

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM FONTES DE ÁCIDOS GRAXOS EM DOADORAS DA RAÇA HOLANDESA DURANTE O PRÉ E PÓS-PARTO SOBRE O RETORNO À CICLICIDADE E PRODUÇÃO *in vitro* DE EMBRIÕES¹

GUILHERME FAZAN ROSS², FÁBIO MORATO MONTEIRO³, MARINA RAGAGNIN DE LIMA², MAITE DEL COLLADO², ROBERTA VANTINI², JOAQUIM MANSANO GARCIA²

¹Recebido para publicação em 06/05/13. Aceito para publicação em 07/08/13.

²Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, SP. Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n, CEP 14884-900, - Jaboticabal, SP, Brasil. E-mail: guilhermemedvet@yahoo.com.br

³Centro de Apoio a Pesquisa Tecnológica dos Agronegócios de Bovinos de Corte, Instituto de Zootecnia (IZ), Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo (SAA), Rodovia Carlos Tognani, SP (333), Km 94, Caixa postal 63, CEP 14160-970, Sertãozinho, SP, Brasil.

RESUMO: A suplementação de bovinos leiteiros com fontes de ácidos graxos poliinsaturados (AGPs) é uma prática utilizada para aumentar o nível energético das dietas, além de proporcionar efeitos positivos nas funções reprodutivas de importantes tecidos, incluindo hipotálamo, hipófise, ovários e útero. O trabalho foi conduzido com objetivo de avaliar as condições reprodutivas do pós-parto, número de folículos, presença de corpo lúteo (CL), concentração de progesterona (P_4), quantidade de oócitos viáveis e totais e a produção *in vitro* de embriões (PIVE) de doadoras multíparas da raça Holandesa suplementadas com dieta rica em AGPs protegido (principalmente ácido linoleico - n-6) e não protegido (principalmente ácido linolênico - n-3) durante o pré e pós-parto. As dietas foram fornecidas por 30 dias pré-parto e 60 dias pós-parto. As doadoras foram divididas aleatoriamente em 3 grupos: Controle (n=6), Megalac-E® (n=5; suplementados com fonte de gordura protegida 100 g/doadora/dia no pré-parto e 300 g/doadora/dia no pós-parto) e linhaça (n=5); fonte de gordura não protegida contendo 1 kg/doadora/dia no pré-parto e 1,5 kg/doadora/dia no pós-parto). Os animais foram submetidos à aspiração folicular (OPU) nos dias 30, 45 e 60 pós-parto. Os oócitos recuperados foram selecionados e os viáveis submetidos aos procedimentos da PIVE. Os dados foram analisados pelo método dos quadrados mínimos utilizando análise de variância pelo procedimento GLM. As diferenças entre as médias foram comparadas pelo teste de Tukey com significância de 5%. Não foi detectado efeito de tratamento de suplementação, de dias de aspirações pós-parto e das interações sobre as variáveis: quantidade de oócitos viáveis, taxa de oócitos viáveis, número de clivagem, de PIVE, taxa de doadoras com CL e concentração de P_4 ($P>0,05$). No entanto, foi observado maior número de folículos e de oócitos totais no grupo suplementado com linhaça em relação ao grupo Megalac-E® e Controle ($P<0,05$). A suplementação com AGPs não aumentou o número de oócitos viáveis, a PIVE e o retorno à ciclicidade.

Palavras-chave: aspiração folicular, *Bos taurus taurus*, Megalac-E®, linhaça, PIVE.

EFFECTS OF FATTY ACID SUPPLEMENTATION IN HOLSTEIN COWS AT PRE AND POST PARTUM PERIOD, ON ESTROUS CYCLE RETURN AND IN VITRO PRODUCTION OF EMBRYOS

ABSTRACT: The supplementation of dairy cattle with sources of polyunsaturated fatty acids (PUFA) can be used to increase the energy level of the diet in addition to having positive effects on reproductive functions of important tissues including the hypothalamus, pituitary, ovaries and uterus. The aims of this study were to evaluate the reproductive conditions of the postpartum, number of follicles, corpus luteum (CL) presence, concentration of progesterone (P_4), aspirated oocytes, amount of viable oocytes and *in vitro* production of embryos (IVPE) of the Holstein

multiparous donors supplemented with rich diet in protected PUFA (especially linoleic acid - n-6) and non-protected (especially linolenic acid - n-3) during pre and post partum. The diets had been given for pre-partum during 30 d and post partum 60 d. The donors were divided into three groups: Control (n=6), Megalac-E® (n=5; supplemented with protected fat source 100 g/donor/day in pre-partum and 300 g/donor/day in postpartum) and linseed (n=5; supplemented with fat source unprotected containing 1 kg/donor/day pre-partum and 1.5 kg/donor/day in postpartum). The animals were submitted to ovum pick-up (OPU) on days 30, 45 and 60 d postpartum. The recovered oocytes were selected and the viable ones were submitted to IVPE procedures. The data were analyzed by the method of least squares variance using the GLM protocol. The differences between averages were compared by Tukey test with 5% significance. There was no detectable effect of treatment, aspirations of postpartum days and interactions on variables: CL presence, concentration of P4, amount of viable oocytes, viable oocytes rate, IVPE and embryos production rate. However, was observed in the group supplemented with linseed more follicles and total oocytes than Megalac-E® and Control group. Supplementation with PUFA didn't increase the number of viable oocytes and IVPE.

Keyword: *Bos taurus taurus*, follicular aspiration, IVPE, linseed, Megalac-E®.

INTRODUÇÃO

A bovinocultura leiteira é um dos ramos da pecuária de grande importância para o mercado brasileiro. O rebanho leiteiro brasileiro possui como principal raça a Holandesa e seus cruzamentos (*Bos taurus taurus*), que é responsável por 70% da produção de leite (CNA, 2005). Segundo GALLI *et al.* (2001) a taxa de blastocistos produzidos *in vitro* de vacas Holandesas é cerca de 20%. Ao contrário de animais *Bos indicus*, nos quais o número de oócitos recuperados é maior e a taxa de produção *in vitro* de blastocistos é em torno de 40% (PONTES *et al.*, 2009). A menor produção de embriões apresentada pelas doadoras Holandesas pode ser explicada pela alta produção de leite, estresse térmico e sistema nutricional insuficiente para repor as energias de manutenção dos animais (PRYCE *et al.*, 2004). Mesmo com todas essas dificuldades, a produção *in vitro* de blastocistos de doadoras leiteiras no Brasil apresentou crescimento de 27% em 2011, com mais de 83 mil embriões produzidos (VIANA, 2012).

De acordo com DISKIN *et al.* (2003), o estado nutricional dos animais influencia o crescimento dos folículos ovarianos. Além disso, as dietas podem afetar a capacidade de desenvolvimento dos oócitos e produção de embriões (O'CALLAGHAN *et al.*, 2000). A suplementação lipídica proporciona efeitos positivos nas funções reprodutivas de importantes tecidos, incluindo hipotálamo, hipófise, ovários e útero (FUNSTON, 2004).

Segundo VAN KNEGSEL *et al.* (2005), a suplementação com gordura é uma prática usada para aumentar a

energia das dietas e é muito utilizada em gado leiteiro. As gorduras protegidas da bio-hidrogenação do rúmen melhoram a qualidade de absorção dos ácidos graxos poliinsaturados (AGPs) pelas vacas leiteiras de alta produtividade. O uso de AGPs pode melhorar a qualidade oocitária e a taxa de gestação das fêmeas bovinas (COLAZO *et al.*, 2004; BOKEN *et al.*, 2005). Assim, há um aumento do potencial de desenvolvimento dos oócitos e da produção de embriões (FOULADI-NASHTA *et al.*, 2007).

Segundo WHYTE *et al.* (2007), vacas suplementadas com AGPs protegido apresentaram aumento nas concentrações séricas de colesterol (HDL) e progesterona (P_4) plasmática. De acordo com BENDER *et al.* (2010), os AGPs podem afetar diretamente a maturação oocitária e citoplasmática, através de alterações da composição de lipídios. Assim, supõe-se que esses ácidos são importantes para a produção dos oócitos e de embriões (STURMEY *et al.*, 2009).

Animais suplementados com linhaça, rica em ácido linolênico (n-3), no período pré e pós-parto apresentaram retorno à ciclicidade, pico de LH e de estrógeno mais precocemente em relação aos animais que não receberam esse tipo de dieta (ZACHUT *et al.*, 2011). Isso explica as possíveis ligações entre os AGPs, metabólitos e início do estro.

Segundo FOULADI-NASHTA *et al.* (2007), vacas de leite de alta produção alimentadas com dieta rica em AGPs no pós-parto apresentaram maiores taxas de clivagem e de produção de blastocisto *in vitro*. Isso pode ser explicado pela menor concentração plasmática de AGPs não esterificados, pelo efeito po-

sitivo dos AGPs na competência dos oócitos e nas membranas celular e citoplasmática, resultando em benefícios para qualidade e desenvolvimento embrionário. O trabalho foi conduzido com objetivo de avaliar os efeitos das suplementações ricas em ácidos linoleico (n-6) e linolênico (n-3) protegidos ou não, no pré e pós-parto de fêmeas da raça Holandesa de alta produção leiteira sobre o número de folículos, presença de corpo lúteo, concentração de progesterona, obtenção de oócitos viáveis e totais e produção *in vitro* de embriões (PIVE).

MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos de cuidado e manuseio dos animais deste experimento foram seguidos segundo a lei número 11.977 do Estado de São Paulo, Brasil.

Local do experimento, animais e manejo nutricional

O experimento foi realizado no Sítio Boa Esperança localizado no município de Irapuã/SP, coordenadas geográficas 21° 17' 2" de latitude sul e 49° 24' 23" de longitude oeste e as atividades laboratoriais foram realizadas no Departamento de Reprodução Animal da UNESP - Campus de Jaboticabal/SP. Foram utilizadas 16 fêmeas adultas pluríparas da raça Holandesa (*Bos taurus taurus*) com escore corporal entre 2,5 e 3,5 (em uma escala de 0 a 5, LOWMAM *et al.*,

1976) e média de produção de leite de 32 kg/dia. Os animais foram suplementados com silagem de milho, cevada (10kg/dia/animal) e ração concentrada (milho, farelo de soja e algodão, polpa cítrica, núcleo, ureia e bicarbonato de sódio), em pastagem de Tyfton (*Cynodon spp*) e Mombaça (*Panicum maximum* cv. Mombaça) e com acesso a água e sal proteinado *ad libitum*.

As doadoras foram divididas aleatoriamente em três grupos, sendo o grupo controle com 6 doadoras que foram alimentadas com a dieta padrão da fazenda. O segundo grupo com 5 doadoras, foi suplementado com uma fonte de gordura protegida (Megalac-E®; Química Geral do Nordeste, Rio de Janeiro, Brasil) contendo 100 g/doadora/dia no pré-parto e 300 g/doadora/dia no pós-parto. O terceiro grupo, com 5 doadoras, foram suplementadas com uma fonte de gordura não protegida (torta de linhaça prensada a frio) contendo 1,0 kg/doadora/dia no pré-parto e 1,5 kg/doadora/dia no pós-parto.

Cada doadora recebeu 4 kg de ração concentrada com o acréscimo de 100 g de Megalac-E® ou 1,0 kg linhaça no pré-parto. No pós-parto cada doadora recebeu 11 kg de ração concentrada com acréscimo de 300 g de Megalac-E® ou 1,5 kg de linhaça de acordo com o grupo experimental (Tabela 1 e 2). Essas suplementações tiveram início aos 30 dias antes do parto e término aos 60 dias pós-parto.

Tabela 1. Composição nutricional e análise bromatológica das rações utilizadas no experimento para doadoras da raça Holandesa

Ração	Controle (Kg)		Megalac-E® (Kg)		Linhaça (Kg)	
	Pré-parto	Pós-parto	Pré-parto	Pós-parto	Pré-parto	Pós-parto
Ingredientes						
Farelo de Milho	450	388	450	388	450	388
Polpa Cítrica	200	200	200	200	200	200
Farelo de Algodão	100	100	100	100	100	100
Farelo de Trigo	100	0	100	0	100	0
Farelo de Soja	100	250	100	250	100	250
Núcleo	30	40	30	40	30	40
Uréia	20	10	20	10	20	10
Bicarbonato de sódio	0	10	0	10	0	10
Ingredientes						
Megalac - E®	0	0	0,1	0,3	0	0
Torta de Linhaça	0	0	0	0	1	1,5
Índices		(%)		(%)		(%)
Matéria Seca		89,97		90,32		90,39
Proteína Bruta		32,05		26,28		27,26
Extrato etéreo		2,55		3,11		3,15

Tabela 2. Análise cromatográfica das rações utilizadas no experimento para doadoras da raça Holandesa

Ácidos	Nomenclatura	Controle (%)	Megalac-E® (%)	Linhaça (%)
Cáprico	C10:0	0,04	0,05	0,03
Láurico	C12:0	0,04	0,03	0,03
Mirístico	C14:0	0,17	0,15	0,14
Pentadecanoico	C15:0	0,03	0	0,03
Palmítico	C16:0	18,98	17,22	15,53
Palmitoleico	C16:1	0,21	0,19	0,18
Heptadecanoico	C17:0	0,14	0,12	0,11
Heptadecenoico	C17:1	0,04	0,04	0,04
Esteárico	C18:0	3,59	3,14	3,83
Oleico	C18:1n9c	29,68	28,33	27,86
cis-vacênico	C18:1n7	1,14	0,95	0,94
Linoleico (n-6)	C18:2n6c	41,85	46,5	37,65
α linolenico (n-3)	C18:3n3	2,78	2,08	12,53
Araquídico	C20:0	0,49	0,47	0,41
Eicosenoico	C20:1n9	0,2	0,2	0,18
Behênico	C22:0	0,3	0,24	0,22
Tricosanóico	C23:0	0,05	0,03	0,05
Lignocérico	C24:0	0,3	0,26	0,24
	Total	100	100	100

Delineamento Experimental

A avaliação do número de folículos, a taxa de doadoras com CL (número de doadoras com CL/total de animais) e as aspirações foliculares foram realizadas nos dias 30, 45 e 60 do pós-parto utilizando-se ultrassom Aloka SSD 500 com transdutor linear transretal e microconvexo conectado na guia de aspiração transvaginal, ambos de 5 MHz. Os oócitos aspirados foram contados e classificados em graus de I à V (DE LOOS *et al.*, 1991). Os oócitos classificados como grau I, II e III foram selecionados para a produção *in vitro* de embriões, com utilização de sêmen sexado de um único touro. A maturação dos oócitos classificados ocorreu por 24 horas em meio base TCM 199. Para a fecundação, os oócitos foram transferidos para o meio FIV gotas junto com os espermatozoides móveis já selecionados pelo gradiente de Percoll (45% e 90%). Após aproximadamente 20h de fecundação, os prováveis zigotos foram removidos do meio de fecundação e transferidos para o meio de desenvolvimento (SOFaa) onde permaneceram por 6 dias. Esses processos foram mantidos em incubadoras com 5% de CO₂ em ar, temperatura de 38,5° C e umidade relativa de 95%.

Para quantificação das concentrações plasmáticas de progesterona (P₄) foram realizadas colheitas de sangue nas três aspirações (dias 30, 45 e 60 pós-parto). O sangue foi colhido por venopunção da veia jugular (vacutainer heparinizados de 10 mL BD, São Paulo, Brasil). As amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 3600g, posteriormente coletados o plasma sanguíneo e acondicionados em freezer a -24°C. O método foi quimioluminescência (Siemens™ Progesterone kit, Los Angeles, USA). A dose mínima detectável foi 0,2 ng/mL. Foi considerada atividade lútea concentração plasmática de P₄ > 1,0 ng/mL (SILVESTRE, *et al.*, 2011).

Mensurações

No momento das aspirações foliculares foi realizada a contagem do número de folículos e observado a presença ou ausência de CL (taxa de retorno ao cio). Foi realizado a contagem dos oócitos totais aspirados, oócitos viáveis (graus I, II e III) e a taxa de oócitos viáveis (número de oócitos viáveis/oócitos totais). O número de clivagem foi o número de embriões de duas a quatro células em 32 a 36 horas pós-fertilização. A produção de embriões (mórula até blastocisto) e a taxa

de produção de embriões (número de embriões produzidos/quantidade de oócitos viáveis) foram avaliadas no sétimo dia da fecundação.

Análise estatística

As variáveis avaliadas (número de folículos observados, total de oócitos recuperados, número de oócitos viáveis e de clivagem, produção de embriões, taxa de oócitos viáveis, taxa de produção de embriões e concentração de progesterona plasmática) foram analisadas pelo método dos quadrados mínimos (HARVEY, 1960). Como os dados não seguiam as premissas de normalidade, os mesmos foram transformados em raiz quadrada ($\sqrt{x+1}$) para as variáveis expressas como número, ou $\log(x+1)$ para as variáveis expressas em porcentagem. O procedimento utilizado foi Análise de Variância (proc. GLM; SAS Inst., Inc., Cary, NC), ajustando o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijkl} = \mu + t_i + A_j(t_i) + B_k + I_{ik} + e_{ijkl}$$

em que:

Y_{ijkl} = variáveis avaliadas;

μ = média paramétrica;

t_i = efeito fixo do i -ésimo tratamento ($i = 1, 2$ e 3);

A_j = efeito fixo do j -ésimo animal ($j = 1, \dots, 16$);

B_k = efeito fixo do k -ésimo período das aspirações ($k = 1, 2$ e 3);

I_{ik} = efeito da interação entre o i -ésimo tratamento com o k -ésimo período das aspirações;

e_{ijkl} = efeito do erro aleatório associado a cada observação.

O teste Tukey com significância de 5% foi utilizado para discriminar a diferença entre as médias. Taxa de doadoras com CL foram comparadas pelo teste χ^2 (qui-quadrado) ao nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse estudo a quantidade de linhaça fornecida foi maior, quando comparado ao grupo suplementado com Megalac-E®, por se tratar de uma fonte de AGPs não protegido à bio-hidrogenação do rúmen, este responsável pela degradação de mais de 80% dos n-3 e

n-6 ingeridos na dieta (BERCHIELLI *et al.*, 2011). Já a quantidade de n-6 ingerida nas dietas foi semelhante entre os grupos, mas no grupo Megalac-E® os AGPs são protegidos e sua absorção acontece no intestino delgado. Segundo VAN KNEGSEL *et al.* (2005), a suplementação com gordura é uma prática utilizada para aumentar a energia das dietas e seu uso é comum na suplementação alimentar de animais produtores de leite. Conforme FUNSTON (2004) a suplementação lipídica proporciona efeitos positivos no sistema reprodutivo de fêmeas bovinas. No entanto, nesse estudo não foi detectado efeito da interação do tratamento e dias de aspiração no pós-parto (Figura 1 e 2). Alguns trabalhos observaram melhora na quantidade de folículos quando adicionado Megalac-E® à dieta (DE FRIES *et al.*, 1998; STAPLES *et al.*, 1998; ARTUNDUAGA *et al.*, 2010).

Maior número de folículos foi observado ($P < 0,01$) no grupo de animais suplementados com linhaça comparado ao grupo alimentado com Megalac-E® (Tabela 3). Esta melhora na população folicular de fêmeas suplementadas com AGPs ainda não está bem definida, mas foi observado que esses AGPs favorecem o desenvolvimento folicular através de metabólitos e hormônios atuando no sistema nervoso central influenciando a secreção de GnRH (LAMMOGLIA *et al.*, 1997). Uma razão para esse resultado pode ser a alta variabilidade da população folicular entre animais, já relatada em vários trabalhos (ALVAREZ *et al.*, 2000; CUSHMAN, 2009), juntamente com o pequeno número de animais por tratamento, influenciando a amostragem.

As dietas com fontes de gordura protegida (Megalac-E®) e não protegida (Linhaça) fornecidas para doadoras da raça Holandesa não influenciaram a recuperação de oócitos totais e de oócitos viáveis. No entanto, houve tendência para maior número de oócitos totais aspirados para o grupo suplementado com linhaça ($P = 0,057$; Tabela 3). Segundo KENDRICK *et al.* (1999), vacas da raça Holandesa suplementadas com dieta de alta energia produziram maior quantidade de oócitos. Diferentemente, nesse estudo, não foi observado aumento na quantidade de oócitos totais e viáveis em animais suplementados com AGPs em relação ao controle. FOULADI-NASHITA *et al.* (2007) observaram maior porcentagem de oócitos de melhor qualidade em vacas leiteiras alimentadas com diferentes teores de gordura, sendo que esses animais também apresentaram aumento na composição de AGPs nos oócitos. Esses autores sugerem que a qualidade oocitária é influenciada pela qualidade da dieta ingerida. Assim, são necessários mais estudos para comprovar a real influência dos AGPs na qualidade oocitária de fêmeas bovinas.

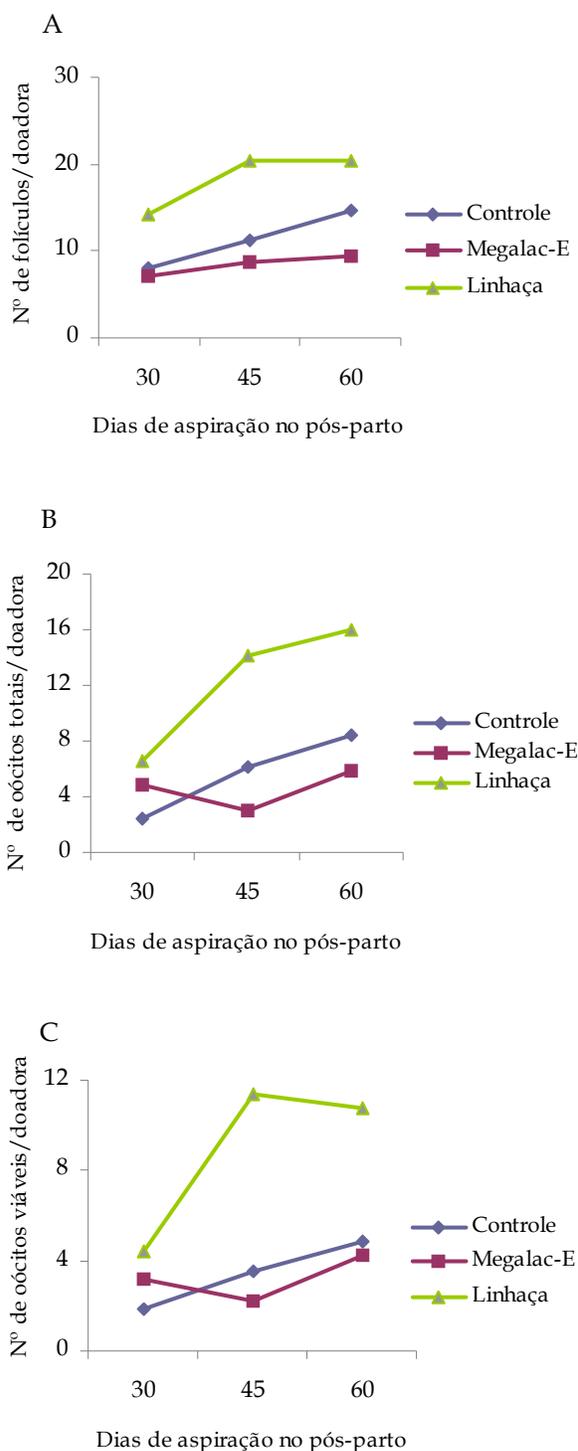


Figura 1. Efeitos da suplementação com Megalac-E® e linhaça no número de folículos visualizados no pós-parto (A), quantidade de oócitos totais (B) e de oócitos viáveis (C) em doadoras da raça Holandesa (média; $P > 0,05$).

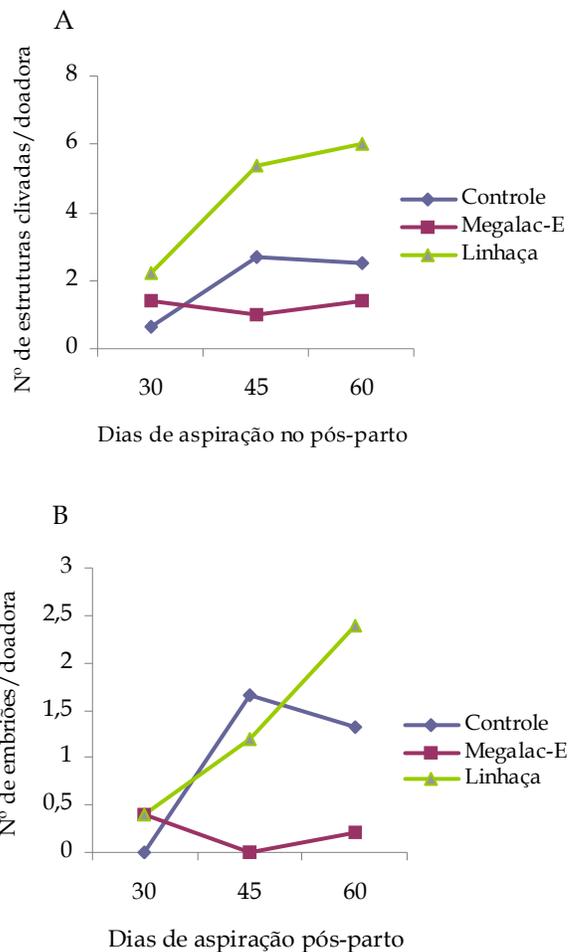


Figura 2. Efeitos da suplementação com Megalac-E® e linhaça na quantidade de estruturas clivadas (A) e PIVE (B) de doadoras da raça Holandesa (média; $P > 0,05$).

Não foi observado o efeito de tratamento de suplementação com AGPs sobre a quantidade de estruturas clivadas e a PIVE (Tabela 3). O pequeno número de animais avaliados neste estudo pode ter influenciado os efeitos de tratamento de suplementação nas variáveis de desenvolvimento embrionário. FOULADI-NASHTA *et al.* (2007) observaram maior taxa de clivagem e de produção de blastocistos em vacas leiteiras suplementadas com Megalac-E. Resultado semelhante foi relatado por PONTER *et al.* (2012) no número de oócitos de melhor qualidade e na PIVE de novilhas da raça Holandesa suplementadas com dois tipos de dieta (Soja, rica em n-6 e Linhaça, rica em n-3).

Tabela 3. Efeito da suplementação com Megalac-E® e linhaça na quantidade de oócitos aspirados e PIVE de doadoras da raça Holandesa (número de estruturas/doadora/aspiração \pm erro padrão)

Resultados	Grupos de alimentação			Valor de P
	Controle	Megalac-E®	Linhaça	
No de folículos observados	11,27 \pm 1,49ab	8,46 \pm 1,63b	18,33 \pm 1,63a	0,01
No de oócitos totais	5,72 \pm 1,24b	4,53 \pm 1,36b	12,26 \pm 1,36a	0,057
No de oócitos viáveis#	3,38 \pm 1,22	3,20 \pm 1,34	8,86 \pm 1,34	0,12
Taxa de oócitos viáveis* (%)	59%	70%	72%	0,94
No de estruturas clivadas	1,94 \pm 0,52	1,26 \pm 0,57	4,53 \pm 0,57	0,14
No de embriões produzidos	1,00 \pm 0,24	0,20 \pm 0,27	1,33 \pm 0,27	0,15
Taxa de embriões** (%)	29%	6%	15%	0,18

Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna diferem entre si (P<0,05)

Viáveis = oócitos de grau I, II e III

* Oócitos viáveis/oócitos totais

** Número de embriões/oócitos viáveis

Segundo STAPLES *et al.* (1998) e ARTUNDUAGA *et al.* (2010) vacas primíparas da raça Holandesa alimentadas com AGPs protegidos durante o pré e pós-parto adiantaram o retorno à ciclicidade e melhoraram o desempenho reprodutivo. No presente estudo não foram observados efeitos de tratamento de suplementação de fêmeas da raça Holandesa no período pós-parto sobre a presença de CL e concentração de P₄ (Figura 3). Segundo ARTUNDUAGA *et al.* (2010), AGPs (n-3 e n-6) podem aumentar as concentrações plasmáticas de colesterol, que é precursor de progesterona, favorecendo o desenvolvimento de ciclos estrais adequados para a primeira inseminação artificial pós-parto seguido pelo menor intervalo parto - concepção. A suplementação com n-3, por outro lado, inibe a síntese de PGF_{2 α} e reduz perdas de gestação precoce em bovinos (MATTOS *et al.*, 2000; AMBROSE *et al.*, 2006).

KENDRICK *et al.* (1999) avaliando vacas leiteiras alimentadas com dieta rica em energia no período pós-parto relataram aumento no número de oócito de 1,1 nos 30 dias pós-parto para 2,1 nos 100 dias. No presente estudo não foi observado efeito dos dias de aspiração após o parto para quantidade de oócitos e de produção de blastocistos in vitro (Figura 1 e 2). Apesar disso, a taxa de embriões nos dias 30, 45 e 60 pós-parto (8%, 17% e 20% respectivamente) foi semelhante à relatada por LOPES *et al.* (2006) em doadoras da raça Holandesa (32 dias = 5%; 85 dias = 20%). Isto mostra a recuperação do sistema reprodutor de fêmeas Holandesas no período pós-parto.

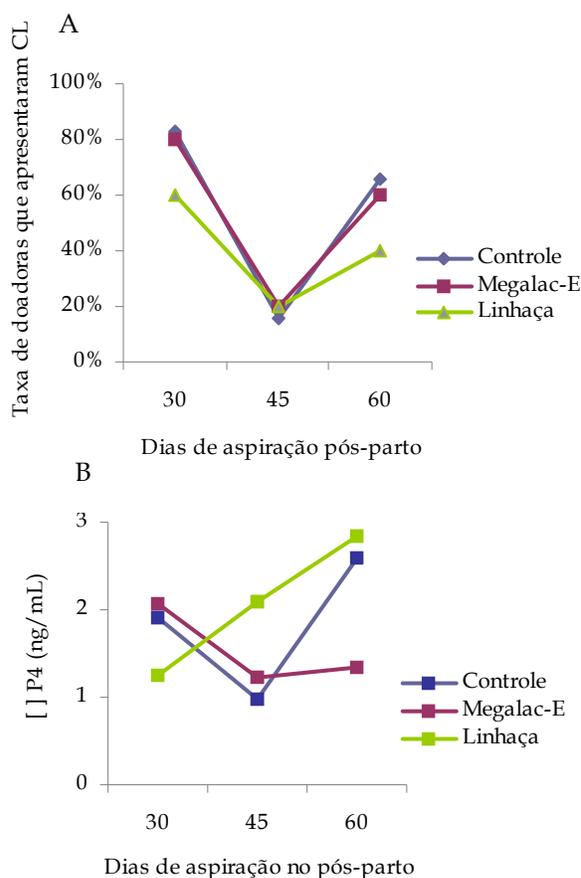


Figura 3. A - Taxa de doadoras que apresentaram CL (número de doadoras com CL/número total de doadoras) por tratamento de suplementação por dias pós-parto; B - Média de concentração de P₄ de acordo com os tratamentos e dias pós-parto de doadoras da raça Holandesa (média; P>0,05).

CONCLUSÕES

A suplementação com AGPs protegido (rico principalmente em n-6) não aumentou a quantidade de folículos, de oócitos e de embriões produzidos *in vitro*, presença de CL e a concentração de P₄. A suplementação com AGPs não protegido (rico principalmente em n-3) aumentou a quantidade de folículos e oócitos totais de fêmeas multíparas da raça Holandesa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ, P.; SPICER L.J.; CHASE JR, C.C.; PAYTON, M.E.; HAMILTON, T.D.; STEWART, R.E.; HAMMOND, A.C.; OLSON, T.A.; WETTEMANN, R. P. Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. **Journal of Animal Science**, v.78, p.1291-1302, 2000.
- AMBROSE, D. J.; KASTELIC, J. P.; CORBETT, R.; PITNEY, P. A.; PETIT, H. V.; SMALL, J. A.; ZALOKOVIC, P. 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.
- ARTUNDUAGA, M. A. T.; COELHO, S. G.; BORGES, A. M.; LANA, A. M. Q.; REIS, R. B.; CAMPOS, B. G.; SATURNINO, H. M.; SÁ FORTES, R. V.; COSTA, H. N. Primeira onda folicular e ovulação de vacas primíparas da raça Holandesa alimentadas com diferentes fontes energéticas durante o período de transição. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, p.116-123, 2010.
- BENDER, K.; WALSH, S.; EVANS, A. C. O.; FAIR, T.; BRENNAN, L. Metabolite concentrations in follicular fluid may explain differences in fertility between heifers and lactating cows. **Reproduction**, v. 139, p.1047-1055, 2010.
- BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de Ruminantes**. 2ª Edição. Jaboticabal, SP: Funep, 2011. 616p.
- BOKEN, S. L.; STAPLES, C. R.; SOLLENBERGER, L. E.; JENKINS, T. C.; THATCHER, W. W. Effect of grazing and fat supplementation on production and reproduction of Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p.4258-4272, 2005.
- CNA. **CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL**. Brasília: CNA, 2005. Disponível em: <www.cna.org.br>. Acesso em: 21 nov. 2005.
- COLAZO, M. G.; KASTELIC, J. P.; MARTÍNEZ, M. F.; WHITTAKER, P. R.; WILDE, R.; AMBROSE, J. D.; CORBETT, R.; MAPLETOFT, R. J. Fertility following fixed-time AI in CIDR-treated beef heifers given GnRH or estradiol cypionate and fed diets supplemented with flax seed or sunflower seed. **Theriogenology**, v. 61, p.1115-1124, 2004.
- CUSHMAN, R. A.; ALLAN, M. F.; KUEHN, L. A.; SNELLING, W.M.; CUPP, A. S.; FREETLY, H.C. Evaluation of antral follicle count and ovarian morphology in crossbred beef cows: Investigation of influence of stage of the estrous cycle, age, and birth weight. **Journal of Animal Science**, v.87, p.1971-1980, 2009.
- DE FRIES, C. A.; NEUENDORFF, D. A.; RANDEL, R. D. Fat supplementation influences postpartum reproductive performance in Brahman cows. **Journal of Animal Science**, v. 76, p.864-870, 1998.
- DE LOSS, F.; KASTROP, P.; VAN MAURYK, P.; VANBENEDEN T. H.; KRUIP, T. A. Heterologous cell contacts and metabolics coupling in bovine cumulus oocyte complexes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 28, p.255-259, 1991.
- DISKIN, M. G.; MACKAY, D. R.; ROCHE, J. F.; SREENAN, J. M. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.78, p.345-70, 2003.
- FOULADI-NASHTA, A. A.; GUTIERREZ, C. G.; GONG, J. G.; GARNSWORTHY, P. C.; WEBB, R. Impact of dietary fatty acids on oocyte quality and development in lactating dairy cows. **Biology of Reproduction**, v. 77, p.9-17, 2007.
- FUNSTON, R.N. Fat supplementation and reproduction in beef females. **Journal of Animal Science**, v. 82, p.154 - 161, 2004.
- GALLI, C.; CROTTI, G.; NOTARI, C.; TURINI, P.; DUCHI, R.; LAZZARI, G. Embryo production by ovum pick up from live donors. **Theriogenology**, v. 55, p.1341-1357, 2001.

- HARVEY, W. R. **Least squares analysis of data with unequal subclass numbers**. Beltsville: ARS - USDA Publ. n° 20 - 8, 1960.
- KENDRICK, K. W.; BAILEY, T. L.; GARST, A. S.; PRYOR, A. W.; AHMADZADEH, A.; AKERS, R. M.; EYESTONE, W. E.; PEARSON, R. E.; GWAZDAUSKAS, F. C. Effects of energy balance on hormones, ovarian activity and recovered oocytes in lactating Holstein cows using transvaginal follicular aspiration. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p.1731-1740, 1999.
- LAMMOGLIA, M. A. S.; WILLARD, S. T.; HALLFORD, D. M. Effects of dietary fat on follicular development and circulating concentrations of lipids, insulin, progesterone, estradiol, PGF_{2α} and growth hormone in estrous cyclic Brahman cows. **Journal of Animal Science**, v. 75, p.1591-1600, 1997.
- LOPES, A. S.; MATINUSEN, T.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Effect of days postpartum, breed and ovum pick-up scheme on bovine oocyte recovery and embryo development. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 41, p.196-203, 2006.
- LOWMAN, B. G.; SCOTT, N.; SOMERVILLE, S. **Condition scoring of cattle**. rev. Edinburg, UK: East of Scotland College of Agriculture, 1976. Bulletin n. 6.
- MATTOS, R.; STAPLES, C. R.; THATCHER, W. W. Effects of dietary fatty acids on reproduction in ruminants. **Reviews of Reproduction**, v. 5, p.38-45, 2000.
- O'CALLAGHAN, D.; YAAKUB, H.; HYTTTEL, P.; SPICER, L. J.; BOLAND, M. P. Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition and systemic hormone concentrations in ewes. **Journal of Reproduction & Fertility**, v. 118, p.303-313, 2000.
- PONTER, A. A.; GUYADER-JOLYC, C.; NUTTIINCKA, F.; GRIMARDA, B.; HUMBLOT, P. Oocyte and embryo production and quality after OPU-IVF in dairy heifers given diets varying in their n-6/n-3 fatty acid ratio. **Theriogenology**, v. 78, p.632-645, 2012.
- PONTES, J. H. F.; NONATO-JUNIOR, I.; SANCHES, B. V.; ERENO-JUNIOR, J. C.; UVO, S.; BARREIROS, T. R. R.; OLIVEIRA, J. A.; HASLER, J. F.; SENEDA, M. M. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, v. 71, p.690-697, 2009.
- PRYCE, J. E.; ROYAL, M. D.; GARNSWORTH, P. C.; MAO, I. L. Fertility in the high-producing dairy cow. **Livestock Production Science**, v. 86, p.125-135, 2004.
- SAS, 1991. SAS for P. C. 6.04. Cary, NC: SAS Institute, 1991.
- SILVESTRE, F. T.; CARVALHO, T. S. M.; FRANCISCO, N.; SANTOS, J. E. P.; STAPLES, C. R.; JENKINS, T. C. Effects of differential supplementation of fatty acids during the peripartum and breeding periods of Holstein cows: I. Uterine and metabolic responses, reproduction, and lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p.189-204, 2011.
- STAPLES, C. R.; BURKE, J. M.; THATCHER, W. W. Influence of supplemental fats on reproductive tissues and performance of lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p.856-871, 1998.
- STURMEY, D. G.; REIS, A.; LEESE, H. J. Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p.50-58, 2009.
- VAN KNEGSEL, A. T. M.; VAN DEN BRAND, H.; DIJKSTRA, J.; TAMMINGA, S.; KEMP, B. Effect of dietary energy source on energy balance, production, metabolic disorders and reproduction in lactating dairy cattle. **Reproduction Nutrition Development**, v. 45, p.665-88, 2005.
- VIANA, J. H. M. Levantamento estatístico da produção de embriões bovinos no Brasil em 2011: mudanças e tendências futuras. **O embrião**. Ano XVI, ed. 51, p.6-11, 2012.
- WHYTE, J. J.; ALEXENKO, A. P.; DAVIS, A. M.; ELLERSIECK, M. R.; FOUNTAIN, E. D.; ROSENFELD, C. S. Maternal diet composition alters serum steroid and free fatty acid concentrations and vaginal pH in mice. **Journal of Endocrinology**, v. 192, p.75-81, 2007.
- ZACHUT, M.; ARIELI, A.; MOALLEM, U. Incorporation of dietary n-3 fatty acids into ovarian compartments in dairy cows, and the effects on hormonal and behavioral patterns around estrus. **Reproduction**, v. 141, p.833-840, 2011.