

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

**Suplementação com soro sanguíneo de vacas leiteiras em diferentes períodos
de lactação na produção *in vitro* de embriões bovinos**

Letícia Franco Collares

Pelotas, 2017

Letícia Franco Collares

Suplementação com soro sanguíneo de vacas leiteiras em diferentes períodos de lactação na produção *in vitro* de embriões bovinos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal)

Orientador: Márcio Nunes Corrêa

Co-orientadora: Lúgia Margareth Cantarelli Pegoraro

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

C697s Collares, Letícia Franco

Suplementação com soro sanguíneo de vacas leiteiras em diferentes períodos da lactação na produção in vitro de embriões bovinos. / Letícia Franco Collares ; Márcio Nunes Corrêa, orientador ; Lígia Margareth Cantarelli Pegoraro, coorientadora. — Pelotas, 2017.

41 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Oócitos. 2. Balanço energético negativo. 3. Fertilidade. I. Corrêa, Márcio Nunes, orient. II. Pegoraro, Lígia Margareth Cantarelli, coorient. III. Título.

CDD : 636.0898

Letícia Franco Collares

Suplementação com soro sanguíneo de vacas leiteiras em diferentes períodos de lactação na produção *in vitro* de embriões bovinos

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências no Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 14/02/2017

Banca examinadora:

Prof. Dr. Márcio Nunes Corrêa (Orientador)
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Augusto Schneider
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Bernardo Garziera Gasperin
Doutor em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria

Dra. Jorgesa Pradieé
Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

**Dedico este trabalho aos meus pais, Fabiana Collares e Caio Flávio Collares,
os quais foram responsáveis pela minha formação tanto pessoal quanto
profissional, a pessoa que hoje me tornei devo a eles.**

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por sempre iluminar meu caminho, auxiliar nas minhas decisões e me proporcionar saúde e força durante minha jornada.

A minha família, minha mãe Fabiana Franco Collares, meu pai Caio Flávio Collares e meu irmão Mateus Collares, por sempre estarem do meu lado tanto nas horas felizes como nos momentos difíceis, pelo apoio, amor e compreensão.

A meu namorado Vinícius Prestes por todo companheirismo, amizade, amor e incentivo.

A Universidade Federal de Pelotas, ao Núcleo de Pesquisa e Extensão em Pecuária (NUPEEC), e a Embrapa Clima Temperado por disponibilizar infraestrutura, materiais e recursos para realização das atividades.

A toda equipe do Laboratório de Reprodução Animal, que me recebeu de portas abertas, todos foram essenciais para concretização desta etapa.

Ao meu orientador Marcio Nunes Corrêa e minha co-orientadora Lígia Margareth Cantareli Pegoraro, pela confiança depositada, pela orientação e auxílio durante este período.

As minhas colegas de trabalho e amigas Bruna Mion, Morgana Borges, Patrícia Gindri, Janaína Fradique e Jorgea Pradieé, por todo auxílio, ajuda, paciência e conselhos. Vocês foram essenciais para execução deste trabalho, levo todas no meu coração.

Aos colaboradores do Nupeec, Joao Rincón e Uriel Londero pela colaboração nas análises.

Ao órgão de pesquisa CNPq pela bolsa de estudos.

Aos Frigoríficos Famile, Caco e Bonna Carne, pela disponibilidade e por cederem os ovários, instrumento chave para o trabalho.

A central de inseminação artificial Progen pela doação do sêmen utilizado neste experimento.

A todos fica minha gratidão, pois sozinha nada disto seria possível.

Resumo

Collares, Letícia Franco. **Suplementação com soro sanguíneo de vacas leiteiras em diferentes períodos de lactação na produção *in vitro* de embriões bovinos.** 2017. 41f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

O período de transição de vacas leiteiras caracteriza-se por várias alterações metabólicas, devido ao balanço energético negativo (BEN). Este BEN afeta de forma negativa a fertilidade. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da suplementação com soro sanguíneo de vacas leiteiras em diferentes períodos de lactação no meio de maturação sobre as taxas de maturação nuclear, clivagem e desenvolvimento embrionário inicial em bovinos. Em 13 repetições, 1634 complexos *cumulos* oócitos (CCOs) foram coletados e aspirados de ovários de fêmeas bovinas provenientes de abatedouros locais. Os CCOs foram divididos aleatoriamente em três tratamentos contendo 50 CCOs cada: SO: soro ovino usado como controle; FL: soro de quatro vacas com $354 \pm 3,8$ dias pós-parto (pp) e PP: soro de quatro vacas com $10,8 \pm 4,8$ dias pp. Posteriormente, os CCOs foram incubados em estufa a 39°C com 5% de CO_2 durante 24h no meio de maturação conforme os tratamentos. A inseminação foi procedida com uma concentração de 1×10^6 espermatozoides/mL utilizando gradiente mini-Percoll® para seleção espermática. Após a inseminação, os CCOs foram incubados por 18h. Os zigotos permaneceram no meio de cultivo SOFaa nas mesmas condições da MIV durante 7 dias. Para análises da maturação nuclear utilizaram-se quatro rotinas com um total de 320 oócitos os quais foram coletados após a MIV, desnudados e corados com Hoechst®. O momento da inseminação foi considerado como dia 0, a taxa de clivagem foi avaliada no dia 3 e a taxa de desenvolvimento embrionário global no dia 7. Segundo os resultados, não foi observada diferença no número de oócitos que atingiram o estágio de metáfase II entre os tratamentos. A taxa de clivagem foi melhor no SO: 66,9% (368/577) do que no PP: 47% (243/517) ($P < 0,05$). O desenvolvimento embrionário foi melhor no SO: 22,7% (131/577) quando comparados aos tratamentos FL: 15% (81/540) e PP: 16,6% (80/517) ($P < 0,05$). Concluiu-se que a suplementação com soro sanguíneo de vacas em diferentes períodos da lactação no meio de MIV de oócitos bovinos não interferiu na taxa de maturação nuclear, clivagem e no desenvolvimento embrionário inicial entre os tratamentos FL e PP.

Palavras- Chave: oócitos; balanço energético negativo; fertilidade

Abstract

Collares, Letícia Franco. **Supplementation with blood serum of dairy cows at different lactation periods in the in vitro production of bovine embryos**. 2017. 41 f. Dissertation (Master degree in Sciences) Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

The transition period of dairy cows is characterized by several metabolic changes, leading to negative energy balance (NEB). NEB affects fertility in a negative way. The purpose of this work was to evaluate the effect of blood serum supplementation of dairy cows at different lactation periods in the maturation medium on the rates of nuclear maturation, cleavage and initial embryonic development. In 13 replicates, 1634 cumulus oocyte complexes (COCs) were collected and aspirated from ovaries of bovine females from local slaughterhouses. The COCs were randomly divided into three treatments containing 50 COCs each: SO: sheep serum used as control; FL: cow serum with 354 ± 3.8 days postpartum (pp) and PP: cow serum with 10.8 ± 4.8 days pp. Subsequently, the COCs were incubated at 39°C with 5% CO_2 for 24 hours in the maturation medium according to the treatments. The insemination was carried out with a concentration of 1×10^6 spermatozoa / mL using mini-Percoll® gradient for spermatoc selection. After insemination, the COCs were incubated for 18 hours. The zygotes remained in SOFaa culture medium under the same IMV conditions for 7 days. For analysis of nuclear maturation, four routines were used with a total of 320 oocytes which were collected after IMV, stripped and stained with Hoechst®. The time of insemination was considered as day 0, the cleavage was evaluated at day 3 and the overall embryonic development rate at day 7. According to the results no difference was observed in the number of oocytes that reached the stage of metaphase II between treatments. The cleavage rate was better in SO: 66.9% (368/577) than in PP: 47% (243/517) ($P < 0.05$). Embryonic development was better at SO: 22.7% (131/577) when compared to FL treatments: 15% (81/540) and PP: 16.6% (80/517) ($P < 0.05$). It was concluded that blood serum supplementation of cows at different lactation periods in the bovine oocyte IVM medium did not interfere with the rate of nuclear maturation, cleavage and early embryonic development with treatments FL and PP.

Keywords: oocytes; negative energy balance; fertility

Lista de Tabelas

Tabela 1	Média da produção leiteira, porcentagem de gordura, proteína e contagem de células somáticas nos grupos PP e FL.....	23
Tabela 2	Média dos parâmetros bioquímicos avaliados no soro sanguíneo, erro padrão e valor de P nos animais dos grupos final da lactação (FL) e pós-parto (PP)	23
Tabela 3	Parâmetros bioquímicos avaliados no pool de soro inativado dos grupos soro ovino (SO), final da lactação (FL) e pós-parto (PP).....	24
Tabela 4	Taxa de maturação nuclear (maturos ou imaturos / total avaliados) nos tratamentos soro ovino (SO), final da lactação (FL) e pós-parto (PP).....	24
Tabela 5	Taxa de clivagem e de desenvolvimento embrionário na PIVE de oócitos bovinos suplementados com soro ovino (SO), final da lactação (FL) e pós-parto (PP) durante a MIV.....	24
Tabela 6	Cinética de desenvolvimento embrionário de oócitos suplementados durante a MIV com soro ovino (SO), soro de vacas no final da lactação (FL) e soro de vacas no pós-parto (PP).....	25

Lista de Abreviaturas e Siglas

μL	Microlitro
BEN	Balanço energético negativo
BHBA	Beta-hidroxibutirato
Ca ²⁺	Cálcio
CCOs	Complexos <i>cumulus</i> oócitos
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
FL	Final da lactação
FSH	Hormônio folículo estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
GVBD	Quebra de vesícula germinativa
IGF-I	Fator de crescimento semelhante a insulina
LH	Hormônio luteinizante
MII	Metáfase II
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MmHg	Milímetro de mercúrio
MPF	Fator promotor F
NaCL	Cloreto de sódio
NEFA	Ácidos graxos não-esterificados
nm	Nanômetro
pH	Potencial hidrogênico
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
RNA _m	RNA mensageiro
TAGs	Triacilgliceróis
VG	Vesícula germinativa

Sumário

1 Introdução.....	11
2 Revisão de Literatura.....	14
2.1 Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos.....	14
2.2 Maturação oocitária.....	15
2.2.1 Maturação nuclear.....	16
2.2.2 Maturação citoplasmática.....	17
2.3 Balanço energético negativo no pós-parto e reprodução.....	18
3 Metodologia.....	20
3.1 Coleta e análise bioquímica dos soros.....	20
3.2 Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos.....	21
3.3 Avaliação da maturação nuclear.....	22
3.4 Análise estatística.....	22
4 Resultados.....	23
5 Discussão.....	26
6 Conclusões.....	29
Referências.....	30
Anexos.....	40

1 Introdução

Nos últimos anos o melhoramento genético em vacas leiteiras a fim de intensificar a produção de leite, tem sido associado a uma redução no desempenho reprodutivo (BOLAND et al., 2001). As semanas próximas ao parto são consideradas críticas para vacas de alta produção. No decorrer deste período, estes animais necessitam de vários ajustes metabólicos para sustentar a transição da gestação para lactação (MULLINS et al., 2012). Segundo Mulligan e Doherty (2008), o período de transição corresponde às 3 semanas que antecedem o parto, se estendendo até 3 semanas após o parto. Este momento é caracterizado por um desequilíbrio entre a ingestão de alimentos e o gasto energético necessário para a produção de leite, chamado de priorização de energia destinada à produção leiteira, acompanhado de um alto grau de lipólise (LEROY et al., 2006).

Além disso, o requerimento de nutrientes para o crescimento fetal atinge os níveis máximos nas três semanas anteriores ao parto, sendo que a ingestão de matéria seca reduz em torno de 10 a 30%, levando a um status fisiológico de balanço energético negativo (BEN) (ESPOSITO et al., 2014). Este BEN induz a uma mobilização das reservas corporais, caracterizando um aumento nas concentrações séricas de ácidos graxos não-esterificados (NEFA) e beta-hidroxibutirato (BHBA) (MARTINEZ et al., 2012). Esta mobilização de tecido adiposo e muscular também é responsável por alterações metabólicas e hormonais como redução de glicose, insulina e fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-I), resultando em um baixo desempenho reprodutivo (O'DOHERTY et al., 2014).

O aumento da NEFA no plasma próximo ao parto está associado ao estresse da gestação e com a redução da ingestão de matéria seca (MCNAMARA et al., 2003). Estes ácidos graxos são constituídos principalmente por gorduras saturadas, incluindo ácido palmitato, estearato, além do ácido graxo monoinsaturado ácido oléico (WATHES et al., 2013). No pós-parto, o NEFA pode ser utilizado como alternativa de energia, sendo oxidado a dióxido de carbono no fígado, ou parcialmente oxidado para produzir corpos cetônicos, (BHBA) e acetato. Ainda, pode

ser esterificado a triacilgliceróis (TAGs), sendo armazenados no fígado, ou exportados como lipoproteínas de baixa densidade (WATHES et al., 2007; WATHES et al., 2013). As concentrações elevadas de NEFA e BHBA estão associadas a uma função folicular comprometida (CHEONG et al., 2015). Segundo Van Hoeck et al. (2011), o aumento de NEFA no sangue se reflete no fluído folicular, interferindo diretamente na viabilidade das células da granulosa e na esteroidogênese, assim como na capacidade de desenvolvimento do oócito.

A primeira ovulação após o parto é geralmente associada ao período crítico do BEN (BUTLER, 2003). Portanto, os oócitos que são ovulados neste momento e que atravessam os estágios iniciais de maturação têm a sua qualidade comprometida (WATHES et al., 2013; SNIJDERS et al., 2001). Visto que, as concentrações foliculares de NEFA são proporcionais aos níveis séricos, interferindo de forma negativa na maturação oocitária (LEROY et al., 2006). Flutuações nas concentrações de gonadotrofinas, fatores de crescimento, esteróides, BHBA, glicose e uréia, podem afetar a competência oocitária, comprometendo o desenvolvimento até o estágio de blastocisto (LEROY et al., 2004).

Em vacas leiteiras, a intensidade do BEN está correlacionada com a retomada da atividade ovariana pós-parto. O principal efeito ocorre a nível hipotalâmico, reduzindo a secreção de GnRH, resultando em menor liberação pulsátil de LH, prejudicando a produção de estrógeno folicular (BUTLER et al., 2006). Estes fatores estão associados a um maior intervalo entre parto e a ovulação. Porém, a principal causa do anestro logo após a parição se deve a uma falha na ovulação, devido à redução de metabólitos que atuam no crescimento e na maturação folicular (SCHNEIDER et al., 2010). A energia necessária para o desenvolvimento folicular, para o crescimento e maturação dos oócitos e para formação do corpo lúteo é desviada para a produção leiteira e para a manutenção da lactação (LEROY et al., 2008).

Contudo, diversos hormônios e fatores do crescimento interferem na fisiologia ovariana (PORETSKY e KALIN, 1987). A insulina e o IGF-I desempenham um papel importante no controle reprodutivo de vacas leiteiras (GONG et al., 2002). O IGF-I está associado a taxa de concepção, idade ao primeiro parto, ovulação e desenvolvimento embrionário (VELAZQUEZ et al., 2008). Estes fatores em conjunto regulam o crescimento folicular, estimulam a proliferação e a diferenciação das células da granulosa, regulam a esteroidogênese, além de atuar como fator

antiapoptótico durante a maturação oocitária (MEIYU et al., 2011). Tendo em vista todos estes eventos reprodutivos após o parto em consequência do BEN, este trabalho teve por objetivo avaliar a suplementação com soro sanguíneo de vacas leiteiras em diferentes períodos da lactação no sistema de produção *in vitro* de embriões bovinos, mais especificamente sobre a taxa de maturação nuclear, clivagem e desenvolvimento embrionário inicial.

2 Revisão de Literatura

2.1 Produção *in vitro* de embriões bovinos

A PIVE é uma biotécnica da reprodução que tem por objetivo a multiplicação de animais geneticamente superiores (DUROCHER et al., 2006). Esta compreende as etapas de maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) dos zigotos (COSTA et al., 2006). Também é uma ferramenta importante para clonagens e pesquisas de animais transgênicos (GILCHRIST e THOMPSON, 2007) possibilitando a escolha de características desejáveis e um menor intervalo entre gerações (HANSEN, 2006). Em bovinos, esta biotecnologia tem sido amplamente utilizada como ferramenta de pesquisa, buscando entender o desenvolvimento embrionário, servindo como instrumento para outras tecnologias (LONERGAN e FAIR, 2008).

O surgimento desta biotecnologia foi marcado pelo nascimento do primeiro bezerro produzido *in vitro* na década de 80. Desde então inúmeros estudos vem sendo realizados envolvendo todas as etapas deste processo (BRACKETT et al., 1982). Contudo, a PIVE apresenta resultados inferiores quando comparada com a produção *in vivo*, devido a fatores que envolvem aspectos morfológicos e moleculares induzidos por diferenças tais como: qualidade oocitária, ambiente folicular, fecundação e ambiente de cultivo dos embriões (CAMARGO et al., 2006). Dos oócitos destinados a MIV, 90% progridem do estágio de prófase I para metáfase II, 80% são fecundados e 30 a 40% se desenvolvem até o estágio de blastocisto (LONERGAN e FAIR, 2016).

Esta biotécnica sofre ainda interferência de fatores intrínsecos dos animais como raça, idade, variação individual e estágios da lactação das doadoras, e também de fatores extrínsecos como manejo sanitário, nutricional e sazonalidade, quando os ovários são obtidos de abatedouros (COSTA et al., 2006). A remoção prematura dos oócitos dos folículos, assim como oócitos aspirados de folículos em diferentes estágios de desenvolvimento também são fatores responsáveis pela menor taxa de desenvolvimento embrionário *in vitro*, quando comparada

in vivo (GUIMARÃES et al., 2015).

A qualidade oocitária é um dos pontos chaves no sucesso da PIVE (RATY et al., 2011), uma vez que, este gameta contribui com material genético e citoplasmático fornecendo transcritos e proteínas essenciais para sustentar o desenvolvimento embrionário (CAMARGO et al., 2006). Durante o crescimento até a aquisição da competência, o oócito passa por diversos eventos bioquímicos, estruturais e citoesqueléticos importantes para completar a maturação, ser fecundado e se desenvolver até o estágio de blastocisto (BERTAGNOLLI et al., 2004). As condições de cultivo também são fundamentais para os eventos de clivagem, ativação do genoma embrionário, compactação, diferenciação e viabilidade fetal após implantação (MOORE et al., 2007).

2.2 Maturação oocitária

A maturação oocitária é um evento fisiológico que precede a fecundação (LONERGAN e FAIR, 2016) incluindo eventos que determinam que o oócito expresse o seu potencial máximo de desenvolvimento após ser fecundado (GOTTARDI e MINGOTI, 2009). Estes eventos são caracterizados por inúmeras transformações bioquímicas e estruturais no núcleo e no citoplasma, fundamentais para o desenvolvimento embrionário (GUEMRA et al., 2013).

Durante a foliculogênese, o oócito acumula componentes essenciais e adquire habilidade para retomar e concluir a meiose, atingindo sua capacidade plena para dar progressão ao ciclo celular (WOUDENBERG et al., 2012). *In vivo* os oócitos são mantidos no ambiente folicular no estágio de vesícula germinativa (VG) até o pico pré-ovulatório de LH, o que estimula a maturação (RICHARD e SIRARD, 1996).

Na PIVE, os oócitos utilizados para a MIV são recuperados de folículos de diferentes estágios de desenvolvimento em níveis diferentes de competência. Estes oócitos retomam a meiose no momento em que são removidos do ambiente folicular, porém os gametas que ainda não completaram a maquinaria citoplasmática não são capazes de se tornarem embriões viáveis (GUIMARÃES et al., 2015). No interior do folículo, os oócitos sofrem alterações estruturais e moleculares para aquisição da competência (RIZOS et al., 2002), ocorre a transcrição de RNAm de origem materna e de proteínas, que são retidas no citoplasma para auxiliar no desenvolvimento.

A remoção dos oócitos do ambiente folicular faz com que estes não estejam mais em contato com os fatores inibitórios da maturação e retomem a meiose. As

células foliculares são responsáveis pela produção destes fatores, mantendo o oócito em bloqueio meiótico (SIRARD e MAYES, 1998). Durante a retomada da meiose, o oócito sofre maturação nuclear, a partir do estado de vesícula germinativa (VG), progride para fases de Metáfase I, Anáfase I e Telófase I, até a extrusão do primeiro corpúsculo polar, onde permanece em Metáfase II até o momento da fecundação (MAYES e SIRARD, 2001). A maturação citoplasmática também é essencial para que o desenvolvimento do gameta e para suportar o desenvolvimento posterior a fecundação (BEVERS et al., 1997; RODRIGUEZ e FARIN, 2004).

2.2.1 Maturação Nuclear

A maturação nuclear refere-se à progressão da meiose no oócito a partir do estágio de diplóteno da prófase I até a fase de metáfase II (GOTTARDI e MINGOTI, 2009). Uma vez removidos do ambiente folicular e cultivados em meio de maturação os oócitos podem retomar espontaneamente a primeira divisão meiótica (RICHARD e SIRARD, 1996). Este processo tem início com a quebra da vesícula germinativa (GVBD), induzido pelo fator promotor da maturação (MPF) (SUGIURA et al., 2006) ocorre a condensação da cromatina, a dissolução da membrana nuclear e o desaparecimento do nucléolo, os cromossomos homólogos se replicam e se separam em dois grupos, cada um contendo a metade do número original de cromossomos (MEINECK et al., 2001; MAYES E SIRARD, 2001). Ao término da primeira divisão meiótica, o citoplasma é dividido assimetricamente, gerando células de tamanhos diferentes, uma menor denominada corpúsculo polar e outra maior, o oócito secundário. O oócito permanece no estágio de metáfase II (MII) até a fecundação (CAN et al., 2003; GOTARDI e MINGOTI, 2009). Após a fecundação, a segunda divisão meiótica é concluída com a progressão da MII até telófase II e a extrusão do segundo corpúsculo polar. A partir deste estágio, o zigoto continua a se replicar por sucessivas divisões mitóticas (MEINECK et al., 2001).

A maioria dos oócitos submetidos a MIV completam a maturação nuclear, porém a maturação citoplasmática determina a habilidade dos oócitos se desenvolverem a estágio de blastocisto após as condições de cultivo *in vitro*. Na produção *in vitro*, esta taxa é baixa de 30 a 40% quando comparada com a produção *in vivo*, uma das razões pode ser explicada pela heterogeneidade dos oócitos utilizados (MEINECK et al., 2001). Para que estes gametas possam sustentar todas as etapas de desenvolvimento são necessárias inúmeras modificações durante o

bloqueio meiótico, que incluem síntese protéica, transcrição de RNAm e reorganização de organelas (CROCOMO et al., 2011). Perturbações de pH, estresse oxidativo e toxinas durante o cultivo *in vitro* podem prejudicar a maturação e predispor os oócitos a defeitos cromossômicos, afetando a competência genética destes (CARRELL et al., 2005).

2.2.2 Maturação Citoplasmática

A maturação citoplasmática envolve uma série de eventos celulares e moleculares que permitem que a fecundação ocorra com sucesso e pode ser dividida em três etapas principais: a redistribuição de organelas, dinâmica do citoesqueleto, e maturação molecular (FERREIRA et al., 2009). A primeira evidência do amadurecimento do citoplasma é durante a condensação do nucléolo, onde o oócito diminui sua atividade transcricional, em seguida ocorre à redistribuição de organelas, redução do complexo de Golgi, aumento do conteúdo lipídico, alinhamento dos grânulos corticais (CAIXETA e DODE, 2010), acúmulo de RNA materno e glutathione (RODRIGUES e FARIN, 2004). As mitocôndrias migram para o espaço perinuclear e os grânulos corticais para abaixo da membrana vitelina, ocorre também à maturação dos mecanismos de liberação de Ca^{2+} (HE et al., 1997).

A maturação citoplasmática envolve eventos de transcrição e tradução de proteínas armazenadas no citoplasma, incluindo a síntese de RNAm. Para este processo, o oócito necessita de uma alta demanda de energia, a qual provém de vários substratos como a glicose, os aminoácidos e lípidos. Em decorrência deste processo várias organelas se tornam mais abundantes, sendo elas as mitocôndrias, complexo de Golgi e retículo endoplasmático (SONGSASEN, 2012). O amadurecimento do citoplasma também é essencial por promover o bloqueio contra a poliespermia, descondensar a cabeça dos espermatozóides, formar os pró-núcleos após a fecundação e sustentar o desenvolvimento embrionário inicial (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005). O bloqueio contra a poliespermia se deve ao endurecimento da zona pelúcida promovido pelo exsudato produzido pelos grânulos corticais (CHERR et al., 1998).

Um dos critérios para avaliação da maturação citoplasmática em mamíferos é a migração dos grânulos corticais para a periferia do oócito (CARNEIRO et al., 2002). Segundo De Matos et al. (1996), a dosagem de glutathione intracelular também pode ser utilizada como parâmetro. Apesar de processos independentes a

maturação nuclear e a maturação citoplasmática, são essenciais para tornar o oócito competente e para assegurar o desenvolvimento embrionário posterior à fecundação (CROCOMO et al., 2011).

2.3 Balanço energético negativo no pós-parto e reprodução

A seleção genética nos últimos anos e os avanços na nutrição visando o aumento da produção leiteira ocasionaram um declínio na fertilidade das fêmeas. Vacas leiteras de alta produção entram em um status de balanço energético negativo (BEN) no periparto, em decorrência do maior requerimento nutricional pelo feto e a ingestão de matéria seca (MS) não ser suficiente para suprir as necessidades individuais (ESPOSITO et al., 2014).

Este BEN no pós-parto afeta de forma negativa a fertilidade e está associado a falhas na ovulação, redução na pulsatilidade de LH, redução nas concentrações de insulina, IGF-I e glicose, levando a um aumento nas concentrações BHBA e NEFA. Os altos níveis de NEFA no fluido folicular levam a uma falha na maturação oocitária e diminuem a viabilidade das células da granulosa e teca (CHEONG et al., 2015). Além disso, a mobilização de gordura e de tecido muscular para a produção de leite durante a lactação provoca alterações metabólicas e hormonais. Essas flutuações estão associadas a um pobre desempenho reprodutivo, atribuído em parte por um microambiente folicular abaixo do ideal e uma reduzida capacidade de desenvolvimento do oócito e subsequente embrião (O'DOHERTY et al., 2014).

O IGF-I auxilia na maturação oocitária e no desenvolvimento embrionário, atua nos ovários através do seu receptor IGF-IR, estimulando a proliferação e a diferenciação celular, impedindo a atresia folicular (WILLIS et al., 1998; ARMSTRONG e WEBB, 1997; EL ROEIY et al., 1994). A insulina promove resposta folicular a gonadotrofinas, participando do crescimento dos folículos. Sendo que a leptina atua diretamente na maturação oocitária estimulando a progressão meiótica, impedindo a apoptose das células do cumulus. A redução destes fatores durante o período de BEN são os principais mecanismos endócrinos que afetam crescimento folicular (LEROY et al., 2008).

Segundo Krause et al. (2014) vacas leiteiras de alta produção estão mais predispostas a sofrer os efeitos negativos do BEN. Além dos eventos metabólicos, a contaminação uterina após o parto pode afetar o desempenho reprodutivo (SHELDON et al., 2006). As doenças uterinas são relacionadas a menores taxas de

concepção, maior intervalo entre parto e concepção, além da redução na produção leiteira (LEBLANC et al., 2002; SHELDON et al., 2009) também estão correlacionadas a menores concentrações séricas de estradiol e progesterona, e com o crescimento mais lento do folículo dominante (SHELDON et al., 2002; WILLIAMS et al., 2007). A maioria das vacas leiteiras após o parto apresentam uma alta carga de microorganismos patogênicos no útero. Porém, a resposta imune de cada animal contra a infecção é determinada pelo grau de intensidade do BEN (GIULIODORI et al., 2013).

3 Metodologia

A produção *in vitro* de embriões bovinos foi realizada no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Clima Temperado, a avaliação da maturação nuclear foi realizada no Laboratório de Reprodução Animal (ReproPel), e a análise bioquímica dos soros foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Molecular da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (UFPeI). O experimento foi executado de março a novembro de 2016. Todos os procedimentos realizados neste trabalho foram aprovados pelo comitê de experimentação animal da UFPeI sob o protocolo: 23110/005315-2009-48.

3.1 Coleta e análise bioquímica dos soros

As amostras sanguíneas foram coletadas de oito animais em diferentes períodos da lactação, quatro animais com $10,8 \pm 4,8$ dias pós-parto (pp) e quatro com $354 \pm 3,8$ dias (pp). Após a coleta, o sangue passou por um processo de centrifugação a 700 G por 20 minutos para obtenção do soro. Para os tratamentos realizou-se o pool dos soros conforme o período pós- parto. FL: soro de vacas no final da lactação (FL), e PP: soro de vacas no pós-parto recente (pp), sendo que, ambos passaram por processo de inativação a 56 °C por 30 minutos. Para controle, utilizou-se soro sanguíneo de ovelha em cio, o qual passou pelo mesmo processo de centrifugação e inativação, como citado anteriormente.

As análises bioquímicas foram realizadas em equipamento analisador automático LABMAX PLENNO com kits comerciais LABMAX (Labtest Diagnostics S.A.). As amostras de haptoglobina foram avaliadas usando um método colorimétrico adaptado com comprimento de leitura de 450 nm conforme metodologia descrita por JONES e MOULD. As análises de cálcio, albumina, triglicerídeos totais e proteínas totais, também foram realizadas pelo método colorimétrico. As concentrações de uréia através de um sistema enzimático por fotometria e ultravioleta, usando cinética de dois pontos em tempo fixo, medida em 340 nm. Para as concentrações de colesterol no soro também se utilizou um método

enzimático, assim como para a quantidade de NEFA na amostra, podendo ser determinada a partir da densidade óptica medida em 550 nm.

3.2 Produção *in vitro* de embriões bovinos

Foram coletados ovários de fêmeas bovinas provenientes de abatedouros locais, transportados para o Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Clima Temperado em recipiente térmico com solução salina (NaCl à 0,9%) acrescido de gentamicina (0,04%) a temperatura de 30°C.

Foram realizadas 13 repetições com 1634 complexos *cumulus* oócitos (CCOs). Estes foram obtidos a partir da aspiração de folículos de 2-8 mm de diâmetro. A aspiração foi realizada com auxílio de bomba a vácuo acoplada a agulha 19G com pressão de 10-12 mmHg, o conteúdo aspirado foi depositado em tubos cônicos de 15 mL previamente esterilizados. Após a sedimentação foi realizada a busca e seleção dos CCOs através de lupa estereoscópica, considerando o grau de compactação das células do *cumulus* e o grau de homogeneidade do citoplasma como critérios de qualidade oocitária descritos por LEIBFRIED e FIRST (1979).

Os oócitos selecionados de grau I e II foram divididos aleatoriamente em três tratamentos, contendo 50 CCOs cada repetição: SO: soro de ovelha em cio usado como controle; FL: soro de vacas com $354 \pm 3,8$ dias pós-parto (pp); PP: soro de vacas com $10 \pm 4,8$ dias (pp). Estes CCOs foram distribuídos em gotas de 400 μ L em meio de maturação TCM 199 (Gibco®), adicionado de (0,01UI/ml FSH (gonal); 5 μ g/mL de LH), piruvato (0,033mM) e antibióticos, enriquecido com 10% de soro conforme os tratamentos e incubados em estufa à 39 °C com 5% de CO₂ e 20% O₂ durante 22 a 24h.

Após a maturação, os oócitos foram transferidos para gotas de 400 μ L de meio FIV (FERT/TALP). Para inseminação foram utilizadas palhetas da mesma partida de sêmen *Bos taurus taurus*. A seleção espermática foi realizada com mini gradiente de percoll, através da centrifugação a 700 G por 5 minutos. O pellet foi transferido para meio de capacitação e novamente centrifugado por 5 minutos a 700 G. A inseminação foi procedida com uma concentração de 1×10^6 espermatozoides/mL. Os oócitos juntamente com os espermatozóides foram mantidos em estufa sob as mesmas condições atmosféricas da MIV durante 20h.

Decorrido este período, os zigotos passaram por sucessivas pipetagens para remoção das células do *cumulus oophorus*. As estruturas recuperadas foram

lavadas três vezes e transferidas para gotas de 200 µL meio de cultivo SOFaa suplementado com 5% de soro ovino e piruvato (0,1826mg) cobertas com óleo à 39 °C com 5% de CO₂ e 20% O₂ durante 7 dias. O momento da inseminação foi considerado como dia 0, a taxa de clivagem foi avaliada no dia 3 (número de clivados/número de inseminados) e a taxa de desenvolvimento embrionário global (blastocistos/número de inseminados) no dia 7. Durante o cultivo embrionário foi efetuada a troca de 30% do meio de cultivo nos dias 3 e 5.

3.3 Avaliação da maturação nuclear

Para a avaliação da maturação nuclear foram utilizadas quatro rotinas com um total de 320 oócitos. Após a MIV, os oócitos passaram por desnudamento para a retirada das células do *cumulus* através de sucessivas pipetagens. Os oócitos desnudados foram fixados por 15min em gotas de 400 µL de paraformaldeído, separados de acordo com os tratamentos e armazenados em 400 µL de Triton a 4°C para posterior avaliação da maturação nuclear.

Para avaliação da maturação, os oócitos foram corados com Hoechst® (15 µm/mL) durante 10min, transferidos para gotas de Mowiol® e avaliados em microscópio de fluorescência conforme os estágios de maturação: vesícula germinativa (VG), quebra de vesícula germinativa (QVG), primeira fase da meiose (MI), anáfase, telófase e segunda fase da meiose (MII).

Para a análise dos resultados, os oócitos foram divididos em dois grupos: maduros e imaturos. Foram considerados como maduros, os oócitos que atingiram o estágio de MII após 22 horas de cultivo e considerados imaturos aqueles que após esse período permaneceram nos estágios de RGV e MI, conforme metodologia descrita por WOUTENBERG et al. (2012).

3.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do software Statistix 10® (2014). Os dados que apresentaram distribuição não paramétrica foram transformados em asceno (FOWLER, CHOEN e JARVIS, 1998) e após analisados. A análise dos parâmetros bioquímicos do soro sanguíneo foi realizada através do Teste t de Student e a análise das taxas de clivagem, desenvolvimento embrionário e maturação nuclear foram realizados através do teste ANOVA, com teste Tukey para comparação de médias ($P < 0,05$).

4 Resultados

De acordo com a análise da produção leiteira, porcentagem de proteína e contagem de células somáticas, não encontramos diferença entre os grupos avaliados neste estudo, contudo o grupo PP apresentou porcentagem de gordura superior ao grupo FL conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1: Média da produção leiteira, porcentagem de gordura, proteína e contagem de células somáticas nos grupos PP e FL.

	Final da Lactação (FL)	Pós-parto (PP)	Valor de P
Produção de leite (kg/dia)	32,4 ± 13,6 ^a	18,8 ± 7,7 ^a	0,0288
Gordura (%)	2,8 ± 0,5 ^a	3,3 ± 0,3 ^b	0,8179
Proteína (%)	3,4 ± 0,5 ^a	3,6 ± 0,3 ^a	0,5026
CCS	100.857 ^a	137.857 ^a	

CCS: contagem de células somáticas. Letras diferentes entre linhas significam diferença estatística.

Segundo análises bioquímicas realizadas individualmente nos animais dos diferentes grupos, as concentrações de colesterol foram significativamente superiores nos animais do grupo FL. Entre os demais metabólitos avaliados não foi observada diferença como apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. Média dos parâmetros bioquímicos avaliados no soro sanguíneo, erro padrão e valor de P nos animais dos grupos final da lactação (FL) e pós-parto (PP).

Metabólito	Pós-parto	Final da lactação	Valor de P
Albumina (mg/dL)	2,43 ± 0,08	2,65 ± 0,07	0.088
Cálcio (mg/dL)	9,35 ± 0,50	9,95 ± 0,12	0.322
Colesterol (mg/dL)	92,75 ± 10,54	238,25 ± 19,45	0.002
P. totais (g/dL)	8,23 ± 0,31	8,69 ± 0,27	0.312
Triglicerídeos (mg/dL)	12,50 ± 3,12	71,50 ± 29,94	0.143
Uréia (mg/dL)	13,75 ± 1,65	17,75 ± 4,15	0.422
PON1 (U/mL)	81,55 ± 11,39	110,15 ± 13,27	0.154
NEFA (mmol/L)	0,26 ± 0,04	0,33 ± 0,02	0.154

Dados apresentados como média ± erro padrão.

Análise bioquímica dos metabólitos sanguíneos no pool de soro inativado de ovelha em cio, de vacas no final da lactação e de vacas no pós-parto recente, Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros bioquímicos avaliados no pool de soro inativado dos grupos soro ovino (SO), final da lactação (FL) e pós-parto (PP).

Metabólito	Pool SO	Pool FL	Pool PP
Albumina (mg/dL)	2,62	3,29	3,33
Cálcio (mg/dL)	10,15	8,53	9,32
Colesterol (mg/dL)	106	222	103
P. totais (g/dL)	7,2	8,91	8,83
Triglicerídeos (mg/dL)	16	16	13
Uréia (mg/dL)	31	27	28
Hapto (g/L)	1,44	1,94	0,92
NEFA (mmol/L)	0,498	0,479	0,549
BHBA (mmol/L)	0,30	0,65	0,78

Conforme os resultados deste trabalho, não houve diferença entre o número de oócitos que atingiram a fase de MII entre os tratamentos: SO 83,2%, FL 76,8% e PP 82,2%. Os resultados da avaliação nuclear são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Taxa de maturação nuclear (maturos ou imaturos / total avaliados) nos tratamentos soro ovino (SO), final da lactação (FL) e pós-parto (PP).

Tratamento	Maturos n (%)	Imaturos n (%)
SO	89/107(83,2%)	18/107(16,8%)
FL	86/112(76,8%)	26/112(23,2%)
PP	83/101(82,2%)	18/101(17,8%)

As taxas de clivagem para os diferentes tratamentos foram: soro ovino 69,9% (386/577), final da lactação 59,3% (320/540), pós-parto recente 47% (243/517), apresentando diferença entre os tratamentos soro ovino e pós-parto ($P=0,008$). O desenvolvimento embrionário foi maior no tratamento soro ovino 22,7% (131/577) quando comparado com os demais tratamentos, final da lactação 15% (81/540) e pós-parto 16,6% (80/517) ($P=0,01$) como mostra a Tabela 5.

Tabela 5: Taxa de clivagem e de desenvolvimento embrionário na PIVE de oócitos bovinos suplementados com soro ovino (SO), final da lactação (FL) e pós-parto (PP) durante a MIV.

Tratamento	Clivagem	Desenvolvimento embrionário
SO	386/577 (66,9%) ^a	131/577 (22,7%) ^a
FL	320/540 (59,3%) ^{ab}	81/540 (15%) ^b
PP	243/517 (47%) ^b	86/517 (16,6%) ^b

Letras diferentes entre colunas significam diferença estatística ($P<0,05$).

Não observamos diferença na cinética de desenvolvimento embrionário avaliada no dia D7 entre os tratamentos SO, FL e PP.

Tabela 6: Cinética de desenvolvimento embrionário de oócitos suplementados durante a MIV com soro ovino (SO), soro de vacas no final da lactação (FL) e soro de vacas no pós-parto (PP).

Trat	Bi	Bl	Bx	Bn	Be
SO	42/577 (7,3%)	43/577 (7,5%)	30/577 (5,2%)	8/577 (1,4%)	8/577 (1,4%)
FL	30/540 (5,6%)	16/540 (2,9%)	23/540 (4,3%)	3/540 (0,6%)	5/540 (0,9%)
PP	35/517 (6,7%)	10/517 (1,9%)	27/517 (5,2%)	1/517 (0,2%)	13/517 (2,5%)

Bi: blastocisto inicial, Bl: blastocisto, Bx: blastocisto expandido, Bn: blastocisto eclodindo, Be: blastocisto eclodido.

5 Discussão

Vários estudos relatam que a suplementação de soro sanguíneo no meio de MIV é benéfica para a maturação dos oócitos e para o desenvolvimento embrionário. Neste trabalho foi utilizado um pool inativado de soro sanguíneo de animais em diferentes períodos da lactação no meio de maturação de oócitos bovinos. No entanto, a PIVE foi realizada apenas como ferramenta para averiguar se os diferentes status metabólicos destes animais iriam interferir na reprodução, baseando-se no modelo *in vitro*. Contudo, neste trabalho não houve diferença entre a taxa de clivagem e de desenvolvimento embrionário entre os tratamentos final da lactação e pós-parto recente. Esperávamos menores taxas de clivagem e menor número de blastocistos no grupo de oócitos suplementados com soro sanguíneo de vacas no pós-parto recente, devido à condição metabólica destes animais. Visto que neste período, devido à grande demanda de nutrientes para a glândula mamária, associada a uma redução da ingestão alimentos, estes animais entram em BEN, induzindo a mobilização das reservas corporais, interferindo de forma negativa na fertilidade (MARTINEZ et al., 2012).

O ambiente metabólico adverso leva a alterações endócrinas e no perfil transcricional dos folículos ovarianos (O'DOHERTY et al., 2014). Nessas fases há um aumento na liberação de corpos cetônicos, BHBA e NEFA, entre outros (CHAPINAL et al., 2012). Os efeitos tóxicos do NEFA interferem na qualidade oocitária (LEROY et al., 2008). Pesquisas *in vitro* demonstraram um efeito negativo da ação dos ácidos palmítico e esteárico sobre viabilidade das células da granulosa em humanos (MU et al., 2001). Segundo Van Holde et al. (2005) em bovinos, os ácidos graxos não esterificados inibem a proliferação e a sobrevivência das células da granulosa. Em um estudo realizado por Jorritsma et al. (2004), a presença de NEFA no meio de MIV, retardou a progressão a meiose dos oócitos, a fecundação, clivagem e desenvolvimento dos blastocistos. Além disso, a presença de NEFA no fluido folicular afeta a esteroidogênese, assim como a capacidade de desenvolvimento do oócito (VAN HOECK et al., 2011).

No entanto, os parâmetros bioquímicos avaliados no soro sanguíneo coletado das vacas nas diferentes fases da lactação e de soro ovino não apresentaram diferenças significativas. As concentrações de NEFA avaliadas nas amostras sanguíneas de soro ovino, soro de vacas no final da lactação e de vacas no pós-parto recente foram muito similares. As concentrações sanguíneas de NEFA são consideradas como o melhor indicador do balanço de energia de vacas leiteiras (REIST et al., 2002). Segundo Leblanc et al. (2005), níveis séricos de NEFA acima de 0,50 mmol/L estão associados a maiores riscos de desordens metabólicas. Este evento pode explicar o fato do grupo PP ter apresentado valores similares ao grupo FL, pois devido às adequadas condições de manejo e alimentação, estes animais não passavam por um BEN tão severo.

A maturação oocitária é um evento fisiológico que precede a fecundação e consiste em uma série de transformações nucleares e citoplasmáticas necessárias para tornar o oócito competente, garantindo um desenvolvimento embrionário bem sucedido (LONERGAN e FAIR, 2016). Neste trabalho não houve diferença no número de oócitos que atingiram o estágio de metáfase II (maturaram) entre os tratamentos. Segundo Crocomo et al. (2011), quando os complexos *cumulus* oócitos (CCOs) são removidos do ambiente folicular, estes perdem o contato com os fatores inibitórios da maturação e retomam de forma espontânea a meiose, independente do grau de maturidade do citoplasma. Assim como, estudos realizados por Rodrigues-Cunha et al. (2016), afirmam que a maturação nuclear, taxa de clivagem e de blastocistos são dependentes das condições da MIV, concordando com o exposto por Gottardi e Mingoti (2009), que relatam que as condições de cultivo *in vitro* são essenciais para a capacitação do oócito e desenvolvimento embrionário.

A avaliação da taxa de clivagem pode ser utilizada como parâmetro para determinar o sucesso da MIV e da PIVE, neste trabalho a taxa de clivagem foi avaliada três dias após a FIV. O grupo pós-parto apresentou clivagem diminuída em comparação ao grupo controle. Oba et al. (2013) observaram maiores taxas de clivagem utilizando soro de vacas de alto escore de condição corporal, com baixas concentrações de NEFA no meio de CIV quando comparado ao soro bovino comercial. Neste trabalho no grupo controle, o meio de maturação foi suplementado com soro de ovelhas em cio, e também apresentou uma maior porcentagem de blastocistos no dia 7 do cultivo embrionário. Durante o ciclo estral dos ovinos, os hormônios gonadotróficos secretados pela hipófise controlam o desenvolvimento

folicular e a esteroidogênese, resultando na produção de estrógenos (FONSECA, 2005). A suplementação com gonadotrofinas e esteróides no meio de MIV pode ser utilizada para promover a maturação dos oócitos fora do ambiente folicular (COELHO et al., 2002). Segundo Fukui et al. (1982), a suplementação de estradiol no meio de MIV é benéfica para maturação nuclear e promove a síntese do fator de crescimento do prónucleo masculino em oócitos imaturos. Em um estudo realizado por Coelho et al., (2002) a fonte de estrógeno utilizada no meio de maturação de oócitos bovinos foi soro de vaca em estro, semelhante a este trabalho onde utilizamos soro de ovelha em cio no meio de MIV como controle. Contudo, estes autores citam que a desvantagem do uso de soro de vaca em estro se deve a incapacidade de definir a identificação exata de todos componentes, assim como a concentração hormonal. Lorenzo et al. (1995) mencionam que tanto a adição de soro fetal bovino como soro de vaca em estro ao meio de maturação, aumentam a ação dos fatores de crescimento EGF e IGF, contribuindo com a expansão das células do *cumulus* e maturação nuclear. Neste trabalho, no grupo controle, onde utilizamos soro de ovelha em cio no meio de MIV, observaram-se melhores resultados quando comparado com os tratamentos FL e PP. Em um trabalho realizado por Shabankareh et al. (2011), a utilização de soro de ovelha em estro no meio de MIV de oócitos ovinos, apresentou melhores taxas de maturação nuclear quando comparada com a suplementação com soro de cabra em estro, com fluído folicular ovino e fluído folicular bovino.

A PIVE é realizada em laboratórios de pesquisas e comerciais. Nos últimos anos esta biotécnica passou por vários avanços com o objetivo de aumentar as taxas de blastocistos (VARAGO et al., 2008). Neste estudo realizamos a PIVE como ferramenta para analisar o efeito da suplementação de soro sanguíneo de vacas em diferentes períodos metabólicos no meio de maturação de oócitos bovinos sobre as taxas de clivagem e de desenvolvimento embrionário inicial, porém, não houve diferença significativa no número de oócitos clivados e na produção de blastocistos. Visto que, os animais não apresentaram BEN severo no período de coleta do soro, como mostraram os resultados bioquímicos das amostras sanguíneas.

6 Conclusões

Concluimos que nas condições desse estudo, a suplementação com soro sanguíneo de vacas leiteiras em diferentes períodos da lactação no meio de MIV de oócitos bovinos, não interferiu na taxa de maturação nuclear, na taxa de clivagem e de desenvolvimento embrionário inicial.

Referências

ARMSTRONG, D.G.; WEBB, R. Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. **Reviews in Reproduction**, v.2, p.139-146, 1997.

BERTAGNOLLI, A.C.; GONÇALVES, P.B.D.; GIOMETTI, I.C.; COSTA, L.F.S.; OLIVEIRA, J.F.C.; GONÇALVES, I.D.V.; BARRETO, K.P.; EMANUELLI, I.P.; BORGES, L.F.K. Interação entre células do cumulus e atividade da proteína quinase C em diferentes fases de maturação nuclear de oócitos bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.4, 2004.

BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S.J.; HURK, R.V.; IZADVAR, F. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. **Theriogenology**, v.47, p.13-22, 1997.

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

BRACKETT, B.; BOUSQUET, D.; BOICE, M.; DONARCICK, W.J.; EVANS, J.F.; DRESSELM, A. Normal development following *In vitro* fertilization in the cow. **Biology of Reproduction**, v.27, p.147-158, 1982.

BUTLER, S.T.; PELTON, S.H.; BUTLER, W.R. Energy balance, metabolic status, and the first postpartum ovarian follicle wave in cows administered propylene glycol. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.2938-2951, 2006.

BUTLER, S. T.; MARR, A. L.; PELTON, S. H.; RADCLIFF, R. P.; LUCY, M. C.; BUTLER, W. R. Insulin restores GH responsiveness during lactation-induced negative energy balance in dairy cattle: effects on expression of IGF-I and GH receptor 1A. **Journal of Endocrinology**, v. 176, p. 205–217, 2003.

BUTLER, W.R. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. **Animal Reproduction Science**, v.60, p.449-457, 2000.

CAIXETA, E.S.; DODE, M.A.N.; Avaliações da competência ovocitária em bovinos. **Veterinária e Zootecnia**, v.17, n.1, p.8-18, 2010.

CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M.; RAMOS, A.A.; VALE FILHO, V.R. Factors influencing *in vitro* embryo production. **Animal Reproduction**. v.3, n.1, p.19-28, 2006.

CAN, A.; SEMIZ, O.; ÇINAR, O. Centrosome and microtubule dynamics during early stages of meiosis in mouse oocytes. **Molecular Human Reproduction**, v.9, n.12 p.749-756, 2003.

CARNEIRO, G.F.; LIU, I.K.M.; HYRE, D.; ANDERSON, G.B.; LORENZO, P.L.; BALL, B.A. Quantification and distribution of equine oocyte cortical granules during meiotic maturation and after activation. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v.63, p.451-8, 2002.

CARREL, D.T.; LIU, L.; HUANG, I.; PETERSON, M. Comparison of maturation, meiotic competence, and chromosome aneuploidy of oocytes derived from two protocols for in vitro culture of mouse secondary follicles. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 22, p.347-354, 2005.

CHAPINAL, N.; CARSON, M.E.; LEBLANC, S.J.; LESLIE, K.E.; GODDEN, S.; CAPEL, M.; SANTOS, J.E.P. The association of serum metabolites in the transition period with milk production and early-lactation reproductive performance. **Journal of Dairy Science**. v.95, p.1301–1309, 2012.

CHEONG, S.H.; SÁ FILHO, O.G.; ABSALÓN-MEDINA, V.A.; PELTON, S.H.; BUTLER, W.R.; GILBERT, R.O. Metabolic and endocrine differences between dairy cows that do or do not ovulate first postpartum dominant follicles. **Biology of Reproduction**, v. 94, p. 1-11, 2015.

CHERR, G.N.; DROBNIS, E.Z.; KATZ, D.F. Localization of cortical granule constituents before and after exocytosis in the hamster egg. **Journal of Experimental Zoology**, v. 246, p. 81-93, 1988.

COELHO, L.A.; ESPER, C.R.; ALVAREZ, R.H.; VANTINI, R.; JUNIOR, I, L, A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: utilização de diferentes fontes de gonadotrofinas na maturação dos oócitos. **Revista Brasileira e Pesquisa Agropecuária**, n.3, v.31, p.1117-1121, 2002.

COSTA, D.D.; PEREIRA, M.M.; DIAS, L.O.P.; SERAPIÃO, R.V.; POLISSENI, J.; FOLHADELLA, I.M.; RAMOS, A.A.; CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M.; SÁ, W.F. Efeito sazonal sobre a produção de embriões bovinos produzidos *in vitro* em região tropical. In: XXIX Semana de Biologia e XII Mostra de Produção Científica – UFJF Diretório Acadêmico de Ciências Biológicas - Walter Machado Couto, 2006.

CROCOMO, L.F.; MARQUES FILHO, W.C.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; BICUDO, S.D. Aspectos bioquímicos e ultraestruturais da maturação oocitária. **Veterinária e Zootecnia**, v.18, n.4, p.542-552, 2011.

DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.C.; MOSES, D.F.; MARTINEZ, A.G.; MATKOVIC, M. Stimulation of glutathione synthesis of in vitro matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. **Molecular Reproduction and Development**, v.45, p.451-457, 1996.

DUROCHER, J.; MORIN, N.; BLONDIN, P. Effect of hormonal stimulation on bovine follicular response and oocyte developmental competence in a commercial operation. **Theriogenology**, v.65, p.102-105, 2006.

ESPOSITO, G.; IRONS, P.C.; WEBB, E.C.; CHAPWANYA, A. Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v.144, p.60-71, 2014.

EL-ROEIY, A.; CHEN, X.; ROBERTS, V.J.; SHIMASAKAI, S.; LING, N.; LEROITH, D.; ROBERTS JUNIOR, C.T.; YEN, S.S. Expression of the genes encoding the insulin-like growth factors (IGF-I and II), the IGF and insulin receptors, and IGF-binding proteins-1-6 and the localization of their gene products in normal and polycystic ovary syndrome ovaries. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.78, p.1488-1496, 1994.

FERREIRA, E.M.; VIREQUE, A.A.; ADONA, P.R.; MEIRELLES, F.V.; FERRIANI, R.A.; NAVARRO, P.A.A.S. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v.71, p.836-848, 2009.

FONSECA, J.F. Strategies to control the estrous cycle and superovulation in sheep and goats. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, v.16, 2005. Goiânia. **Anais do**. Goiânia, 2005. p. 1-9.

FOWLER, J.; COHEN, L.; JARVIS, P. Practical statistics for field biology. 2.ed. Cichesster: Wiley. 259p, 1998.

FUKUI, Y.; FUKUSHIMA, M.; TERAWAKI, Y. I. Effect of gonadotropins, steroids and culture media on bovine oocyte maturation in vitro. **Theriogenology**, v.18, p.161-175, 1982.

GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. Oocyte maturation: Emerging concepts and Technologies to improve developmental potential in vitro. **Theriogenology**, v.67, p.6–15, 2007.

GIULIODORI, M.J., MAGNASCO, R.P., BECU-VILLALOBOS, D., LACAU-MENGIDO, I.M., RISCO, C.A., DE LA SOTA, R.L. Metritis in dairy cows: Risk factors and reproductive performance. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 3621-31, 2013.

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

GOTTARDI, F.P.; MINGOTI, G.Z. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, n.2, p.82-94, 2009.

GUEMRA, S.; MONZANI, P.S.; SANTOS, E.S.; ZANIN, R.; OHASHI, O.M.; MIRANDA, M.S.; ADONA, P.R. Maturação *in vitro* de oócitos bovinos em meios suplementados com quercetina e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, n6, p.1616-1624, 2013.

GUIMARÃES, A.L.S.; PEREREIRA, S.A.; LEME, L.O.; DODE, M.A.N. Evaluation of the simulated physiological oocyte maturation system for improving bovine in vitro embryo production. **Theriogenology**, v.83, p.52–57, 2015.

HANSEN, P.J. Realizing the promise of IVF in cattl an overview, **Theriogenology**, Flórida, v.65, p.119–125, 2006.

HE, C.L.; DAMIANI, P.; PARYS, J.B.; FISSORE, R.A. Calcium, calcium release receptors, and meiotic resumption in bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 1245-1255, 1997.

JORRISTMA, R.; CÉSAR, M.L.; HERMANS, J.T.; KRUITWAGEN, C.L.J.J.; VOS, P.L.A.M.; KRUIP, T.A.M. Effects of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cells and developmental potential of oocytes in vitro. **Animal Reproduction Science**, v. 81, p.225-235, 2004.

JORRITSMA, R.; DE GROOT, M.W.; VOS, P.A.L.M.; KRUIP, T.A.M.; WENSING, TH.; NOORDNUIZEN, J.P.T.M. Acute fasting in heifers as a model for assessing the

relationship between plasma and follicular fluid NEFA concentrations. **Theriogenology**, v.60, p.151-161, 2003.

KRAUSE, A.R.T.; PFEIFER, L.F.M.; MONTAGNER, P.; WESCHENFELDER, M.M.; SCHWEGLER, E.; LIMA, M.E.; XAVIER, E.G.; BRAUNER, C.C.; SCHMITT, E.; DEL PINO, F.A.B.; MARTINS, C.F.; CORRÊA, M.N.; SCHNEIDER, A. Associations between resumption of postpartum ovarian activity, uterine health and concentrations of metabolites and acute phase proteins during the transition period in Holsteincows. **Animal Reproduction Science**, v.145, p.8-14, 2014.

LEBLANC, S. J.; DUFFIELD, T. F.; LESLIE, K. E.; BATEMAN, K. G.; KEEFE, G. P.; WALTON, J. S. et al. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis, and its impact on reproductive performance in dairy cows. **J Dairy Sci**, v.85, p.2223-2236, 2002.

LEBLANC, S.J.; LESLIE, K.E.; DUFFIELD, T.F. Metabolic predictors of displaced abomasum in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.159–170, 2005.

LEIBFRIED, L.; FIRST, N.L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. **Journal Animal Science**, v.48, n.1, p.76-86, 1979.

LEROY, J.L.M.R.; OPSOMER, G.; DE VliegHER, S.; VANHOLDER, T.; GROSSENS, L.; GELDHOF, A.; BOLS, P.E.J. Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? **Reproduction in Domestic Animals**, v.43, p.612-622, 2008.

LEROY, J.L.M.R.; VANHOLDER, T.; DELANGHE, J.R.; OPSOMER, G.; VAN SOOM, A.; BOLS, P.E.J.; DEWULF, J.; KRUIF, A. Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum. **Theriogenology**, v.62, p.1131-1143, 2004.

LEROY, J.L.M.R.; VANHOLDER, T.; MATEUSEN, B.; CHRISTOPHE, A.; OPSOMER, G.; KRUIF, A.; GENICOT, G.; VAN SOOM, A. Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes *in vitro*. **Reproduction**, v.130, p. 485–495, 2005.

LEROY, J.L.M.R.; VANHOLDER, T.; OPSOMER, G.; VAN SOOM, A.; KRUIF, A. The *in vitro* development of bovine oocytes after maturation in glucose and *b*-hydroxybutyrate concentrations associated with negative energy balance in dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v.41, p.119-123, 2006.

LEIBFRIED, L.; FIRST, N.L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. **Journal Animal Science**, v.48, n.1, p.76-86, 1979.

LONERGAN, P.; FAIR, T. In vitro-produced bovine embryos Dealing with the warts. **Theriogenology**, Dublin, v.69, p.17–22, 2008.

LONERGAN, P.; FAIR, T. Maturation of oocytes in vitro. **Annual Review of Animal Biosciences**. n.4, p.255-68, 2016.

LORENZO, P.L.; ILLERA, M.J.; ILLERA, M. Role of EGF, IGF-I, sera and cumulus cells on maturation in vitro of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.44, p.109-118, 1995.

MARTINEZ, N.; RISCO, C.A.; LIMA, F.S.; BISINOTTO, R.S.; GRECO, L.F.; RIBEIRO, E.S.; MAUNSELL, F.; GALVÃO, K.; SANTOS, J.E.P. Evaluation of periparturient calcium status, energetic profile, and neutrophil function in dairy cows at low or high risk of developing uterine disease. **Journal of Dairy Science**, v.95, p.7158-7172, 2012.

MATOKA, S.; O'HARA, L.; CARTER, F.; KELLY, A.K.; FAIR, T.; RIZOS, D.; LONERGAN, P. The association between metabolic parameters and oocyte quality early and late postpartum in Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.95, p.1257–1266, 2012.

MAYES, M.; SIRARD, M.A. The influence of cumulus-oocyte complex morphology and meiotic inhibitors on the kinetics of nuclear maturation in cattle. **Theriogenology**, v.55, p.911-922, 2001.

MCNAMARA, S.; MURPHY, J.J.; RATH, M.; O'MARA, F.P. Effects of different transition diets on energy balance, blood metabolites and reproductive performance in dairy cows. **Livestock Production Science**, v. 84, p.195–206, 2003.

MEINECKE, B.; JANAS, U.; PODHAJSKY, E.; MEINECKE-TILLMANN, S. Histone H1 and MAP kinase activities in bovine oocytes following protein synthesis inhibition. **Reproduction in Domestic Animal**, v.36, p.183-188, 2001.

MEIYU, QI.; ROTH, ZVI.; LIU DI. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) in reproduction system of female bovine. **Journal of Northeast Agricultural University**, v.18, n.4, p.84-87, 2011.

MOORE, K.; GUEZ-SALLABERRY, C.J.; KRAMER, J.M.; JOHNSON, S.; WROCLAWS, E.; GOICOA, S.; NIASARI-NASLAJI, A. In vitro production of bovine embryos in medium supplemented with a serum replacer: Effects on blastocyst development, cryotolerance and survival to term. **Theriogenology**, v.68, p.1316–1325, 2007.

MU, Y.M.; YANASE, T.; NISHI, Y.; TANAKA, A.; SAITO, M.; JIN, CH.; MUKASA, C.; OKABE, T.; NOMURA, M.; GOTO, K.; NAWATA, H. Saturated FFAs, palmitic acid and stearic acid, induce apoptosis in human granulosa cells. **Endocrinology**, v.142, n.8, p.3590-7, 2001.

MULLINS, C.R.; MAMEDOVA, L.K.; BROUK, M.J.; MOORE, C.E.; GREEN, H.B.; PERFIELD, K.L.; SMITH, F.; HARNER, J.P.; BRADFORD, B.J. Effects of monensin on metabolic parameters, feeding behavior, and productivity of transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.95, p.1323–1336, 2012.

MULLIGAN, F.J.; DOHERTY, M.L. Production diseases of the transition cow. **The Veterinary Journal**, v.176, p.3-9, 2008.

O'DOHERTY, A.M.; O'GORMAN, A.; NAIB, A.; BRENNAN, L.; DALY, E.; DUFFY, P.; FAIR, T. Negative energy balance affects imprint stability in oocytes recovered from postpartum dairy cows. **Genomics**, v.104, p.177-185, 2014.

PEREIRA, Sidney Alcântara. **Efeito da Presença da Insulina-Transferrina-Selênio (ITS) e L-ácido Ascórbico (AA) na Produção in vitro de Embriões Bovinos**. 2013. 70 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

PORETSKY, L.; KALIN, M. F. The gonadotropic function of insulin. **Endocrine Reviews**, v. 8, p. 132–141, 1987.

RATY, M.; KETOJA, E.; PITKANEN, T.; AHOLA, V.; KANANEN, K.; PEIPPO, J. In vitro maturation supplements affect developmental competence of bovine cumulus–oocyte complexes and embryo quality after vitrification. **Cryobiology**, v. 63, p.245-255, 2011.

REIST, M.; ERDIN, D.; VON EUW, D.; TSCHUEMMERLIN, K.; LEUENBERGER, H.; CHILIARD, Y.; HAMMON, H. M.; MOREL, C.; PHILIPONA, C.; ZBINDEN.; KUENZI, N.; BLUM, J. W. Estimation of energy balance at the individual and herd level using blood and milk traits in high-yielding cows. **Journal Dairy Science**, v. 85, p.3314-3327, 2002.

RICHARD, F. J.; SIRARD, M. A. Effects of follicular cells on oocyte maturation. II. Theca cell inhibition of bovine oocyte maturation in vitro. **Biology of Reproduction**, v.54, n.1, p.22-28, 1996.

RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus in vivo: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction Development**, v.61, p.234-248, 2002.

RODRIGUES-CUNHA, M.C.V.; MESQUITA, L.G.; BRESSAN, F.; COLLADO, M.; BALIEIRO, J.CC.; SCHWARZ, K.RK.; CASTRO, F.C.; WATANEBE, O.Y.; WATANABE, Y.F.; COELHO, L.A.; LEAL, C. LV. Effects of melatonin during in vitro maturation in defined medium on oocyte meiosis, oxidative stress and subsequent embryo development. **Theriogenology**, v.86, p. 1685-1694, 2016.

RODRIGUEZ, K.F.; FARIN, C.E. Developmental capacity of bovine cumulus oocyte complexes after transcriptional inhibition of germinal vesicle breakdown. **Theriogenology**, v.61, p.1499–1511, 2004.

SCHNEIDER, A.; PFEIFER, L.F.M.; HAX, L.T.; PALUDO, G.R.; DEL PINO, F.A.B.; DIONELLO, N.J.L.; CORRÊA, M.N. Insulin-like growth factor and growth hormone receptor in postpartum lactating beef cows. **Revista de Pesquisa Brasileira de Agropecuária**, Brasília, v.45, n.8, p.925-931, 2010.

SHELDON, I.M., NOAKES, D.E., RYCROFT, A.N., PFEIFER, D.U., DOBSON, H. Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovar-ian dominant follicle selection and follicle growth and function incattle. **Reproduction**, v.123, p.837–845, 2002.

SHELDON, I.M., LEWIS, G.S., LEBLANC, S., GILBERT, R.O. Defin-ing postpartum uterine disease in cattle. **Theriogenology**, v.65, p.1516–1530, 2006.

SHELDON, I. M.; CRONIN, J.; GOETZE, L.; DONOFRIO, G.; SHUBERTH, H. J. Defining Postpartum Uterine Disease and the Mechanisms of Infection and Immunity in the Female Reproductive Tract in Cattle. **Biol Reprod**, v.81, p.1025-1032, 2009.

SHABANKAREH, H.K.; SARSAIFI, K.; MEHRANNIA. In vitro maturation of ovine oocytes using different maturation media: effect of human menopausal serum. **Journal Assisted Reproduction and Genetics**, v.28, n.6, p.531-537, 2011.

SINARD, M.A.; RICHARD, F.; MAYES, M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. **Theriogenology**, v.49, p.483-497, 1998.

SNIJDERS, S. E., DILLON, P., O'CALLAGHAN, D., AND BOLAND, M. P. Effect of genetic merit, milk yield, body condition and lactation number on in vitro oocyte development in dairy cows. **Theriogenology**, v. 53, p. 981–989, 2001.

SONGSASEN, N. Energy metabolism regulating mammalian oocyte maturation. **Meiosis - Molecular Mechanisms and Cytogenetic Diversity**, v.9, p.174-186, 2012.

SUGIURA, K.; NAITO, K.; ENDO, T.; TOJO, H. Study of germinal vesicle requirement for the normal kinetics of maturation/MPhase- promoting factor activity during porcine oocyte maturation. **Biology of Reproduction**, v.74, p.593-600, 2006.

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

VAN HOECK, V.; STURMEY, R.G.; BERMEJO-ALVAREZ, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN.; LEESE, H.J.; BOLS, P. E.J.; LEROY, J.L.M. Elevated non-esterified fatty acid concentrations during bovine oocyte maturation compromise early embryo physiology. **Plos One**, v.6, e23183, 2011.

VANHOLDER, T.; LEROY, J, L, M, R.; VAN SOOM, OPSOMER, G.; MAES, D.; CORYN, M.; KRUIF, A. Effect of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cell steroidogenesis and proliferation in vitro. **Animal Reproduction Science**, v. 87, p. 33-44, 2005.

VARAGO, F.C.; MENDONÇA, L.F.; LAGARES, M.A. Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, n.2, p.100-109, 2008.

VELAZQUEZ, M.A.; SPICER, L.J.; WATHES, D.C. The role of endocrine insulin-like growth factor-I (IGF-I) in female bovine reproduction. **Domestic Animal Endocrinology**, v.35, p.325-342, 2008.

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

WATHES, D.C.; FENWICK, M.; CHENG, Z.; BOURNE, N.; LLEWELLYN, S.; MORRIS, D.G.; KENNY, D.; MURPHY, J.; FITZPATRICK, R. Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow. **Theriogenology**, v. 68, p.32-41, 2007.

WILLIS, D.S.; MASON, H.D.; WATSON, H.; FRANKS, S. Developmentally regulated responses of human granulosa cells to insulin-like growth factors (IGFs): IGF-I and IGF-II action mediated via the type-I IGF receptor. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.83, p.1256-1259, 1998.

WILLIAMS, E.J., FISCHER, D.P., NOAKES, D.E., ENGLAND, G.E., RYCROFT, A., DOBSON, H., SHELDON, I.M. Uterine infection perturbs ovarian function in the postpartum dairy cow. **Theriogenology**, v.68, p.549–559, 2007

WOUDENBERG, A.B.V.; GROLLERS-MULDERIJ, M.; SNEL, C.; JEURISSEN, N.; STIERUM, R.; WOLTERBEEK, A. The bovine oocyte in vitro maturation model: A potential tool for reproductive toxicology screening. **Reproductive Toxicology**, v.34 p. 251–260, 2012.

Anexos

Anexo I - Documento da Comissão de Ética e Experimentação Animal



Pelotas, 01 de março de 2010.

De: Prof. Dr. Orlando Antonio Lucca Filho

Pres. da Comissão de Ética e Experimentação Animal (CEEA)

Para: Prof. Márcio Nunes Corrêa

Departamento de Clínicas Veterinária

Faculdade de Veterinária

Senhor Professor:

A CEEA analisou o projeto intitulado: **“Efeito da administração de diferentes doses de Butafosfan, durante o pós-parto de vacas leiteiras, na prevenção de distúrbios metabólicos e desempenho produtivo e reprodutivo”**, processo nº 23110.005315/2009-48 sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução considerando ser o assunto pertinente e a metodologia compatível com os princípios éticos em experimentação animal e com os objetivos propostos.

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste Projeto ser cadastrado junto ao Departamento de Pesquisa para posterior registro no COCEPE (Código para Cadastro nº CEEA 5315).

Sendo o que tínhamos para o momento, subscrevemo-nos.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Orlando Antonio Lucca Filho

Presidente da CEEA