

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



Dissertação

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

Leticia Franco Collares

Pelotas, 2017

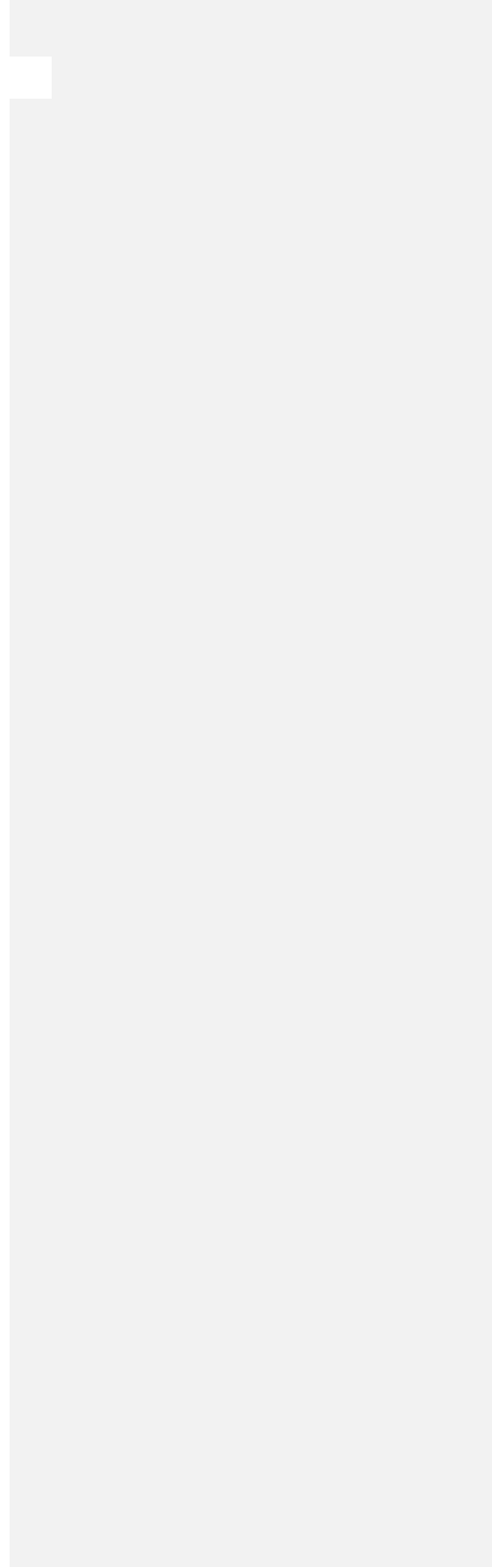
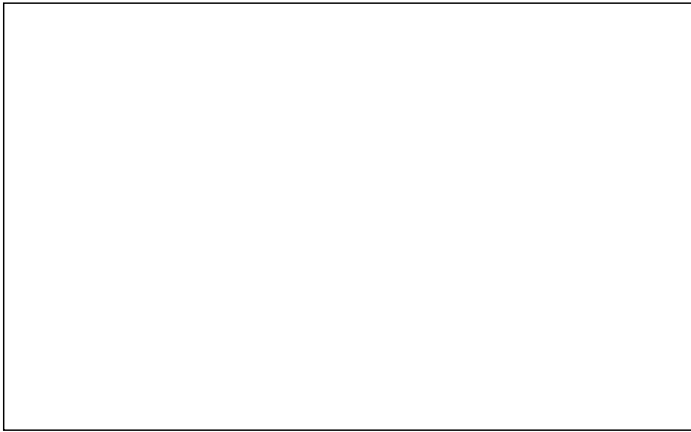
Letícia Franco Collares

**Suplementação com soro sanguíneo de vacas leiteiras em diferentes períodos
da 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 de do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal)

Orientador: Márcio Nunes Corrêa
Co-orientadora: Lígia Margareth Cantarelli Pegoraro

Pelotas, 2017



Letícia Franco Collares

Suplementação com soro sanguíneo de vacas leiteiras em diferentes períodos da 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 (UFPEL)

Prof. Dr. Augusto Schneider
Doutor em Biotecnologia (UFPEL)

Prof. Dr. Bernardo Garziera Gasperin
Doutor em Medicina Veterinária (UFSM)

Dra. Jorgea Pradié
Doutora em Ciências (UFPEL)

**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 da lactação na produção *in vitro* de embriões bovinos.** 2017. 39f. 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 da 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-Percol[®] 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. 39 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% CO₂ for 24 hours in the maturation medium according to the treatments. The insemination was carried out with a concentration of 1x10⁶ 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 Parâmetros bioquímicos avaliados nos soros durante a MIV dos grupos controle (soro ovino), final da lactação (FL) e pós-parto (PP).....25
- Tabela 2 Taxa de oócitos maturados e imaturos (sobre os oócitos avaliados) nos tratamentos controle, final da lactação (FL) e pós parto (PP).....25
- Tabela 3 Taxa de clivagem e de desenvolvimento embrionário na PIV de oócitos bovinos suplementados com soros controle, final da lactação (FL) e pós-parto (PP) durante a MIV.....26

Lista de Abreviaturas e Siglas

µl	Microlitros
BEN	Balanco 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	Mililitros
mm	Milímetro
MmHg	Milímetro de mercúrio
MPF	Fator promotor F
NaCl	Cloreto de sódio
NEFA	Ácidos graxos não-esterificados
nm	Nanometro
pH	Potencial hidrogênico
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
RNA _m	RNA mensageiro
TAGs	Triacilgliceróis
VG	Vesícula germinativa

Sumário

1 Introdução.....	13
2 Revisão de literatura.....	16
2.1 Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos.....	16
2.2 Maturação oocitária.....	17
2.2.1Maturação nuclear.....	18
2.2.2Maturação citoplasmática.....	19
2.3 Balanço energético negativo no pós-parto e reprodução.....	20
3 Metodologia.....	22
3.1 Coleta e análise bioquímica dos soros.....	22
3.2 Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos.....	23
3.3 Avaliação da maturação nuclear.....	24
3.4 Análise estatística.....	24
4 Resultados.....	25
5 Discussão.....	27
6 Conclusões.....	30
7 Referências	31

1 Introdução

2

3 Nos últimos anos o melhoramento genético em vacas leiteiras a fim de
4 intensificar a produção de leite, tem sido associado a uma redução no desempenho
5 reprodutivo (BOLAND et al., 2001). As semanas próximas ao parto são consideradas
6 críticas para vacas de alta produção. No decorrer deste período, estes animais
7 necessitam de vários ajustes metabólicos para sustentar a transição da gestação
8 para lactação (MULLINS et al., 2012). Segundo Mulligan e Doherty (2008), o período
9 de transição corresponde às 3 semanas que antecedem o parto, se estendendo até
10 3 semanas após o parto. Este momento é caracterizado por um desequilíbrio entre a
11 ingestão de alimentos e o gasto energético necessário para a produção de leite,
12 chamado de priorização de energia destinada à produção leiteira, acompanhado de
13 um alto grau de lipólise (LEROY et al., 2006).

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

24 O aumento da NEFA no plasma próximo ao parto está associado ao estresse
25 da gestação e com a redução da ingestão de matéria seca (MCNAMARA et al.,
26 2003). Estes ácidos graxos são constituídos principalmente por gorduras saturadas,
27 incluindo ácido palmitato, estearato, além do ácido graxo monoinsaturado ácido
28 oléico (WATHES et al., 2013). No pós-parto, o NEFA pode ser utilizado como
29 alternativa de energia, sendo oxidado a dióxido de carbono no fígado, ou
30 parcialmente oxidado para produzir corpos cetônicos, (BHBA) e acetato. Ainda, pode

1 ser esterificado a triacilgliceróis (TAGs), sendo armazenados no fígado, ou
2 exportados como lipoproteínas de baixa densidade (WATHES et al., 2007; WATHES
3 et al., 2013). As concentrações elevadas de NEFA e BHBA estão associadas a uma
4 função folicular comprometida (CHEONG et al., 2015). Segundo Van Hoeck et al.
5 (2011), o aumento de NEFA no sangue se reflete no fluido folicular, interferindo
6 diretamente na viabilidade das células da granulosa e na esteroidogênese, assim
7 como na capacidade de desenvolvimento do oócito.

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

17 Em vacas leiteiras, a intensidade do BEN está correlacionada com a
18 retomada da atividade ovariana pós-parto. O principal efeito ocorre a nível
19 hipotalâmico, reduzindo a secreção de GnRH, resultando em menor liberação
20 pulsátil de LH, prejudicando a produção de estrógeno folicular (BUTLER et al.,
21 2006). Estes fatores estão associados a um maior intervalo entre parto e a ovulação.
22 Porém, a principal causa do anestro logo após a parição se deve a uma falha na
23 ovulação, devido à redução de metabólitos que atuam no crescimento e na
24 maturação folicular (SCHNEIDER et al., 2010). A energia necessária para o
25 desenvolvimento folicular, para o crescimento e maturação dos oócitos e para
26 formação do corpo lúteo é desviada para a produção leiteira e para a manutenção
27 da lactação (LEROY et al., 2008).

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

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

1 **2 Revisão de Literatura**

2

3 **2.1 Produção *in vitro* de embriões bovinos**

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

14 O surgimento desta biotecnologia foi marcado pelo nascimento do primeiro
15 bezerro produzido *in vitro* na década de 80. Desde então inúmeros estudos vem
16 sendo realizados envolvendo todas as etapas deste processo (BRACKETT et al.,
17 1982). Contudo, a PIVE apresenta resultados inferiores quando comparada com a
18 produção *in vivo*, devido a fatores que envolvem aspectos morfológicos e
19 moleculares induzidos por diferenças tais como: qualidade oocitária, ambiente
20 folicular, fecundação e ambiente de cultivo dos embriões (CAMARGO et al., 2006).
21 Dos oócitos destinados a MIV, 90% progridem do estágio de prófase I para Metáfase
22 II, 80% são fecundados e 30 a 40% se desenvolvem até o estágio de blastocisto
23 (LONERGAN e FAIR, 2016).

24 Esta biotécnica sofre ainda interferência de fatores intrínsecos dos animais
25 como raça, idade, variação individual e estágios da lactação das doadoras, e
26 também de fatores extrínsecos como manejo sanitário, nutricional e sazonalidade,
27 quando os ovários são obtidos de abatedouros (COSTA et al., 2006). A remoção
28 prematura dos oócitos dos folículos, assim como oócitos aspirados de folículos em
29 diferentes estágios de desenvolvimento também são fatores responsáveis pela
30 menor taxa de desenvolvimento embrionário *in vitro*, quando comparada *in vivo*
31 (GUIMARÃES et al., 2015).

1 A qualidade oocitária é um dos pontos chaves no sucesso da PIVE (RATY et
2 al., 2011), uma vez que, este gameta contribui com material genético e
3 citoplasmático fornecendo transcritos e proteínas essenciais para sustentar o
4 desenvolvimento embrionário (CAMARGO et al., 2006). Durante o crescimento até a
5 aquisição da competência, o oócito passa por diversos eventos bioquímicos,
6 estruturais e citoesqueléticos importantes para completar a maturação, ser
7 fecundado e se desenvolver até o estágio de blastocisto (BERTAGNOLLI et al.,
8 2004). As condições de cultivo também são fundamentais para os eventos de
9 clivagem, ativação do genoma embrionário, compactação, diferenciação e
10 viabilidade fetal após implantação (MOORE et al., 2007).

11

12 **2.2 Maturação oocitária**

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

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

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

1 A remoção dos oócitos do ambiente folicular faz com que estes não estejam
2 mais em contato com os fatores inibitórios da maturação e retomem a meiose. As
3 células foliculares são responsáveis pela produção destes fatores, mantendo o
4 oócito em bloqueio meiótico (SIRARD e MAYES, 1998). Durante a retomada da
5 meiose, o oócito sofre maturação nuclear, a partir do estado de vesícula germinativa
6 (VG), progride para fases de Metáfase I, Anáfase I e Telófase I, até a extrusão do
7 primeiro corpúsculo polar, onde permanece em Metáfase II até o momento da
8 fecundação (MAYES e SIRARD, 2001). A maturação citoplasmática também é
9 essencial para que o desenvolvimento do gameta e para suportar o desenvolvimento
10 posterior a fecundação (BEVERIS et al., 1997; RODRIGUEZ e FARIN, 2004).

11

12 **2.2.1 Maturação Nuclear**

13 A maturação nuclear refere-se à progressão da meiose no oócito a partir do
14 estágio de diplóteno da prófase I até a fase de metáfase II (GOTTARDI e MINGOTI,
15 2009). Uma vez removidos do ambiente folicular e cultivados em meio de maturação
16 os oócitos podem retomar espontaneamente a primeira divisão meiótica (RICHARD
17 e SIRARD, 1996). Este processo tem início com a quebra da vesícula germinativa
18 (GVBD), induzido pelo fator promotor da maturação (MPF) (SUGIURA et al., 2006)
19 ocorre a condensação da cromatina, a dissolução da membrana nuclear e o
20 desaparecimento do nucléolo, os cromossomos homólogos se replicam e se
21 separam em dois grupos, cada um contendo a metade do número original de
22 cromossomos (MEINECK et al., 2001; MAYES E SIRARD, 2001). Ao término da
23 primeira divisão meiótica, o citoplasma é dividido assimetricamente, gerando células
24 de tamanhos diferentes, uma menor denominada corpúsculo polar e outra maior, o
25 oócito secundário. O oócito permanece no estágio de metáfase II (MII) até a
26 fecundação (CAN et al., 2003; GOTARDI e MINGOTI, 2009). Após a fecundação, a
27 segunda divisão meiótica é concluída com a progressão da MII até telófase II e a
28 extrusão do segundo corpúsculo polar. A partir deste estágio, o zigoto continua a se
29 replicar por sucessivas divisões mitóticas (MEINECK et al., 2001).

30 A maioria dos oócitos submetidos a MIV completam a maturação nuclear,
31 porém a maturação citoplasmática determina a habilidade dos oócitos se

1 desenvolverem a estágio de blastocisto após as condições de cultivo *in vitro*. Na
2 produção *in vitro*, esta taxa é baixa de 30 a 40% quando comparada com a produção
3 *in vivo*, uma das razões pode ser explicada pela heterogeneidade dos oócitos
4 utilizados (MEINECK et al., 2001). Para que estes gametas possam sustentar todas
5 as etapas de desenvolvimento são necessárias inúmeras modificações durante o
6 bloqueio meiótico, que incluem síntese protéica, transcrição de RNAm e
7 reorganização de organelas (CROCOMO et al., 2011). Perturbações de pH, estresse
8 oxidativo e toxinas durante o cultivo *in vitro* podem prejudicar a maturação e
9 predispor os oócitos a defeitos cromossômicos, afetando a competência genética
10 destes (CARRELL et al., 2005).

11

12 **2.2.2 Maturação Citoplasmática**

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

24 A maturação citoplasmática envolve eventos de transcrição e tradução de
25 proteínas armazenadas no citoplasma, incluindo a síntese de RNAm. Para este
26 processo, o oócito necessita de uma alta demanda de energia, a qual provém de
27 vários substratos como a glicose, os aminoácidos e lípidos. Em decorrência deste
28 processo várias organelas se tornam mais abundantes, sendo elas as mitocôndrias,
29 complexo de Golgi e retículo endoplasmático (SONGSASEN, 2012). O
30 amadurecimento do citoplasma também é essencial por promover o bloqueio contra
31 a poliespermia, descondensar a cabeça dos espermatozoides, formar os pró-núcleos

1 após a fecundação e sustentar o desenvolvimento embrionário inicial (VAN DEN
2 HURK e ZHAO, 2005). O bloqueio contra a poliespermia se deve ao endurecimento
3 da zona pelúcida promovido pelo exsudato produzido pelos grânulos corticais
4 (CHERR et al., 1998).

5 Um dos critérios para avaliação da maturação citoplasmática em mamíferos é
6 a migração dos grânulos corticais para a periferia do oócito (CARNEIRO et al.,
7 2002). Segundo De Matos et al. (1996), a dosagem de glutathione intracelular
8 também pode ser utilizada como parâmetro. Apesar de processos independentes a
9 maturação nuclear e a maturação citoplasmática, são essenciais para tornar o oócito
10 competente e para assegurar o desenvolvimento embrionário posterior à fecundação
11 (CROCOMO et al., 2011).

12

13 **2.5 Balanço energético negativo no pós-parto e reprodução**

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

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

30 O IGF-I auxilia na maturação oocitária e no desenvolvimento embrionário,
31 atua nos ovários através do seu receptor IGF-IR, estimulando a proliferação e a

1 diferenciação celular, impedindo a atresia folicular (WILLIS et al., 1998;
2 ARMSTRONG e WEBB, 1997; EL ROEIY et al., 1994). A insulina promove resposta
3 folicular a gonadotrofinas, participando do crescimento dos folículos. Sendo que a
4 leptina atua diretamente na maturação oocitária estimulando a progressão meiótica,
5 impedindo a apoptose das células do cumulus. A redução destes fatores durante o
6 período de BEN são os principais mecanismos endócrinos que afetam crescimento
7 folicular (LEROY et al., 2008).

8 Segundo Krause et al. (2014) vacas leiteiras de alta produção estão mais
9 predispostas a sofrer os efeitos negativos do BEN. Além dos eventos metabólicos, a
10 contaminação uterina após o parto pode afetar o desempenho reprodutivo
11 (SHELDON et al., 2006). As doenças uterinas são relacionadas a menores taxas de
12 concepção, maior intervalo entre parto e concepção, além da redução na produção
13 leiteira (LEBLANC et al., 2002; SHELDON et al., 2009) também estão
14 correlacionadas a menores concentrações séricas de estradiol e progesterona, e
15 com o crescimento mais lento do folículo dominante (SHELDON et al., 2002;
16 WILLIAMS et al., 2007). A maioria das vacas leiteiras após o parto apresentam uma
17 alta carga de microorganismos patogênicos no útero. Porém, a resposta imune de
18 cada animal contra a infecção é determinada pelo grau de intensidade do BEN
19 (GIULIODORI et al., 2013).

20

21 **3 Metodologia**

22

23 A produção *in vitro* de embriões bovinos foi realizada no Laboratório de
24 Reprodução Animal da Embrapa Clima Temperado, a avaliação da maturação
25 nuclear foi realizada no Laboratório de Reprodução Animal (ReproPel), e a análise
26 bioquímica dos soros foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Molecular da
27 Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). O
28 experimento foi executado de março a novembro de 2016.

29

30

31

1 **3.1 Coleta e análise bioquímica dos soros**

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

11 As análises bioquímicas foram realizadas em equipamento analisador
12 automático LABMAX PLENNO com kits comerciais LABMAX (Labtest Diagnostics
13 S.A.). As amostras de haptoglobina foram avaliadas usando um método
14 colorimétrico adaptado com comprimento de leitura de 450 nm conforme
15 metodologia descrita por JONES e MOULD. As análises de cálcio, albumina,
16 triglicerídeos totais e proteínas totais, também foram realizadas pelo método
17 colorimétrico. As concentrações de uréia através de um sistema enzimático por
18 fotometria e ultravioleta, usando cinética de dois pontos em tempo fixo, medida em
19 340 nm. Para as concentrações de colesterol no soro também se utilizou um método
20 enzimático, assim como para a quantidade de NEFA na amostra, podendo ser
21 determinada a partir da densidade óptica medida em 550 nm.

1 **3.2 Produção *in vitro* de embriões bovinos**

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

6 Foram realizadas 13 repetições com 1634 complexos *cumulus* oócitos
7 (CCOs). Estes foram obtidos a partir da aspiração de folículos de 2-8 mm de
8 diâmetro. A aspiração foi realizada com auxílio de bomba a vácuo acoplada a agulha
9 19G com pressão de 10-12 mmHg, o conteúdo aspirado foi depositado em tubos
10 cônicos de 15 mL previamente esterilizados. Após a sedimentação foi realizada a
11 busca e seleção dos CCOs através de lupa estereoscópica, considerando o grau de
12 compactação das células do *cumulus* e o grau de homogeneidade do citoplasma
13 como critérios de qualidade oocitária descritos por LEIBFRIED e FIRST (1979).

14 Os oócitos selecionados de grau I e II foram divididos aleatoriamente em três
15 tratamentos, contendo 50 CCOs cada repetição: SO: soro de ovelha em cio usado
16 como controle; FL: soro de vacas com 354 ± 3,8 dias pós-parto (pp); PP: soro de
17 vacas com 10 ± 4,8 dias (pp). Estes CCOs foram distribuídos em gotas de 400 µL
18 em meio de maturação TCM 199 (Gibco®), adicionado de (0,01UI/ml FSH (gonal);
19 5µg/mL de LH), piruvato (0,033mM) e antibióticos, enriquecido com 10% de soro
20 conforme os tratamentos e incubados em estufa à 39 °C com 5% de CO₂ e 20% O₂
21 durante 22 a 24h.

22 Após a maturação, os oócitos foram transferidos para gotas de 400 µL de
23 meio FIV (FERT/TALP). Para inseminação foram utilizadas palhetas da mesma
24 partida de sêmen *Bos taurus taurus*. A seleção espermática foi realizada com mini
25 gradiente de percoll, através da centrifugação a 700 G por 5 minutos. O pellet foi
26 transferido para meio de capacitação e novamente centrifugado por 5 minutos a 700
27 G. A inseminação foi procedida com uma concentração de 1x10⁶
28 espermatozoides/mL. Os oócitos juntamente com os espermatozóides foram
29 mantidos em estufa sob as mesmas condições atmosféricas da MIV durante 20h.

30 Decorrido este período, os zigotos passaram por sucessivas pipetagens para
31 remoção das células do *cumulus oophorus*. As estruturas recuperadas foram
32 lavadas três vezes e transferidas para gotas de 200 µL meio de cultivo SOFaa
33 suplementado com 5% de soro ovino e piruvato (0,1826mg) cobertas com óleo à 39
34 °C com 5% de CO₂ e 20% O₂ durante 7 dias. O momento da inseminação foi

1 considerado como dia 0, a taxa de clivagem foi avaliada no dia 3 (número de
2 clivados/número de inseminados) e a taxa de desenvolvimento embrionário global
3 (blastocistos/número de inseminados) no dia 7. Durante o cultivo embrionário foi
4 efetuada a troca de 30% do meio de cultivo nos dias 3 e 5.

5

6 **3.3 Avaliação da maturação nuclear**

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

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

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

23

24 **3.4 Análise estatística**

25 A análise estatística foi realizada através do software Statistix 10® (2014). Os
26 dados que apresentaram distribuição não paramétrica foram transformados em
27 asceno (FOWLER, CHOEN e JARVIS, 1998) e após analisados. A análise das taxas
28 de clivagem, desenvolvimento embrionário e maturação nuclear foram realizados
29 através do teste ANOVA, com teste Tukey para comparação de médias ($P < 0,05$).

30 **Só utilizaram anova?**

4 Resultados

Segundo análises bioquímicas realizadas, não foi observada diferença entre os metabólitos avaliados nos animais dos grupos FL e PP como apresentado na Tabela 1:

Tabela 1. Média dos parâmetros bioquímicos avaliados no soro sanguíneo, erro padrão e valor de P nos tratamentos FL e 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 expressados como média ± erro padrão.

Conforme as análises bioquímicas dos metabólitos sanguíneos, utilizando pool inativado de soro de ovelha em cio, de soro de vacas no final da lactação e no pós-parto recente, não foi observada diferença ($p > 0,05$), entre os parâmetros analisados como apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros bioquímicos avaliados nos soros inativados durante a MIV 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)	1,442	1,942	0,923
NEFA (mmol/L)	0,498	0,479	0,549
BHBA (mmol/L)	0,30	0,65	0,78

1

2 **Tabela 3:** Média da produção leiteira, porcentagem de gordura, proteína e contagem de
3 células somáticas nos tratamentos PP e FL.

Tratamento	Produção de leite (Kg/dia)	Gordura (%)	Proteína (%)	CCS
PP	35,03	2,67	3,39	89000
FL	18,58	3,34	3,73	180125

4 CCS: contagem de células somáticas.

5

6 **Tem que rodar estatística destes resultados!**

7 Conforme os resultados deste trabalho, não houve diferença entre o número
8 de oócitos que atingiram a fase de MII entre os tratamentos: controle 83,2%, final da
9 lactação (FL) 76,8% e pós-parto (PP) 82,2%. Os resultados da avaliação nuclear são
10 apresentados na Tabela 2.

11

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

Tratamento	Maturados	Imaturos
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%)

14

15 As taxas de clivagem para os diferentes tratamentos foram: controle 69,9%
16 (386/577), final da lactação 59,3% (320/540), pós-parto recente 47% (243/517),
17 apresentando diferença entre os tratamentos controle e pós-parto ($P < 0,05$). O
18 desenvolvimento embrionário foi maior no grupo controle 22,7% (131/577) quando
19 comparado com os demais tratamentos, final da lactação 15% (81/540) e pós-parto
20 16,6% (80/517) ($P < 0,05$) como mostra a Tabela 3.

21

22

23

Comentado [JA1]: Valor exato do P

Comentado [JA2]: Valor exato do P

1

2 **Tabela 5:** Taxa de clivagem e de desenvolvimento embrionário na PIVE de oócitos bovinos
3 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	80/517 (16,6%) ^b

4 Letras diferentes significam diferença estatística. ($p < 0,05$).

5

6

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

Tratamento	Bi	Bl	Bx	Bn	Be
SO	42	43	30	8	8
FL	30	16	23	3	5
PP	35	10	27	1	13

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

Comentado [JA3]: Entre linhas ou entre colunas?

Comentado [JA4]: Valor!

Comentado [JA5]: Isso é % ou número? Tem diferença estatística? Valor do P?

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 fluido folicular ovino e fluido 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.

1 **6 Conclusões**

2

3 Concluimos que a suplementação com soro sanguíneo de vacas leiteiras
4 em diferentes períodos da lactação no meio de MIV, não interferiu na taxa de
5 clivagem, no número de oócitos que maturaram e no desenvolvimento
6 embrionário inicial no período testado. Contudo, a suplementação destes
7 diferentes soros em outras fases do cultivo embrionário, assim como de mais
8 análises são válidas para melhor avaliar o efeito sobre o desenvolvimento
9 embrionário.

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

1 Referências

- 2
3 ARMSTRONG, D.G.; WEBB, R. Ovarian follicular dominance: the role of
4 intraovarian growth factors and novel proteins. **Reviews in Reproduction**, v.2,
5 p.139-146, 1997.
6
7
8 BERTAGNOLLI, A.C.; GONÇALVES, P.B.D.; GIOMETTI, I.C.; COSTA, L.F.S.;
9 OLIVEIRA, J.F.C.; GONÇALVES, I.D.V.; BARRETO, K.P.; EMANUELLI, I.P.;
10 BORGES, L.F.K. Interação entre células do cumulus e atividade da proteína
11 quinase C em diferentes fases de maturação nuclear de oócitos bovinos.
12 **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.56, n.4, 2004.
13
14
15 BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S.J.; HURK, R.V.; IZADVAR, F. Regulation and
16 modulation of oocyte maturation in the bovine. **Theriogenology**, v.47, p.13-22,
17 1997.
18
19
20 BOLAND, M.P.; LONERGAN, P.; O' CALLAGHAN, D. Effect of nutrition on
21 endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo
22 development. **Theriogenology**, v.55, p.1323–1340, 2001.
23
24
25 BRACKETT, B.; BOUSQUET, D.; BOICE, M.; DONARCICK, W.J.; EVANS, J.F;
26 DRESSELM, A. Normal development following *In vitro* fertilization in the cow.
27 **Biology of Reproduction**, v.27, p.147-158, 1982.
28
29
30 BUTLER, S.T.; PELTON, S.H.; BUTLER, W.R. Energy balance, metabolic
31 status, and the first postpartum ovarian follicle wave in cows administered
32 propylene glycol. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.2938-2951, 2006.
33
34
35 BUTLER, S. T.; MARR, A. L.; PELTON, S. H.; RADCLIFF, R. P.; LUCY, M. C.;
36 BUTLER, W. R. Insulin restores GH responsiveness during lactation-induced
37 negative energy balance in dairy cattle: effects on expression of IGF-I and GH
38 receptor 1A. **Journal of Endocrinology**, v. 176, p. 205–217, 2003.
39
40 BUTLER, W.R. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy
41 cattle. **Animal Reproduction Science**, v.60, p.449-457, 2000.
42
43
44 CAIXETA, E.S.; DODE, M.A.N.; Avaliações da competência ovocitária em
45 bovinos. **Veterinária e Zootecnia**, v.17, n.1, p.8-18, 2010.
46
47

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

4
5

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

9
10

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

15
16

17 CARREL, D.T.; LIU, L.; HUANG, I.; PETERSON, M. Comparison of maturation,
18 meiotic competence, and chromosome aneuploidy of oocytes derived from two
19

- 1 protocols for in vitro culture of mouse secondary follicles. **Journal of Assisted**
2 **Reproduction and Genetics**, v. 22, p.347-354, 2005.
3
4
5 CHAPINAL, N.; CARSON, M.E.; LEBLANC, S.J.; LESLIE, K.E.; GODDEN, S.;
6 CAPEL, M.; SANTOS, J.E.P. The association of serum metabolites in the transition
7 period with milk production and early-lactation reproductive performance. **Journal of**
8 **Dairy Science**. v.95, p.1301–1309, 2012.
9
10
11 CHEONG, S.H.; SÁ FILHO, O.G.; ABSALÓN-MEDINA, V.A.; PELTON, S.H.;
12 BUTLER, W.R.; GILBERT, R.O. Metabolic and endocrine differences between dairy
13 cows that do or do not ovulate first postpartum dominant follicles. **Biology of**
14 **Reproduction**, v. 94, p. 1-11, 2015.
15
16
17 CHERR, G.N.; DROBNIS, E.Z.; KATZ, D.F. Localization of cortical granule
18 constituents before and after exocytosis in the hamster egg. **Journal of**
19 **Experimental Zoology**, v. 246, p. 81-93, 1988.
20
21
22 COELHO, L.A.; ESPER, C.R.; ALVAREZ, R.H.; VANTINI, R.; JUNIOR, I, L, A.
23 Produção *in vitro* de embriões bovinos: utilização de diferentes fontes de
24 gonadotrofinas na maturação dos oócitos. **Revista Brasileira e Pesquisa**
25 **Agropecuária**, n.3, v.31, p.1117-1121, 2002.
26
27
28 COSTA, D.D.; PEREIRA, M.M.; DIAS, L.O.P.; SERAPIÃO, R.V.; POLISSENI, J.;
29 FOLHADELLA, I.M.; RAMOS, A.A.; CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M.; SÁ, W.F.
30 Efeito sazonal sobre a produção de embriões bovinos produzidos *in vitro* em região
31 tropical. In: XXIX Semana de Biologia e XII Mostra de Produção Científica – UFJF
32 Diretório Acadêmico de Ciências Biológicas - Walter Machado Couto, 2006.
33
34
35 CROCOMO, L.F.; MARQUES FILHO, W.C.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; BICUDO,
36 S.D. Aspectos bioquímicos e ultraestruturais da maturação oocitária. **Veterinária e**
37 **Zootecnia**, v.18, n.4, p.542-552, 2011.
38
39
40 DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.C.; MOSES, D.F.; MARTINEZ, A.G.; MATKOVIC, M.
41 Stimulation of glutathione synthesis of in vitro matured bovine oocytes and its effect
42 on embryo development and freezability. **Molecular Reproduction and**
43 **Development**, v.45, p.451-457, 1996.
44
45
46 DUROCHER, J.; MORIN, N.; BLONDIN, P. Effect of hormonal stimulation on bovine
47 follicular response and oocyte developmental competence in a commercial operation.
48 **Theriogenology**, v.65, p.102-105, 2006.
49
50

- 1 ESPOSITO, G.; IRONS, P.C.; WEBB, E.C.; CHAPWANYA, A. Interactions between
2 negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response
3 in transition dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v.144, p.60-71, 2014.
4
5
6 EL-ROEIY, A.; CHEN, X.; ROBERTS, V.J.; SHIMASAKAI, S.; LING, N.; LEROITH,
7 D.; ROBERTS JUNIOR, C.T.; YEN, S.S. Expression of the genes encoding the
8 insulin-like growth factors (IGF-I and II), the IGF and insulin receptors, and IGF-
9 binding proteins-1-6 and the localization of their gene products in normal and
10 polycystic ovary syndrome ovaries. **Journal of Clinical Endocrinology and**
11 **Metabolism**, v.78, p.1488-1496, 1994.
12
13
14 FERREIRA, E.M.; VIREQUE, A.A.; ADONA, P.R.; MEIRELLES, F.V.; FERRIANI,
15 R.A.; NAVARRO, P.A.A.S. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and
16 biochemical modifications and acquisition of developmental competence.
17 **Theriogenology**, v.71, p.836-848, 2009.
18
19
20 FONSECA, J.F. Strategies to control the estrous cycle and superovulation in sheep
21 and goats. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, v.16,
22 2005. Goiânia. **Anais do**. Goiânia, 2005. p. 1-9.
23
24
25 FOWLER, J.; COHEN, L.; JARVIS, P. Practical statistics for field biology. 2.ed.
26 Cichesster: Wiley. 259p, 1998.
27
28
29 FUKUI, Y.; FUKUSHIMA, M.; TERAWAKI, Y. I. Effect of gonadotropins, steroids and
30 culture media on bovine oocyte maturation in vitro. **Theriogenology**, v.18, p.161-
31 175, 1982.
32
33
34 GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. Oocyte maturation: Emerging concepts and
35 Technologies to improve developmental potential in vitro. **Theriogenology**, v.67,
36 p.6-15, 2007.
37
38
39 GIULIODORI, M.J., MAGNASCO, R.P., BECU-VILLALOBOS, D., LACAU-
40 MENGIDO, I.M., RISCO, C.A., DE LA SOTA, R.L. Metritis in dairy cows: Risk factors
41 and reproductive performance. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 3621-31, 2013.
42
43
44 GONG, J.G.; LEE, W.J.; GARNSWORTHY, P.C.; WEBB, R. Effect of dietary-induced
45 increases in circulating insulin concentrations during the early postpartum period on
46 reproductive function in dairy cows. **Reproduction**, v. 123, p. 419-427, 2002.
47
48

- 1 GOTTARDI, F.P.; MINGOTI, G.Z. Maturação de oócitos bovinos e influência na
2 aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Revista Brasileira**
3 **de Reprodução Animal**, v.33, n.2, p.82-94, 2009.
- 4
5
- 6 GUEMRA, S.; MONZANI, P.S.; SANTOS, E.S.; ZANIN, R.; OHASHI, O.M.;
7 MIRANDA, M.S.; ADONA, P.R. Maturação *in vitro* de oócitos bovinos em meios
8 suplementados com quercetina e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário.
9 **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, n6, p.1616-1624,
10 2013.
- 11
12
- 13 GUIMARÃES, A.L.S.; PEREREIRA, S.A.; LEME, L.O.; DODE, M.A.N. Evaluation of
14 the simulated physiological oocyte maturation system for improving bovine *in vitro*
15 embryo production. **Theriogenology**, v.83, p.52-57, 2015.
- 16
17
- 18 HANSEN, P.J. Realizing the promise of IVF in cattl an overview, **Theriogenology**,
19 Flórida, v.65, p.119-125, 2006.
- 20
21
- 22 HE, C.L.; DAMIANI, P.; PARYS, J.B.; FISSORE, R.A. Calcium, calcium release
23 receptors, and meiotic resumption in bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v.
24 57, p. 1245-1255, 1997.
- 25
- 26 JORRISTMA, R.; CÉSAR, M.L.; HERMANS, J.T.; KRUITWAGEN, C.L.J.J.; VOS,
27 P.L.A.M.; KRUIP, T.A.M. Effects of non-esterified fatty acids on bovine granulosa
28 cells and developmental potential of oocytes *in vitro*. **Animal Reproduction**
29 **Science**, v. 81, p.225-235, 2004.
- 30
31
- 32 JORRITSMA, R.; DE GROOT, M.W.; VOS, P.A.L.M.; KRUIP, T.A.M.; WENSING,
33 TH.; NOORDNUIZEN, J.P.T.M. Acute fasting in heifers as a model for assessing the
34 relationship between plasma and follicular fluid NEFA concentrations.
35 **Theriogenology**, v.60, p.151-161, 2003.
- 36
37
- 38 KRAUSE, A.R.T.; PFEIFER, L.F.M.; MONTAGNER, P.; WESCHENFELDER, M.M.;
39 SCHWEGLER, E.; LIMA, M.E.; XAVIER, E.G.; BRAUNER, C.C.; SCHMITT, E.; DEL
40 PINO, F.A.B.; MARTINS, C.F.; CORRÊA, M.N.; SCHNEIDER, A. Associations
41 between resumption of postpartum ovarianactivity, uterine health and concentrations
42 of metabolites andacute phase proteins during the transition period in Holsteincows.
43 **Animal Reproduction Science**, v.145, p.8-14, 2014.
- 44
45
- 46 LEBLANC, S. J.; DUFFIELD, T. F.; LESLIE, K. E.; BATEMAN, K. G.; KEEFE, G. P.;
47 WALTON, J. S. et al. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis, and
48 its impact on reproductive performance in dairy cows. **J Dairy Sci**, v.85, p.2223-
49 2236, 2002.

- 1
2
3 LEBLANC, S.J.; LESLIE, K.E.; DUFFIELD, T.F. Metabolic predictors of displaced
4 abomasum in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.159–170, 2005.
5
6
7 LEIBFRIED, L.; FIRST, N.L. Characterization of bovine follicular oocytes and their
8 ability to mature *in vitro*. **Journal Animal Science**, v.48, n.1, p.76-86, 1979.
9
10
11 LEROY, J.L.M.R.; OPSOMER, G.; DE VliegHER, S.; VANHOLDER, T.;
12 GROSSENS, L.; GELDHOFF, A.; BOLS, P.E.J. Reduced fertility in high-yielding dairy
13 cows: are the oocyte and embryo in danger? **Reproduction in Domestic Animals**,
14 v.43, p.612-622, 2008.
15
16
17 LEROY, J.L.M.R.; VANHOLDER, T.; DELANGHE, J.R.; OPSOMER, G.; VAN SOOM,
18 A.; BOLS, P.E.J.; DEWULF, J.; KRUIF, A. Metabolic changes in follicular fluid of the
19 dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum. **Theriogenology**,
20 v.62, p.1131-1143, 2004.
21
22
23 LEROY, J.L.M.R.; VANHOLDER, T.; MATEUSEN, B.; CHRISTOPHE, A.;
24 OPSOMER, G.; KRUIF, A.; GENICOT, G.; VAN SOOM, A. Non-esterified fatty acids
25 in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine
26 oocytes *in vitro*. **Reproduction**, v.130, p. 485–495, 2005.
27
28
29 LEROY, J.L.M.R.; VANHOLDER, T.; OPSOMER, G.; VAN SOOM, A., KRUIF, A. The
30 *in vitro* development of bovine oocytes after maturation in glucose and *b*-
31 hydroxybutyrate concentrations associated with negative energy balance in dairy
32 cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v.41, p.119-123, 2006.
33
34
35 LEIBFRIED, L.; FIRST, N.L. Characterization of bovine follicular oocytes and their
36 ability to mature *in vitro*. **Journal Animal Science**, v.48, n.1, p.76-86, 1979.
37
38
39
40
41 LONERGAN, P.; FAIR, T. *In vitro*-produced bovine embryos Dealing with the warts.
42 **Theriogenology**, Dublin, v.69, p.17–22, 2008.
43
44
45 LONERGAN, P.; FAIR, T. Maturation of oocytes *in vitro*. **Annual Review of Animal**
46 **Biosciences**, n.4, p.255-68, 2016.
47
48
49 LORENZO, P.L.; ILLERA, M.J.; ILLERA, M. Role of EGF, IGF-I, sera and cumulus
50 cells on maturation *in vitro* of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.44, p.109-118,
51 1995.

- 1
2 MARTINEZ, N.; RISCO, C.A.; LIMA, F.S.; BISINOTTO, R.S.; GRECO, L.F.;
3 RIBEIRO, E.S.; MAUNSELL, F.; GALVÃO, K.; SANTOS, J.E.P. Evaluation of
4 peripartal calcium status, energetic profile, and neutrophil function in dairy cows at
5 low or high risk of developing uterine disease. **Journal of Dairy Science**, v.95,
6 p.7158-7172, 2012.
7
8
9 MATOBA, S.; O'HARA, L.; CARTER, F.; KELLY, A.K.; FAIR, T.; RIZOS, D.;
10 LONERGAN, P. The association between metabolic parameters and oocyte quality
11 early and late postpartum in Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.95,
12 p.1257–1266, 2012.
13
14
15 MAYES, M.; SIRARD, M.A. The influence of cumulus-oocyte complex morphology
16 and meiotic inhibitors on the kinetics of nuclear maturation in cattle. **Theriogenology**,
17 v.55, p.911-922, 2001.
18
19
20 MCNAMARA, S.; MURPHY, J.J.; RATH, M.; O'MARA, F.P. Effects of different
21 transition diets on energy balance, blood metabolites and reproductive performance
22 in dairy cows. **Livestock Production Science**, v. 84, p.195–206, 2003.
23
24
25 MEINECKE, B.; JANAS, U.; PODHAJSKY, E.; MEINECKE-TILLMANN, S. Histone
26 H1 and MAP kinase activities in bovine oocytes following protein synthesis inhibition.
27 **Reproduction in Domestic Animal**, v.36, p.183-188, 2001.
28
29
30 MEIYU, QI.; ROTH, ZVI.; LIU DI. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) in reproduction
31 system of female bovine. **Journal of Northeast Agricultural University**, v.18, n.4,
32 p.84-87, 2011.
33
34
35 MOORE, K.; GUEZ-SALLABERRY, C.J.; KRAMER, J.M.; JOHNSON, S.;
36 WROCLAWS, E.; GOICOA, S.; NIASARI-NASLAJI, A. In vitro production of bovine
37 embryos in medium supplemented with a serum replacer: Effects on blastocyst
38 development, cryotolerance and survival to term. **Theriogenology**, v.68, p.1316–
39 1325, 2007.
40
41
42 MU, Y.M.; YANASE, T.; NISHI, Y.; TANAKA, A.; SAITO, M.; JIN, CH.; MUKASA, C.;
43 OKABE, T.; NOMURA, M.; GOTO, K.; NAWATA, H. Saturated FFAs, palmitic acid
44 and stearic acid, induce apoptosis in human granulosa cells. **Endocrinology**, v.142,
45 n.8, p.3590-7, 2001.
46
47
48 MULLINS, C.R.; MAMEDOVA, L.K.; BROUK, M.J.; MOORE, C.E.; GREEN, H.B.;
49 PERFIELD, K.L.; SMITH, F.; HARNER, J.P.; BRADFORD, B.J. Effects of monensin

- 1 on metabolic parameters, feeding behavior, and productivity of transition dairy cows.
2 **Journal of Dairy Science**, v.95, p.1323–1336, 2012.
3
4
5 MULLIGAN, F.J.; DOHERTY, M.L. Production diseases of the transition cow. **The**
6 **Veterinary Journal**, v.176, p.3-9, 2008.
7
8
9 O'DOHERTY, A.M.; O'GORMAN, A.; NAIB, A.; BRENNAN, L.; DALY, E.; DUFFY, P.;
10 FAIR, T. Negative energy balance affects imprint stability in oocytes recovered from
11 postpartum dairy cows. **Genomics**, v.104, p.177-185, 2014.
12
13
14 PEREIRA, Sidney Alcântara. **Efeito da Presença da Insulina-Transferrina-Selênio**
15 **(ITS) e L-ácido Ascórbico (AA) na Produção in vitro de Embriões Bovinos.**
16 2013. 70 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Instituto de Ciências
17 Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.
18
19
20 PORETSKY, L.; KALIN, M. F. The gonadotropic function of insulin. **Endocrine**
21 **Reviews**, v. 8, p. 132–141, 1987.
22
23
24 RATY, M.; KETOJA, E.; PITKANEN, T.; AHOLA, V.; KANANEN, K.; PEIPPO, J. In
25 vitro maturation supplements affect developmental competence of bovine cumulus–
26 oocyte complexes and embryo quality after vitrification. **Cryobiology**, v. 63, p.245-
27 255, 2011.
28
29
30 REIST, M.; ERDIN, D.; VON EUW, D.; TSCHUEMMPERLIN, K.; LEUENBERGER,
31 H.; CHILIARD, Y.; HAMMON, H, M.; MOREL, C.; PHILIPONA,C.; ZBINDEN.;
32 KUENZI, N.; BLUM, J, W. Estimation of energy bat the individual and herd level using
33 blood and milk traits in high-yielding cows. **Journal Dairy Science**, v. 85, p.3314-
34 3327, 2002.
35
36
37 RICHARD, F. J.; SIRARD, M. A. Effects of follicular cells on oocyte maturation. II.
38 Theca cell inhibition of bovine oocyte maturation in vitro. **Biology of Reproduction**,
39 v.54, n.1, p.22-28, 1996.
40
41
42 RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M.P.;LONERGAN, P. Consequences of
43 bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus in
44 vivo: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular**
45 **Reproduction Development**, v.61, p.234-248, 2002.
46
47
48 RODRIGUES-CUNHA, M.C.V.; MESQUITA, L.G.; BRESSAN, F.; COLLADO, M.;
49 BALIEIRO, J.CC.; SCHWARZ, K.RK.; CASTRO, F.C.; WATANEBE, O.Y.;
50 WATANABE, Y.F.; COELHO, L.A.; LEAL, C. LV. Effects of melatonin during in vitro

- 1 maturation in defined medium on oocyte meiosis, oxidative stress and subsequent
2 embryo development. **Theriogenology**, v.86, p. 1685-1694, 2016.
- 3
4
- 5 RODRIGUEZ, K.F.; FARIN, C.E. Developmental capacity of bovine cumulus oocyte
6 complexes after transcriptional inhibition of germinal vesicle breakdown.
7 **Theriogenology**, v.61, p.1499–1511, 2004.
- 8
9
- 10 SCHNEIDER, A.; PFEIFER, L.F.M.; HAX, L.T.; PALUDO, G.R.; DEL PINO, F.A.B.;
11 DIONELLO, N.J.L.; CORRÉA, M.N. Insulin-like growth factor and growth hormone
12 receptor in postpartum lactating beef cows. **Revista de Pesquisa Brasileira de**
13 **Agropecuária**, Brasília, v.45, n.8, p.925-931, 2010.
- 14
15
- 16 SHELDON, I.M., NOAKES, D.E., RYCROFT, A.N., PFEIFER, D.U., DOBSON, H.
17 Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant
18 follicle selection and follicle growth and function in cattle. **Reproduction**, v.123,
19 p.837–845, 2002.
- 20
21
- 22 SHELDON, I.M., LEWIS, G.S., LEBLANC, S., GILBERT, R.O. Defining postpartum
23 uterine disease in cattle. **Theriogenology**, v.65, p.1516–1530, 2006.
- 24
25
- 26 SHELDON, I. M.; CRONIN, J.; GOETZE, L.; DONOFRIO, G.; SHUBERTH, H. J.
27 Defining Postpartum Uterine Disease and the Mechanisms of Infection and Immunity
28 in the Female Reproductive Tract in Cattle. **Biol Reprod**, v.81, p.1025-1032, 2009.
- 29
30
- 31 SHABANKAREH, H.K.; SARSAIFI, K.; MEHRANNIA. In vitro maturation of ovine
32 oocytes using different maturation media: effect of human menopausal serum.
33 **Journal Assisted Reproduction and Genetics**, v.28, n.6, p.531-537, 2011.
- 34
35
- 36 SINARD, M.A.; RICHARD, F.; MAYES, M. Controlling meiotic resumption in bovine
37 oocytes: a review. **Theriogenology**, v.49, p.483-497, 1998.
- 38
39
- 40 SNIJDERS, S. E., DILLON, P., O'CALLAGHAN, D., AND BOLAND, M. P. Effect of
41 genetic merit, milk yield, body condition and lactation number on in vitro oocyte
42 development in dairy cows. **Theriogenology**, v. 53, p. 981–989, 2001.
- 43
44
- 45 SONGSASEN, N. Energy metabolism regulating mammalian oocyte maturation.
46 **Meiosis - Molecular Mechanisms and Cytogenetic Diversity**, v.9, p.174-186,
47 2012.
- 48
49

- 1 SUGIURA, K.; NAITO, K.; ENDO, T.; TOJO, H. Study of germinal vesicle
2 requirement for the normal kinetics of maturation/MPhase- promoting factor activity
3 during porcine oocyte maturation. **Biology of Reproduction**, v.74, p.593-600, 2006.
4
5
6 VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth,
7 differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v.63, p.1717-
8 1751, 2005.
9
10
11 VAN HOECK, V.; STURMEY, R.G.; BERMEJO-ALVAREZ, P.; RIZOS, D.;
12 GUTIERREZ-ADAN.; LEESE, H.J.; BOLS, P. E.J.; LEROY, J.L.M. Elevated non-
13 esterified fatty acid concentrations during bovine oocyte maturation compromise
14 early embryo physiology. **Plos One**, v.6, e23183, 2011.
15
16
17 VANHOLDER, T.; LEROY, J, L, M, R.; VAN SOOM, OPSOMER, G.; MAES, D.;
18 CORYN, M.; KRUIF, A. Effect of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cell
19 steroidogenesis and proliferation in vitro. **Animal Reproduction Science**, v. 87, p.
20 33-44, 2005.
21
22 VARAGO, F.C.; MENDONÇA, L.F.; LAGARES, M.A. Produção in vitro de embriões
23 bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução.
24 **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, n.2, p.100-109, 2008.
25
26 VELAZQUEZ, M.A.; SPICER, L.J.; WATHES, D.C. The role of endocrine insulin-like
27 growth factor-I (IGF-I) in female bovine reproduction. **Domestic Animal**
28 **Endocrinology**, v.35, p.325-342, 2008.
29
30
31 WATHES, D.C.; CLEMPSON, A.M.; POLLOTT, G.E. Associations between lipid
32 metabolism and fertility in the dairy cow. **Reproduction, Fertility and Development**,
33 v.25, p. 48–61, 2013.
34
35
36 WATHES, D.C.; FENWICK, M.; CHENG, Z.; BOURNE, N.; LLEWELLYN, S.;
37 MORRIS, D.G.; KENNY, D.; MURPHY, J.; FITZPATRICK, R. Influence of negative
38 energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow.
39 **Theriogenology**, v. 68, p.32-41, 2007.
40
41
42 WILLIS, D.S.; MASON, H.D.; WATSON, H.; FRANKS, S. Developmentally regulated
43 responses of human granulosa cells to insulin-like growth factors (IGFs): IGF-I and
44 IGF-II action mediated via the type-I IGF receptor. **Journal of Clinical**
45 **Endocrinology and Metabolism**, v.83, p.1256-1259, 1998.
46
47
48
49 WILLIAMS, E.J., FISCHER, D.P., NOAKES, D.E., ENGLAND, G.E., RYCROFT, A.,
50 DOBSON,H., SHELDON, I.M. Uterine infection perturbs ovarian function inthe
51 postpartum dairy cow. **Theriogenology**, v.68, p.549–559, 2007

1
2
3 WOUTENBERG, A.B.V.; GROLLERS-MULDERIJ, M.; SNEL, C.; JEURISSEN, N.;
4 STIERUM, R.; WOLTERBEEK, A. The bovine oocyte in vitro maturation model: A
5 potential tool for reproductive toxicology screening. **Reproductive Toxicology**, v.34
6 p. 251–260, 2012.
7