.; HALLFORD, D.M.. Effects of dietary fat follicular development and circulating concentration of lipids, insulin, progesterone, estradiol 17 b, 13, 14-dihydro-15-keto-prostaglandin f2 α and growth hormone in estrus cyclic Brahman cows. *J. anim sci.*, v. 75, p. 1591-1600, 1997.

LAOWTAMMATHRON, C.; LORTHONGPANICH, C.; KETUDAT-CAIRNS, M.; HOCHI, S.; PARNPAI, R. Factors affecting cryosurvival of nuclear-transferred bovine and swamp buffalo blastocysts: effects of hatching stage, linoleic acid-albumin in IVC médium and Ficoll supplementation to vitrification solution. *Theriogenology*. v. 64, p. 1185-1196, 2005.

MATTOS, R., STAPLES, C.R., THACTHER, W.W. Effects of dietary on reproduction in ruminants. *Rev. reprod.*, v. 5, p. 38-45, 2000.

MOLLE, G.;BRANCA, A.; LIGIOS, S.. Effect of grazing background and flushing supplementation on reproductive performance in Sarda ewes. *Small rumin. res.*, v. 17, p. 245-254, 1995.

MULLER, M. *Fontes de gordura e flushing no desempenho de novilhas e vacas de corte no pós-parto*. 2003. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2003.

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

PEREIRA, R.M.; BAPTISTA, M.C.; VASQUES, M.I.; HORTA, P.V.; PORTUGAL, P.V.; BESSA, R.J.B.; CHAGAS E SILVA, J.; SILVA PEREIRA, M.; MARQUES, C.C. Cryosurvival of bovine blastocysts is enhanced by culture with trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid (10t, 12c CLA). *Anim. Reprod. Sci.*, v. 98, p. 293-301, 2007.

PETIT, H.V.; DEWHURST, J.G.; PROULX, J.G., et al. Milk yield and reproduction of dairy cows fed saturated or unsaturated fat. *J. dairy sci.*, v. 81, p. 302, 1998.

PRESTES, N.C.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. *Obstetrícia Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

REICHENBACH, H.D.; OLIVEIRA, M.A.L.; LIMA, P.F. Transferência e criopreservação de embrião bovino. *Biotécnicas aplicadas a reprodução animal*. 1.ed. São Paulo: Varela, 2002. 560p.

RIGOLON, L.P., CAVALIERI, F.L.B.; BETINI, C.M. Inclusão de ácidos graxos poliinsaturados na dieta associado ou não ao bST na resposta superovulatória e produção de embriões em novilhas de corte. In: ARQUIVOS DA FACULDADE DE VETERINÁRIA UFRGS, 27, 1999, Campos do Jordão. *Anais...Campos do Jordão*. 1999, p. 283.

RIGOLON, L.P.; PRADO, I.N.; CAVALIERI, F.L.B. Efeito de diferentes níveis de energia sobre a produção e viabilidade de embriões em novilhas e vacas. *Rev. bras. zootec.*, v. 32, p. 1304-1310, 2003.

RIZOS, D.; WARD, F.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Effect of culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification. *Theriogenology*. v. 56, p. 1-16, 2001.

RYAN, D.P.; SPOON, R.R.; WILLIAMS, G.L. *Ovarian follicular characteristics, embryo recovery, and embryo viability* in heifers fed high-fat diets and treated with follicle-stimulating hormone. *J. anim. sci.*, v. 70, p. 3505-3513, 1992.

SÁ, W.F.; VIZCARRA, V.E.L.; FERREIRA, A.M.; CAMARGO, L.S.A.; ARAÚJO, M.C.C. Desenvolvimento pós-fecundação de oócitos bovinos pré-maturados em fluido folicular. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 55, n. 3, 2003.

SHAW, D.W.; FARIN, P.W.; WASHBURN, et al. Effect of Retinol palmitate rate and embryo quality in superovulated cattle. *Theriogenology*. v. 44, p. 51-58, 1995.

SHU, Y.S.; WATT, J.; GEBHARDT, J et al. The value of fast blastocle re-expansion in the selection of a viable thawed blastocyst for transfer. *Fertil. steril.* v. , p. 2008

SON, J.; GRANT, R.J.; LARSON, L.L. et al. Effects of tallow and escape protein on lactational and reproductive performance of dairy cows. *J. dairy sci.*, v. 79, p. 822-830, 1996.

STAPLES, C.R.; THATCHER, W.W.; BURKE, J.M. Influence of supplemental fat on reproductive tissues of the dairy cow. *J. dairy sci.*, v. 79, 1996.

STAPLES, C.R.; BURKE, J.M.; THATCHER, W.W. Symposium: optimizing energy nutrition for reproduction dairy cows. *J. dairy sci.*, v. 81, p. 856-871, 1998.

STUBBS, C.D.; SMITH, A.D. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. *BBA – Reviews on Biomembranes*, v. 779, p. 89-137, 1984.

THOMAS, M.G., WILLIAMS, G.L. Metabolic hormone secretion and FSH-induced superovulatory responses of beef heifers fed dietary fat supplements containing predominantly saturated or polyunsaturated fatty acids. *Theriogenology*. v. 45, p. 451-458, 1996.

THOMAS, M.G.; BAO, B.; WILLIAMS, G.L. Dietary fats varying in their fatty acid composition differentially influence growth in cows fed isoenergetic diets. *J. anim sci.*, v. 75, p. 2512-2519, 1997.

TOMINAGA, K.; HAMADA, Y.; YABUUE, T.; ARIYOSHI, T. Effect of linoleic acid-albumin on post-thaw survival of in vitro-produced bovine embryos at the 16-cell stage. *J. vet. med. sci.* v. 62, p. 465-467, 2000.

TWAGIRAUMNGU, H.; MORIN, N.; BORDIGNON, V.; SMITH, L.C.; BOUSQUET, D. Influence of serum in culture system on the production and cryopreservation of in vitro-derived bovine embryos, *Theriogenology*. v. 47, p. 356 (abstract), 1997.

VAN SOOM.; MAHMOUDZADEH, A.R.; CHRISTOPHE, A.. Silicone oil used in microdrop culture can affect bovine embryonic development and freeability. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 36, n. 3-4, p. 169-176, 2001.

WILLIAMS, G.L. Modulation of luteal activity in postpartum beef cows through changes in dietary lipid. *J. anim sci.* v. 67, p. 785-793, 1989.

ZERON, Y.; TOMCZAK, M.; CROWE, J. et al. The effect of liposomes on thermotropic membrane phase transitions of bovine spermatozoa and oocytes: implications for reducing chilling sensitivity. *J. reprod. fertil.*, v. 45, p. 143-152, 2002.