



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO INTEGRADO EM ZOOTECNIA



**DIETA ENRIQUECIDA COM LIPÍDEO ASSOCIADA À
SOMATOTROPINA RECOMBINANTE BOVINA EM
NOVILHAS SUPEROVULADAS**

RICHELLE MATOS OLIVEIRA

Mestrado

2021

PPIZ- PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO INTEGRADO EM ZOOTECNIA



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO INTEGRADO EM ZOOTECNIA**



RICHELLE MATOS OLIVEIRA

**DIETA ENRIQUECIDA COM LIPÍDEO ASSOCIADA À SOMATOTROPINA
RECOMBINANTE BOVINA EM NOVILHAS SUPEROVULADAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Orientador:
Prof. Dr. Anselmo Domingos Ferreira Santos

SÃO CRISTÓVÃO-SE

2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

Oliveira, Richelle Matos.

O48d Dieta enriquecida com lipídeo associada à somatotropina recombinante bovina em novilhas superovuladas / Richelle Matos Oliveira; orientador Anselmo Domingos Ferreira Santos. – São Cristóvão, SE, 2021.

36 f.; il.

Dissertação (mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Sergipe, 2021.

1. Zootecnia. 2. Nutrição animal. 3. Suplementos dietéticos. 4. Ovulação. I. Santos, Anselmo Domingos Ferreira, orient. II. Título.

CDU 636.23

RICHELLE MATOS OLIVEIRA

**DIETA ENRIQUECIDA COM LIPÍDEO ASSOCIADA À SOMATOTROPINA
RECOMBINANTE BOVINA EM NOVILHAS SUPEROVULADAS**

Apresentado dia 29 de Outubro de 2021.

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Camilla M Silva

Camila Mendonça Silva (UFS)

Larissa Pires

Larissa Pires Barbosa (UFRB)

Hymerson Costa Azevedo

Hymerson Costa Azevedo (Embrapa-UFS)

Anselmo Domingos Ferreira Santos

Anselmo Domingos Ferreira Santos (Orientador-UFS)

SÃO CRISTÓVÃO-SE

2021

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT	iv
1-INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2-OBJETIVOS.....	3
2.1. OBJETIVO GERAL.....	3
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
REFERÊNCIAS.....	4
Capítulo 1.....	6
Resumo.....	7
Abstract.....	8
Introdução.....	8
Material e Métodos.....	10
Resultados.....	17
Discussão.....	21
Conclusão.....	25
Referências.....	26

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Protocolo esquematizado do grupo OL-rBST (dieta com óleo de soja e aplicação de somatotropina recombinante bovina-rBST).....	14
Figura 2- Concentração plasmática de progesterona (P_4) em novilhas da raça holandesa tratadas com gordura dietética associada à somatotropina recombinante bovina.....	20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Critérios utilizados para cálculo das exigências nutricionais dos grupos experimentais.....	10
Tabela 2- Peso corporal e consumo diário de novilhas da raça holandesa tratadas com gordura dietética associada à somatotropina recombinante bovina.....	17
Tabela 3- Parâmetros avaliados na dinâmica folicular ovariana e concentração de lipoproteína de alta densidade intrafolicular de novilhas tratadas com gordura dietética associada à somatotropina recombinante bovina.....	18
Tabela 4- Resposta superovulatória de novilhas tratadas com gordura dietética associada à somatotropina recombinante bovina.....	20

OLIVEIRA, Richelle. **Dieta enriquecida com lipídeo associada à somatotropina recombinante bovina em novilhas superovuladas**. Sergipe: UFS, 2021. 36p. (Dissertação - Mestrado em Zootecnia)

RESUMO

Objetivou-se avaliar os efeitos da suplementação com óleo de soja e administração de somatotropina recombinante bovina (rBST) sobre a população de folículos ovarianos, uniformização da resposta superovulatória e recuperação embrionária. Foram utilizadas 40 novilhas da raça holandesa submetidas a um fatorial 2x2, sendo duas dietas, sem (DC = controle) ou com suplementação de óleo de soja (OL) e a administração ou não de 320 mg de rBST, sete dias após o primeiro estro e dos estros subsequentes, constituindo os seguintes grupos experimentais: DC-SL (dieta controle mais a aplicação de solução salina); OL-SL (dieta suplementada com gordura mais a aplicação de solução salina); DC-rBST (dieta controle mais a aplicação de 320 mg de rBST) e OL-rBST (dieta suplementada com gordura mais a aplicação de 320 mg de rBST). Os animais receberam duas aplicações de 500 mg de PGF 2α para sincronização do estro e, em seguida, foram superovulados com 400 UI de FSH em doses diárias decrescentes durante quatro dias consecutivos. No dia anterior ao início da superovulação, os dois maiores folículos foram puncionados para quantificação da concentração intrafolicular de lipoproteína de alta densidade (HDL). As análises estatísticas foram processadas pelo *software* estatístico Action R versão 3.0.2, utilizando a ANOVA e Teste Fisher (Teste F; duas comparações) para as médias das características com nível de probabilidade de 5%. Não foram verificadas diferenças no consumo de matéria seca, atividade folicular ovariana, concentração de P $_4$ e resposta superovulatória. Por outro lado, o grupo OL-rBST obteve maior área de CL ($4,67\pm 0,67$ cm 2) e um efeito positivo foi evidenciado para concentração de HDL nos grupos de tratamentos OL-SL ($40,86\pm 9,8$ mg/dL) e OL-rBST ($53,67\pm 10,35$ mg/d). A suplementação com óleo de soja na dieta associada à administração de rBST não proporcionou uniformização da resposta superovulatória e na recuperação embrionária de novilhas.

Palavras-chave: superovulação, bovinos, corpo lúteo, HDL, embrião, IGF-1

OLIVEIRA, Richelle. **Lipid-enriched diet associated with bovine recombinant somatotropin in superovulated heifers.** Sergipe: UFS, 2021. 36p. (Dissertation - Master in Zootecnia)

ABSTRACT

The aim was to evaluate the effects of soybean oil supplementation associated with the administration of bovine recombinant somatotropin (rBST) on the population of ovarian follicles, standardization of the superovulation response, and embryo recovery. We used 40 Holstein heifers submitted to a 2x2 factorial, with two diets, without or with soybean oil supplementation; and the administration or not of rBST seven days after estrus, forming the experimental groups: DC-SL (control diet plus saline solution application); OL-SL (diet with soybean oil plus saline application); DC-rBST (control diet plus application of 320 mg rBST) e OL-rBST (diet with soybean oil plus the application of 320 mg rBST). The animals received two applications of 500 mg of PGF₂ α for estrus synchronization and were superovulated with 400 IU of FSH in decreasing daily doses for four consecutive days. On the day before the start of superovulation, the two largest follicles were punctured to quantify the intrafollicular concentration of high-density lipoprotein (HDL). Statistical analyzes were processed using the Action R statistical software version 3.0.2, using ANOVA and Fisher's Test (F test; two comparisons) for the mean characteristics with a probability level of 5%. There were no differences in dry matter intake, follicular activity, P4 concentration, and superovulation response. The group OL-rBST got a greater CL area (4.67 ± 0.67 cm²) and a positive effect was evidenced for HDL concentration in the treatment groups OL-SL (40.86 ± 9.8 mg/dL) and OL-rBST (53.67 ± 10.35 mg/dL). Soybean oil supplementation in the diet associated with the administration of rBST did not provide uniformity in the superovulation response and the embryonic recovery of heifers.

Key-words: superovulation, cattle, corpus luteum, HDL, embryo, IGF-1

INTRODUÇÃO GERAL

Na produção *in vivo* de embriões, a etapa de superovulação é fundamental para a obtenção do número máximo possível de embriões transferíveis com maior possibilidade de desenvolverem em gestações (Tríbulo et al., 2011; Bó et al., 2014). Entretanto, um ponto crítico para esta biotecnologia é a variação da resposta ao tratamento de superovulação, principalmente devido à variabilidade entre animais, ambiente e protocolo hormonal utilizado (Biancucci et al., 2016). Desta forma, torna-se necessário buscar a otimização da resposta superovulatória e diminuição da variabilidade entre animais, destacando-se o uso da somatotropina recombinante bovina (rBST) associada à gordura dietética como possíveis alternativas (Carriquiry et al., 2009).

A rBST tem sido estudada como alternativa para aumentar a população folicular em vacas (Carriquiry et al., 2009; Maldonado et al., 2015; Rincón et al., 2019). É uma variante sintética de hormônio de crescimento (GH) (Dambit et al., 2014), a qual participa dos mecanismos regulatórios do crescimento e diferenciação celular, assim como também, controla a atividade metabólica de diferentes órgãos e tecidos (Baruseli et al., 2019). Quando administrada, a rBST liga-se aos seus receptores no fígado, ativando-os, estimulando a produção e secreção do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina Tipo I (IGF-I), que é liberada na corrente sanguínea agindo no ovário nos receptores presentes nos folículos e estimulando a produção de estradiol (Lucy, 2011; Magalhães et al., 2012).

Assim, os efeitos da rBST no ovário podem ser indiretamente associados ao IGF-I ou diretos, envolvidos com a expressão para receptores de rBST que foram detectados em ovários humanos (Magalhães et al., 2012). O aumento na concentração sérica de IGF-I promovido pelo tratamento com rBST atuará sinergicamente com as gonadotrofinas (FSH ou LH) (Lucy, 2011), agindo como modulador da ação das gonadotrofinas no ovário, estimulando a proliferação e diferenciação das células da granulosa e da teca (Rincón et al., 2019).

Dessa forma, a administração de rBST pode exercer efeitos positivos em protocolos de superovulação devido à atividade sinérgica entre o IGF-I e as gonadotrofinas, promovendo o aumento do crescimento folicular provavelmente por aumentar o número de receptores de gonadotrofinas e atividade do sistema de segundos mensageiros para

receptores de gonadotrofina no ovário, ao mesmo tempo que as gonadotrofinas aumentam a expressão de receptores de IGF-I e sua síntese nas células da granulosa. A grande atividade do receptor de gonadotrofina pode potencialmente retardar o processo de atresia na população de folículos recrutados (Lucy, 2011).

Por outro lado, uma boa parte da variação no desempenho reprodutivo deve-se a diferenças no consumo energético (Fernandes et al., 2013). Sendo assim, é possível a obtenção de efeitos positivos com a associação de gordura dietética à rBST. Isso porque a rBST promove o aumento do número de folículos pequenos recrutados antes do tratamento superovulatório, proporcionando o crescimento de um maior número de folículos (Maldonado et al. 2015; Oosthuizen et al., 2018), Enquanto que o aumento de colesterol plasmático, através de uma dieta energética, também estimula o crescimento programado de folículos, assim como o tamanho do folículo pré-ovulatório por aumentar a concentração plasmática de estradiol e hormônio luteinizante (LH), que estimula o estágio final do crescimento folicular (Fernandes et al., 2013; Leroy et al., 2014).

A ovulação de folículos maiores pode levar à formação de corpo lúteo (CL) de maior tamanho com capacidade esteroideogênica aumentada, explicando a maior produção de progesterona. As dietas hipercalóricas exibem uma correlação positiva quanto a concentração de progesterona, lipoproteína de alta densidade (HDL) e colesterol para fêmeas bovinas. Essas dietas alteram o metabolismo dos lipídios, aumentando o colesterol plasmático, o que promove aumento da esteroideogênese ovariana, concentrações séricas de HDL que estimulam a produção de IGF-1 pelas células luteínicas e da granulosa, e síntese de progesterona, nas células da granulosa e da teca (Fernandes et al., 2013).

A melhora na fertilidade de vacas leiteiras com dietas altamente energéticas tem sido geralmente associada a um aumento no diâmetro do folículo dominante, do ovócito e qualidade embrionária, maiores concentrações de progesterona produzidas pelo CL e modulação da síntese de prostaglandina (Zachut et al., 2011; Hutchinson et al., 2012). Sendo a composição de ácidos graxos da dieta diretamente relacionado a concentração de diferentes prostaglandinas, sendo o ácido linoléico precursor da prostaglandina da série 2 o ácido linolênico das prostaglandinas séries 1 e 3 (Silva et al., 2014).

Deste modo, dada a importância da rBST e gordura dietética como moduladores do crescimento folicular ovariano, faz-se necessário investigar o funcionamento e a atuação destas na resposta superovulatória de novilhas.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Testar os efeitos da suplementação de gordura dietética associada à administração de somatotropina recombinante bovina (rBST) na população de folículos ovarianos, em uniformizar a resposta superovulatória, recuperação embrionária e concentração de metabólitos intrafolicular e hormonal em novilhas holandesas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos de rBST e gordura dietética sobre a atividade folicular e lútea ovariana;

Avaliar a resposta superovulatória de novilhas tratadas com rBST associada à gordura dietética;

Avaliar a concentração de metabólitos intrafolicular e hormonal plasmático em resposta a adição de rBST e gordura dietética e ação sobre as variáveis estudadas.

REFERÊNCIAS

Baruselli P.S., Elliff F.M., Silva L.G., Catussi B.L.C., Bayeux B.M. (2019). Estratégias para aumentar a produção de embriões em bovinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, 43: 315-326.

Biancucci A., Sbaragli T., Comin A., Sylla L., Monaci M., Peric T., Stradaioli G. (2016). Reducing treatments in cattle superovulation protocols by combining a pituitary extract with a 5% hyaluronan solution: Is it able to diminish activation of the hypothalamic pituitary adrenal axis compared to the traditional protocol? **Theriogenol.**, 85: 914–921.

Bó G.A.; Mapletoft R.J. (2014). Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. **Theriogenol.**, 81: 38–48.

Carriquiry, M., Weber W.J., Dahlen C.R., Lamb G.C., Baumgard L.H, Crooker B.A. (2009). Production response of multiparous holstein cows treated with bovine somatotropin and fed diets enriched with n-3 or n-6 fatty acids. **J. Dairy Sci.**, 92; 4858-4864.

Dambit T.F., Santana V.C., Santos R.O., Ferreira M.A., Varoni P.C. (2014). Impactos do uso da somatotropina bovina recombinante (rbST) sobre a reprodução de ruminantes. **Pubvet**, 8: 1-18.

Fernandes R.H., Madureira E.H. (2013). Fat supplementation on reproduction of beef cattle. **Ars Vet.**, 29: 60-67.

Hutchinson I.A., Hennessy A.A., Waters S.M., Dewhurst R.J., Evans A.C.O., Lonergan P., Butler S.T. (2012). Effect of supplementation with different fat sources on the mechanisms involved in reproductive performance in lactating dairy cattle. **Theriogenol.**, 78: 12–27.

Leroy J.L.M.R., Sturmey R.G., Hoeck V.V., Bie J., McKeegan P.J., Bols P.E.J. (2014). Dietary Fat Supplementation and the Consequences for Oocyte and Embryo Quality: Hype or Significant Benefit for Dairy Cow Reproduction? **Reprod. Dom. Anim.**, 49: 353–361.

Lucy M.C. (2011). Growth hormone regulation of follicular growth. **Reprod. Fertil. Dev.**, 24: 19–28.

Magalhães D.M., Sales E.T., Padilha R.T., Silva T.F.P., Tonioli R., Figueiredo J.R. (2012). Hormônio do Crescimento (GH) e Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-I (IGF-I): importantes reguladores da foliculogênese in vivo e in vitro. **R. Bras. Reprod. Anim.**, 36: 32-38.

Maldonado G.J., Santos R.R., Lara R.R. (2015). Superovulatory response and embryo quality of Holstein heifers treated with one or two injections of somatotropin. **R. Colomb. Cienc. Pecu.**, 28: 339-346.

Oosthuizen O., Fontes P.L.P., Henry D.D., Ciriaco F.M., Sanford C., Canal L.B., Moraes G.V., DiLorenzo N., Currin J.F., Clark S., Whittier W.D., Mercadante V.R.G., Lamb G.C. (2018). Administration of recombinant bovine somatotropin before fixed-time artificial insemination and the effects on fertility, embryo and fetal size in beef heifers. **J. Anim. Sci.**, 96: 1894–1902.

Rincón J.A.A., Diego B.D., Acosta A.V., Gasperin B.G., Rovani M.T., Pegoraro L.M.C., Corrêa M.N., Schneider A. (2019). Effect of treatment with recombinant bovine somatotropin (rbST) on the follicular population and on development in non-lactating dairy cows. **Anim. Reprod.**, 16: 914–922.

Silva J.A., Zervoudakis L.K.H., Júnior M.F.D., Silva R.P., Tsuneda P.P., Silva L.E.S., Barbosa L.A.B. (2014). Utilização de gordura na dieta de vacas leiteiras. **Pubvet**, 8: 2030-2172.

Tríbulo A., Rogan D., Tribulo H., Tribulo R., Alasino R.V., Beltramo D., Bianco I., Mapletoft R.J., Bó G.A. (2011). Superstimulation of ovarian follicular development in beef cattle with a single intramuscular injection of folltropin-v. **Anim. Reprod. Sci.**, 129: 7-13.

Zachut M., Arieli A., Moallem U. (2011). Incorporation of dietary n-3 fatty acids into ovarian compartments in dairy cows and the effects on hormonal and behavioral patterns around estrus. **Reprod.**, 141: 833–840.

CAPÍTULO 1

Artigo científico elaborado nas normas da revista: ANNLS OF ANIMAL SCIENCE

Dieta enriquecida com lipídeo associada à somatotropina recombinante bovina em novilhas superovuladas

Objetivou-se avaliar os efeitos da suplementação com óleo de soja associada à administração de somatotropina recombinante bovina (rBST) sobre a população de folículos ovarianos, uniformização da resposta superovulatória e recuperação embrionária. Foram utilizadas 40 novilhas da raça holandesa submetidas a um fatorial 2x2, sendo duas dietas, sem ou com suplementação de óleo de soja e a administração ou não de rBST, sete dias após o estro, formando os grupos experimentais: DC-SL (dieta controle mais aplicação de solução salina); OL-SL (dieta com óleo de soja mais aplicação de solução salina); DC-rBST (dieta controle mais aplicação de 320 mg de rBST) e OL-rBST (dieta com óleo de soja mais aplicação de 320 mg de rBST). Os animais receberam duas aplicações de 500 mg de PGF2 α para sincronização do estro e, em seguida, foram superovulados com 400 UI de FSH em doses diárias decrescentes durante quatro dias consecutivos. No dia anterior ao início da superovulação, os dois maiores folículos foram puncionados para quantificação da concentração intrafolicular de lipoproteína de alta densidade (HDL). A coleta de embriões deu-se 7 dias após a primeira inseminação. Não foram verificadas diferenças no consumo de matéria seca, atividade folicular, concentração de P₄ e resposta superovulatória. Por outro lado, o grupo OL-rBST obteve maior área de CL (4,67 \pm 0,67 cm²) e um efeito positivo foi evidenciado para concentração de HDL nos grupos de tratamentos OL-SL (40,86 \pm 9,8 mg/dL) e OL-rBST (53,67 \pm 10,35 mg/d). A suplementação com óleo de soja na dieta associada à administração de rBST não proporcionou a uniformização da resposta superovulatória e na recuperação embrionária de novilhas.

Palavras-chave: superovulação, bovinos, corpo lúteo, HDL, embrião, IGF-1

Lipid-enriched diet associated with bovine recombinant somatotropin in superovulated heifers

The aim was to evaluate the effects of soybean oil supplementation associated with the administration of bovine recombinant somatotropin (rBST) on the population of ovarian

follicles, standardization of the superovulation response, and embryo recovery. We used 40 Holstein heifers submitted to a 2x2 factorial, with two diets, without or with soybean oil supplementation; and the administration or not of rBST seven days after estrus, forming the experimental groups: DC-SL (control diet plus saline solution application); OL-SL (diet with soybean oil plus saline application); DC-rBST (control diet plus application of 320mg rBST) e OL-rBST (diet with soybean oil plus the application of 320mg rBST). The animals received two applications of 500 mg of PGF2 α for estrus synchronization and were superovulated with 400 IU of FSH in decreasing daily doses for four consecutive days. On the day before the start of superovulation, the two largest follicles were punctured to quantify the intrafollicular concentration of high-density lipoprotein (HDL). Embryo collection took place 7 days after the first insemination. There were no differences in dry matter intake, follicular activity, P4 concentration, and superovulation response. The group OL-rBST got a greater CL area (4.67 ± 0.67 cm²) and a positive effect was evidenced for HDL concentration in the treatment groups OL-SL (40.86 ± 9.8 mg/dL) and OL-rBST (53.67 ± 10.35 mg/dL). Soybean oil supplementation in the diet associated with the administration of rBST did not provide uniformity in the superovulation response and the embryonic recovery of heifers.

Key-words: superovulation, cattle, corpus luteum, HDL, embryo, IGF-1

1-INTRODUÇÃO

A superovulação tem como objetivo induzir múltiplas ovulações obtendo maior número de embriões transferíveis com maior possibilidade de se desenvolverem em gestações (Tribulo et al., 2011; Bó et al., 2014). Entretanto, são muitos os fatores que influenciam a resposta superovulatória, os quais impedem a maior utilização da transferência de embriões (TE) em bovinos (Biancucci et al., 2016; Bó et al., 2018). Essa variabilidade na resposta ao tratamento superovulatório está correlacionada, principalmente, às populações foliculares de diferentes tamanhos (Maldonado et al., 2015).

O uso da somatotropina recombinante bovina (rBST) proporciona o aumento do desenvolvimento folicular, uma vez que atua como um modulador da ação das

gonadotrofinas no ovário, estimulando a esteroidogênese, proliferação e diferenciação de células da granulosa e teca, aumentando o crescimento folicular (Acosta et al., 2017). Estes efeitos positivos, provavelmente, são referentes ao aumento do número de folículos pequenos recrutados antes do tratamento superovulatório, proporcionando o crescimento de um maior número de folículos (Maldonado et al. 2015; Oosthuizen et al., 2018).

Segundo dados de estudos *in vitro*, o mecanismo mais provável da rBST para o aumento do crescimento folicular é o efeito sinérgico do fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) associado às gonadotrofinas e à expressão de receptores de gonadotrofinas (Lucy, 2011). A administração de rBST aumenta as concentrações plasmáticas de IGF-I que estimulam o desenvolvimento embrionário, por aumentar a expressão de mRNA para proteínas que formam o histotrofo (Costa et al., 2020).

Não obstante, as dietas suplementadas com óleos têm função, principalmente, de aumentar a densidade energética da alimentação para melhorar a reprodução dos animais (Hutchinson et al., 2012; Guggeri, et al., 2018). O ácido linoléico (C18:2) tem sido relatado como um dos mais efetivos na reprodução de vacas leiteiras, por aumentar o tamanho do folículo dominante (Fernandes et al., 2013).

A melhora na fertilidade de vacas leiteiras com dietas altamente energéticas tem sido geralmente associada a um aumento no diâmetro do folículo dominante, do ovócito e qualidade embrionária, maiores concentrações de progesterona produzidas pelo corpo lúteo (CL) e modulação da síntese de prostaglandina (Zachut et al., 2011; Hutchinson et al., 2012), tendo como precursor da prostaglandina da série 2 o ácido linoléico (Silva et al., 2014).

Deve-se ressaltar que ainda não existem informações sobre a suplementação lipídica associada à rBST sobre a atividade folicular ovariana em fêmeas bovinas superovuladas. Portanto, há um potencial considerável para o uso combinado de óleo de soja e administração de rBST para otimização da superovulação em novilhas. Assim, os objetivos deste experimento foram avaliar os efeitos da suplementação de rBST associados ao óleo de soja sobre a população de folículos ovarianos, em aumentar e uniformizar a resposta superovulatória e na recuperação embrionária em novilhas holandesas.

2-MATERIAL E MÉTODOS

2.1-Local e Animais Experimentais

O experimento foi desenvolvido na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG (Latitude: 20° 45' 14" S - Longitude: 42° 52' 53" W), durante o período de um ano, iniciando no mês de agosto. Foram utilizadas 40 novilhas da raça Holandesa de 13 a 18 meses, com peso corporal médio de 352,13±27,04 kg, atividade cíclica regular e sem patologias do aparelho reprodutivo detectável por meio de exame ginecológico.

2.2-Manejo dos animais e delineamento experimental

Os animais foram mantidos em baias individuais (40m²), sem cama, sendo arraçoados duas vezes ao dia (07:00 h da manhã e 15:00 h da tarde). A quantidade de volumoso e concentrado foi ajustada diariamente para manter uma sobra entre 5 – 10% de matéria seca (MS). A quantidade total de volumoso mais concentrado oferecido para cada animal e também das sobras do dia anterior foram pesadas diariamente. Todos os animais foram pesados uma vez por semana.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em um arranjo fatorial 2X2, sendo os fatores, a dieta fornecida e a aplicação ou não de rBST (Lactotropin®, Elanco, EUA), com 10 repetições por tratamento e uma novilha como unidade experimental. Assim, os animais foram balanceados quanto à idade e peso corporal, sendo distribuídos em quatro grupos: DC-SL (dieta controle com 3% de extrato etéreo (EE) com base na matéria seca (MS) mais a aplicação de solução salina); OL-SL (dieta suplementada com óleo de soja calculada para oferecer, aproximadamente, 6% de EE na MS mais a aplicação de solução salina); DC-rBST (dieta controle com 3% de extrato etéreo (EE) com base na matéria seca (MS) mais a aplicação de 320 mg de rBST) e OL-rBST (dieta suplementada com óleo de soja calculada para oferecer, aproximadamente, 6% de EE na MS mais a aplicação de 320 mg de rBST). Em todos os grupos, a primeira aplicação de rBST ou solução salina foi sete dias após o primeiro estro depois do período de ajustamento e, sempre, sete dias após os estros dos ciclos estrais subsequentes ao período de

ajustamento de acordo com Gong et al. (1993). As dietas foram formuladas conforme as recomendações do National Research Council (NRC, 2001). As análises químico-bromatológicas dos ingredientes das dietas foram realizadas de acordo com AOAC (2005) (Tabela 1).

Tabela 1: Ingredientes e composição nutricional das dietas experimentais como porcentagem da Matéria Seca (MS)

Ingredientes	Dietas	
	Controle (DC)	Óleo (OL)
% da Matéria Seca		
Silagem de milho	81,90	81,68
Fubá de Milho	13,05	9,9
Farelo de Soja (48% de PB)	2,83	2,82
Óleo de soja	-	3,13
Uréia	1,28	1,55
Núcleo Mineral	0,57	0,56
Sulfato de Amônio	0,28	0,28
Premix Vitamínico	0,09	0,08
Composição Bromatológica		
PB ¹ % da MS	12,4	12,9
NEg ² Mcal / Kg MS	1,11	1,21
FDN ³ % da MS	41,4	40,9
FDN, % da MS (forragem)	66,0	65,0
NDT ⁴ _(1x) , % da MS	73,0	77,0
EE ⁵ , % da MS	3,0	6,1
CNF ⁶ , % da MS	43,0	40,0

¹PB – Proteína Bruta, ²NEg- Energia Líquida para ganho, ³FDN – Fibra Solúvel em Detergente Neutro, ⁴NDT – Nutrientes Digestíveis Totais (nível de manutenção), ⁵EE – Extrato Etéreo, ⁶CNF – Carboidrato não Fibroso.

As dietas foram similares na composição exceto para o extrato etéreo e a energia líquida para ganho de peso devido à adição de óleo de soja. A energia da dieta OL apresentou 0,10 Mcal / kg de MS a mais que a dieta DC.

As novilhas foram adaptadas às condições de manejo e alimentadas com a DC durante duas semanas antes do início do período experimental, com substituição parcial da dieta controle durante a 3ª semana na proporção de 20% até chegar a 100% da OL, nos tratamentos respectivos. As respectivas dietas, água e sal mineral foram fornecidos *ad libitum*.

Amostras de silagem e sobras foram coletadas diariamente e armazenadas em sacos plásticos à -20 °C, até completar o período de sete dias, compondo uma amostra semanal. Este procedimento foi repetido até o final do período experimental, para posterior análise bromatológica. Amostras do concentrado foram obtidas quinzenalmente e armazenadas em sacos plásticos a -20° C.

Durante as três semanas iniciais, todos os animais receberam duas aplicações de 500 mg de cloprostenol (Ciosin®, Coopers, Brasil), intramuscular, intervalada de 12 dias, de modo que após a segunda aplicação, a manifestação de estro coincidissem com o dia final do período de ajustamento dietético. O estro foi monitorado duas vezes ao dia durante uma hora (às 6h30 e às 17h30), com auxílio de rufião, e foram consideradas em estro as fêmeas que aceitaram a monta pelo rufião ou pelas companheiras de rebanho.

2.3-Ultrassonografia ovariana

Foi acompanhada a dinâmica folicular e a atividade luteal cíclica dos tratamentos somente durante os dois primeiros ciclos estrais não superovulados subsequentes ao início (dia zero) da administração completa das dietas e das aplicações de SL ou rBST e ao longo do primeiro ciclo estral superovulado (Figura 1). Para tanto, utilizou-se a avaliação ultrassonográfica (Aloka, mod. SSD-500) com um transdutor linear de 5 MHz. A ultrassonografia foi realizada via transretal, diariamente, no período da manhã, antes do fornecimento das aplicações de solução salina e rBST. As variáveis estudadas foram: número de ondas de crescimento folicular, duração do período interovulatório, dia de ocorrência das emergências das ondas de crescimento folicular, número de folículos dentro das

classes: I (0,3 – 0,59 cm de diâmetro), II (0,6 – 0,9 cm de diâmetro), III (1 -1,5 cm de diâmetro) e IV (> 1,5 cm de diâmetro), baseado em Rincón et al. (2019), diâmetro máximo dos folículos dominantes, taxa de crescimento folicular e o número de ondas de crescimento folicular, bem como a área de CL. Para resposta superovulatória, foram avaliados número de embriões totais, viáveis e degenerados.

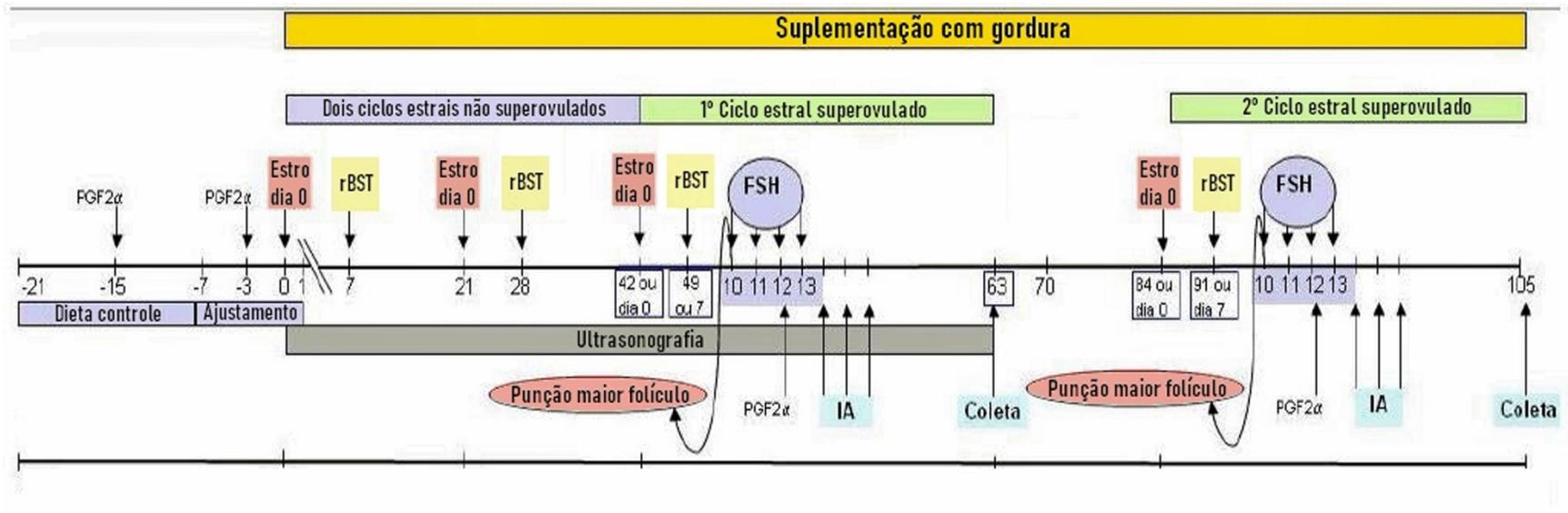


Figura 1: Protocolo esquematizado do grupo OL-rBST (dieta com óleo de soja e aplicação de somatotropina recombinante bovina-rBST). No dia 0, adaptadas às suas respectivas dietas, as novilhas foram monitoradas por meio de ultrassonografia ovariana, diariamente, durante os primeiros 42 dias (ou dois estros consecutivos) sem superovulação e mais um ciclo de 21 dias com superovulação. A superovulação começou no dia 10, quando os dois maiores folículos presentes nos ovários foram aspirados, e seguiu até o dia 13. Uma injeção de PGF2 α (Prostaglandina 2 α - Cloprostenol®) foi administrada na quinta aplicação de FSH (hormônio folículo estimulante) e as inseminações foram realizadas três momentos: na detecção do estro, 12 e 24 horas após. A coleta de embriões foi realizada no 7º dia após a primeira inseminação artificial (IA) e uma segunda coleta foi realizada 42 dias após a primeira, com os mesmos animais, que foram mantidos dentro de seu respectivo grupo até o final do experimento.

2.4-Protocolos de superovulação e punção folicular

A partir do 42º dia (1º ciclo estral superovulado) e do 84º dia (2º ciclo estral superovulado) de tratamento considerou-se o dia 0 (zero) como aquele de manifestação de estro, todas as novilhas foram superovuladas com 400 UI de FSH (Pluset®, Calier, Brasil) em doses diárias decrescentes durante quatro dias consecutivos (de 35, 30, 20 e 15%), com início no 10º dia após a manifestação de estro, administradas a cada 12 horas, por via intramuscular. Na quinta aplicação de FSH, as doadoras receberam 500 mg de cloprostenol (Ciosin®, Coopers, Brasil), intramuscular, para indução do estro. A primeira inseminação foi a partir do 1º estro e as subsequentes 12 e 24 horas após, com sêmen criopreservado, de um único touro, de uma única partida e de comprovada fertilidade.

No dia anterior ao início da primeira aplicação de FSH de cada ciclo superovulado, o maior folículo (dominante) e o 2º maior folículo foram aspirados transvaginalmente para otimizar a resposta superovulatória, e os fluidos foliculares dos dois folículos foram armazenados em tubos apropriados à temperatura de -20°C para posterior análise de lipoproteína de alta densidade (HDL), por meio de *kits* comerciais (HDL LD, Labtest, Brasil).

Previamente a punção folicular, os animais foram contidos em brete individual e passaram por anestesia pela aplicação de 3 a 5 mL de cloridrato de lidocaína a 2% com vasoconstritor (Anestt®, Syntec, Brasil), no espaço intervertebral sacrococcígeo, a fim de se conseguir uma anestesia epidural baixa, que facilitasse a manipulação da genitália durante o processo de punção folicular e coleta de embriões. Posteriormente, procedeu-se a higienização da vulva e região adjacente com o auxílio de água corrente e sabão neutro. A punção folicular foi feita durante os dois ciclos superovulados.

Para a aspiração folicular, foi utilizada agulha de diâmetro 50 X 12 (21 gauge) acoplada a um tubo de polietileno. A outra extremidade do tubo foi conectada a uma seringa de insulina de 1 mL (13X4 mm), com graduação de 20 µL. O percurso da agulha foi guiado por um transdutor transvaginal de 5,0/7,5 MHz, acoplado ao aparelho de ultrassom (Aloka, mod. SSD-500). Pela ecogenicidade da agulha após penetrar a parede vaginal e peritônio, sua ponta foi posicionada no antro do folículo e, com a seringa conectada a outra extremidade do tubo de polietileno, foi feita a sucção do fluido folicular.

2.5-Coleta e avaliação de embriões

A coleta de embriões foi feita durante os dois ciclos supeovulados pelo método não cirúrgico, sete dias após a primeira inseminação artificial do ciclo estral superovulado correspondente. O catéter de Foley (nº 18 ou 20) foi fixado em cada corno uterino após ter o seu balão inflado. O mandril foi retirado e procedeu-se a lavagem individual de cada corno, utilizando-se 500 mL da solução comercial PBS modificado (tampão fosfato salina) (DMPBS®, Biodux) aquecido a 37 °C, em coletor com filtro (Millipore®).

Terminada a coleta, medida pelo volume de líquido recuperado em um Erlemeyer de 1000 mL, o filtrado foi levado ao laboratório, transferido para uma placa de Petri de 9 cm de diâmetro, com fundo gradeado, onde foi feita a localização dos embriões com o auxílio de um microscópio estereoscópico (Coleman, mod. XTB-2B) (aumento de 40 vezes).

Posteriormente, as estruturas coletadas foram transferidas para uma placa de Petri de 5 cm de diâmetro, contendo a solução de PBS modificado enriquecido com 10% de soro fetal bovino inativado e estéril, procedendo-se a sua contagem e classificação quanto ao estágio de desenvolvimento e à qualidade (Stringfellow & Seidel, 1998).

2.6-Mensuração de progesterona plasmática

Amostras de sangue foram obtidas nos dias 7, 14 e 21 dos dois primeiros ciclos estrais não superovulados para dosagem de progesterona no plasma utilizando-se kits comerciais de radioimunoensaio (RIA) em fase sólida (Coat-a-count progesterone kit®, DPC, Diagnostic Products Co., USA). A coleta de sangue foi antes do exame ultrassonográfico, em estado pré-prandial, com tubo vacuolizado com EDTA, pela punção da artéria ou veia coccígea. Os tubos com as amostras foram centrifugados a 3.000 rpm por 15 min, para a completa separação do plasma, que foi recuperado com pipetas de Pasteur e transferido para um frasco esterilizado, identificado e estocado a uma temperatura de -20°C, até que fossem feitas as análises.

2.7-Análises estatísticas

As análises foram processadas pelo software estatístico Action R versão 3.0.2 (2014), segundo o modelo a seguir:

$$y_{ijk} = \mu + D_i + S_j + DS_{ij} + e_{ijk}$$

y_{ijk} = Observação no animal k na dieta j na solução aplicada i ;

μ = Média geral;

D_i = Efeito da dieta i , $i = 1,2$;

S_j = Efeito da aplicação de solução salina ou somatotropina j , $j = 1,2$;

DS_{ij} = Efeito da interação dieta x somatotropina;

e_{ijk} = erro associado a cada observação ijk .

As médias das características foram testadas pelo Teste Fisher (Teste F; duas comparações), processadas pelo R com nível de probabilidade de 5%.

3-RESULTADOS

Não houve diferença de consumo nos diferentes tratamentos para matéria seca (CMS), proteína bruta (PB), energia líquida para ganho de peso corporal (NEg), fibra insolúvel em detergente neutro (FDN), carboidratos não fibrosos (CNF) e para peso corporal ($P > 0,05$). Não obstante, foi verificado aumento de consumo de extrato etéreo (EE) nos grupos OL-SL e OL-rBST ($P > 0,05$) (Tabela 2). Esses resultados evidenciam que os tratamentos foram diferentes apenas para o consumo de EE não alterando o consumo dos demais componentes da dieta.

Tabela 2: Peso corporal e consumo diário de novilhas da raça holandesa tratadas com gordura dietética associada à somatotropina recombinante bovina.

Parâmetros	DC-SL	OL-SL	DC -rBST	OL-rBST	P value
Peso corporal (kg)	358,56±27,14	362,53±29,81	337,13±21,5	350,28±23,57	P=0,81
Matéria seca (kg / dia)	7,09±1,14	6,49±0,50	6,67±0,73	6,52±0,49	P=0,79
Matéria seca (%PV)	1,98±0,20	1,82±0,19	1,98±0,17	1,88±0,13	P=0,91
PB ¹ (kg / dia)	0,96±0,15	0,90±0,07	0,91±0,09	0,90±0,06	P=0,88
NEg ² (Mcal / dia)	7,85±0,59	7,94±0,60	7,36±1,21	7,91±1,29	P=0,78
FDN ³ (kg / dia)	3,26±0,53	3,03±0,22	3,05±0,34	3,04±0,22	P=0,85
EE ⁴ (kg / dia)	0,20±0,03 ^b	0,42±0,03 ^a	0,20±0,02 ^b	0,43±0,03 ^a	P=0,0
CNF ⁵ (kg / dia)	3,49±0,52	2,94±0,21	3,30±0,33	2,96±0,21	P=0,18

a, b Médias seguidas por diferentes letras, dentro da mesma linha, diferem entre si pelo Teste de Fisher ($P < 0,05$). DC-SL- dieta controle com aplicação de solução salina, OL-SL- dieta óleo de soja com aplicação de solução salina, DC-rBST- dieta controle com aplicação de somatotropina recombinante bovina, OL-rBST- dieta óleo de soja com aplicação de somatotropina recombinante bovina. ¹PB – Proteína Bruta, ²NEg - Energia Líquida para ganho, ³FDN – Fibra insolúvel em Detergente Neutro, ⁴EE – Extrato Etéreo, ⁵CNF – Carboidrato não Fibroso.

Não foram verificadas diferenças ($P > 0,05$) para o número de ondas foliculares em cada ciclo estral, período interovulatório e dias de emergências de ondas foliculares (Tabela 3). No OL-rBST foram verificados animais com três ondas foliculares, o que pode ter aumentado numericamente o período interovulatório (24,15±7,89 dias).

Não houve efeito entre os tratamentos sobre o número de folículos, diâmetro do folículo dominante e taxa de crescimento folicular ($P > 0,05$, Tabela 3). Os folículos foram classificados por tamanho e não houve efeito dos tratamentos no número de folículos nas diferentes classes ($P > 0,05$, Tabela 3).

Tabela 3: Parâmetros avaliados na dinâmica folicular ovariana e concentração de lipoproteína de alta densidade intrafolicular de novilhas tratadas com gordura dietética associada à somatotropina recombinante bovina

Parâmetros	DC-SL	OL-SL	DC-rBST	OL-rBST	P value
Nº de ondas foliculares/ciclo	2	2	2,2	2,2	-
Período interovulatório (dias)	21,14±2,79	21,56±3,28	22,33±3,98	24,15±7,89	P=0,40
Emergência Primeira onda (dias)	0,57±0,79	1,11±1,05	0,83±0,75	1,23±1,74	P=0,98
Emergência Segunda onda	8,14±4,34	9,00±2,00	9,5±2,35	10,31±1,37	P=0,61
Emergência Terceira onda				16,00±1,41	
Folículo					
Classe I (0,3-0,59 cm)	4,97±2,17	3,26 ±0,57	3,99±3,61	3,10±2,09	P=0,49
Classe II (0,6-0,9 cm)	2,51±0,75	2,12±0,56	1,85±0,54	1,88±1,03	P=0,37
Classe III (1,0-1,5 cm)	1,03±0,23	0,99±0,30	0,88±0,16	0,77±0,33	P=0,92
Classe IV (>1,5 cm)	0,30±0,48	0,11±0,14	0,08±0,09	0,19±0,31	P=0,16
Diâmetro do folículo dominante (cm)	1,49±0,15	1,53±1,14	1,62±0,26	1,60±0,34	P=0,66
Taxa de crescimento folicular (cm/dia)	0,11±0,03	0,13±0,03	0,15±0,03	0,15±0,09	P=0,80
Área do CL(cm ²)	4,23±0,50 ^b	4,21±1,00 ^b	3,62±2,12 ^b	4,67±0,67 ^a	P=0,04
HDL intrafolicular (mg/dL)	34,83±13,79 ^b	40,86±9,81 ^a	29,8±15,90 ^b	53,67±10,35 ^a	P=0,01

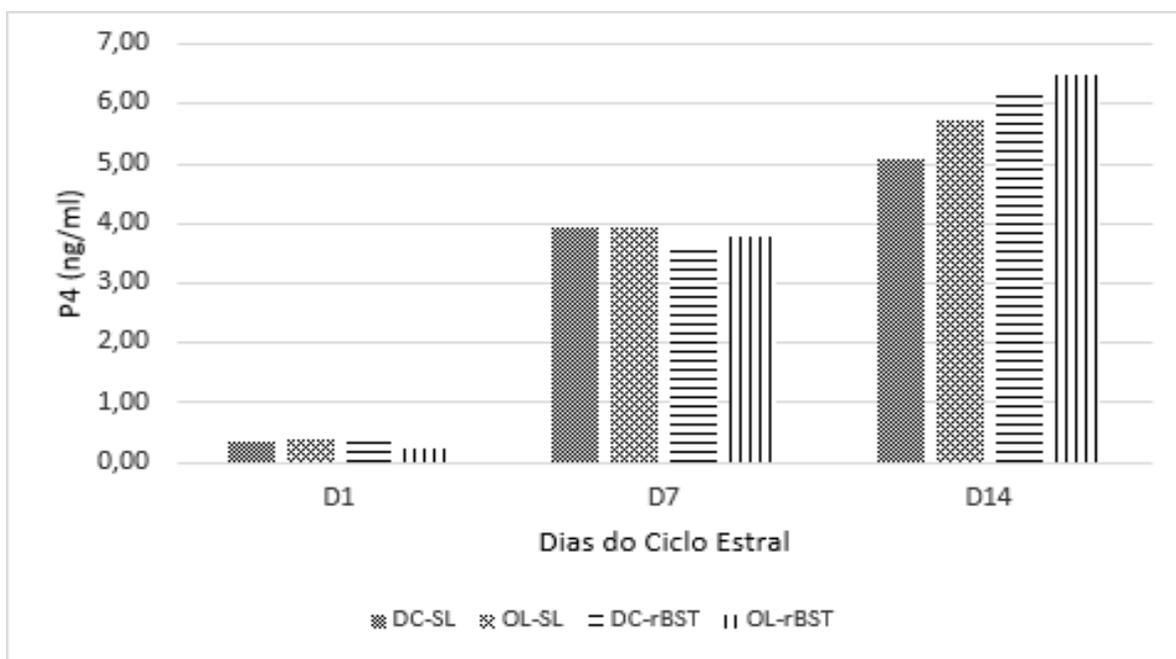
^{a, b} Médias seguidas por diferentes letras, dentro da mesma linha, diferem entre si pelo teste de Fisher (P <0,05). DC-SL- dieta controle com aplicação de solução salina, OL-SL- dieta óleo de soja com aplicação de solução salina, DC-rBST- dieta controle com aplicação de somatotropina recombinante bovina, OL-rBST- dieta óleo de soja com aplicação de somatotropina recombinante bovina. HDL- lipoproteína de alta densidade

Por outro lado, o grupo OL-rBST obteve maior área de CL (4,67±0,67 cm², P <0,05, Tabela 3). Um efeito (P <0,05) foi evidenciado para a concentração de HDL intrafolicular (mg/dL), apresentando maiores médias nos grupos de tratamentos gordura dietética (40,86±9,8 mg/dL) e gordura dietética associada à rBST (53,67±10,35 mg/d; Tabela 3).

A concentração de progesterona plasmática (P₄) não diferiu para os diferentes grupos de tratamento no dia 1 (DC-SL 0,35; OL-SL 0,38; DC-rBST 0,33 e OL-rBST 0,22 ng/mL, respectivamente), dia 7 (DC-SL 3,92; OL-SL 3,92; DC-rBST 3,55 e OL-rBST 3,79

ng/mL, $P=0,94$), e no dia 14 (DC-SL 5,03; OL-SL 5,73; DC-rBST 6,13 e OL-rBST 6,50 ng/mL, $P=0,68$) (Figura 2).

Figura 2: Concentração plasmática de progesterona (P_4) em novilhas da raça holandesa tratadas com gordura dietética associada à somatotropina recombinante bovina.



Não foi observado efeito dos tratamentos sobre o número total de embriões, embriões viáveis e degenerados ($P > 0,05$, Tabela 4).

Tabela 4: Resposta superovulatória em novilhas da raça holandesa tratadas com gordura dietética associada à somatotropina recombinante bovina

	DC-SL	OL-SL	DC-rBST	OL-rBST	P value
Nº Total de Embriões	10,83±7,31	6,00±3,32	11,50±8,74	10,13±8,58	$P=0,63$
Nº Embriões viáveis	5,17±2,22	3,50±3,67	9,00±8,19	7,00±6,955	$P=0,91$
Nº Embriões degenerados	5,67±5,57	2,50±1,60	2,50±0,58	3,13±3,50	$P=0,22$

^{a, b} * Teste de Fisher ($P < 0,05$). DC-SL- dieta controle com aplicação de solução salina, OL-SL- dieta óleo de soja com aplicação de solução salina, DC-rBST- dieta controle com aplicação de somatotropina recombinante bovina, OL-rBST- dieta óleo de soja com aplicação de somatotropina recombinante bovina

4-DISCUSSÃO

Neste trabalho não foram verificadas alterações de consumo dos componentes da dieta nos diferentes grupos, com exceção do EE que foi maior nos grupos suplementados com óleo de soja ($P < 0,05$). Resultados semelhantes foram relatados por Doyle et al. (2019) na administração de dietas com óleo de peixe, na qual não houve redução do consumo de matéria seca.

As fontes de lipídeos em dietas de ruminantes têm sido utilizadas como uma forma de aumentar a energia da dieta, principalmente em categorias de maior exigência nutricional. Entretanto, a gordura pode causar alterações no metabolismo ruminal, podendo modificar a flora microbiana e a digestibilidade (Chesini et al., 2019). Leroy et al. (2014) aconselham que o teor de lipídeo na dieta não ultrapasse 5%, evitando-se que haja efeito negativo na digestibilidade da fibra alimentar, no consumo e mudanças da população celulolítica, conseqüentemente, uma menor disponibilidade de energia (Carneiro et al., 2017; Chesini et al., 2019; Mahdavi et al., 2019).

Após a ingestão, os ácidos graxos polinsaturados (AGPs) são hidrolizados e biohidrogenados (Carneiro et al., 2017). A biohidrogenação age como detoxificante, protegendo os microorganismos ruminais do efeito deletério dos AGPs, uma vez que estes são tóxicos a muitas bactérias ruminais (Silva et al. 2014). Níveis altos de gordura podem ainda exceder a capacidade de biohidrogenação, ocasionando acúmulo de AGPs no rúmen, interferindo na fermentação (Carneiro et al., 2017). Apesar do aumento da concentração de lipídeos acima de 5%, no presente trabalho não foram verificados efeitos deletérios no consumo dos componentes da dieta.

Os dias de emergência das ondas foliculares e a quantidade de ondas por ciclo não diferiram do padrão encontrado para novilhas da raça Holandesa. Animais com três ondas de crescimento folicular foram observados no OL-rBST, o que aumentou numericamente o período interovulatório. Entretanto, o comprimento do ciclo estral verificado com rBST e óleo de soja está dentro dos padrões fisiológicos para a espécie, não mostrando diferença, já que o ciclo estral nos bovinos pode sofrer uma variação de 19 a 24 dias para ciclos com duas a três ondas de crescimento folicular (Miura, 2019; Soares et al., 2019).

No presente estudo não foi observado efeito da rBST associada ou não óleo de soja sobre o número de pequenos folículos. Rincón et al. (2019) obtiveram efeitos semelhantes, nos quais a rBST em uma única aplicação (500 mg) não foi capaz de aumentar o número total de folículos, assim como o tamanho de folículos pequenos. O mesmo foi relatado por Ribeiro et al. (2020), que não observaram diferenças na quantidade de folículos ovarianos quando testada dose de 250 e 500 mg de rBST para vacas da raça Sindi.

Tomando-se como base os relatos de Lucy (2011), uma explicação para os resultados encontrados no presente estudo é que a maioria dos efeitos da rBST parece ser sistêmico, ao invés de ações locais no folículo. Isto porque o receptor de rBST é expresso em células da granulosa, células do cumulus e ovócito, mas não parece controlar a expressão local de IGF-I no ovário. A rBST liga-se aos seus receptores no fígado, ativando-os, estimulando a produção e secreção de IGF-I, que é liberada na corrente sanguínea agindo no ovário nos receptores presentes nos folículos e estimulando a produção de estradiol (Lucy, 2011; Magalhães et al., 2012). Ainda, apesar de o mRNA de receptores de rBST serem encontrados em folículos ovarianos bovinos, a quantidade no folículo é extremamente baixa em relação à quantidade observada no CL (Lucy, 2011).

Lucy (2011) esclarece ainda que o número de folículos de tamanho médio recrutados até aumentou em vacas ou novilhas tratadas com rBST, mas precisariam de aplicações diárias ou de tratamento de liberação sustentada, que promoveriam efeitos indiretos mediados por mudanças na concentração de IGF-1.

É possível que novilhas tratadas com rBST possam até ter um aumento no número de folículos de tamanho médio, mas esses folículos não parecem responder à superovulação, por não se tornarem ovulatórios. Com base em dados *in vitro*, Lucy (2011) sugere que a maior atividade dos receptores de gonadotrofinas pelo efeito sinérgico com o IGF-1 retarda o processo de atresia na população de folículos recrutados, explicando aumento do número de folículos médios enquanto o número de folículos selecionados e ovulatórios permanece os mesmos.

O aumento de área de CL pode ser justificado pela proporção de diferentes AGPs fornecidos na dieta (Zachut et al., 2011). O ácido linoleico (Ômega 6) pode provocar a inibição competitiva das enzimas regulatórias envolvidas na síntese da $\text{PGF}_2\alpha$ (Fernandes & Madureira, 2013). Consequentemente à inibição da secreção $\text{PGF}_2\alpha$, há um atraso na

regressão do CL e aumento da sua meia vida (Hutchinson et al., 2012). O ômega-6 também tem sido associado ao maior número de células lúteas e volume de corpo lúteo em bovinos (Gulliver et al., 2012; Leroy et al., 2014).

Apesar dos efeitos positivos potenciais relacionados à gordura fornecida na dieta, no grupo com OL-SL, não foi observado efeito significativo no CL. Entretanto, quando a gordura foi associada à rBST foi possível notar um efeito positivamente maior quanto a área de CL. Provavelmente o aumento do CL nesse grupo pode estar relacionado com uma ação sinérgica entre a rBST e a gordura, visto que há grande quantidade de mRNA para receptores de rBST no CL (Lucy, 2011; Dambit et al., 2014).

Além disso, as dietas ricas em ômega-6 estão associadas a maiores concentrações de colesterol e proteína reguladora esteroideogênica (StAR), o que pode estimular a produção de P_4 e melhorar a qualidade de ovócito e função do CL (Gulliver et al., 2012; Leroy et al., 2014). Entretanto, a concentração de progesterona plasmática se manteve dentro dos padrões fisiológicos da espécie nos diferentes grupos (Figura 1). Durante a fase folicular, a P_4 se manteve menor que 0,40 ng/mL aumentando na fase lútea, atingindo concentrações menores que 3,92 ng/mL, no dia 7, e maior que 5,03 ng/mL, no dia 14. Corroborando, Kozicki et al. (2018) observaram o ciclo estral fisiológico de vacas e obtiveram uma concentração média de P_4 menor que 5,48 ng/mL na fase folicular e maior 5,48 ng/mL na fase lútea.

Hass et al. (2007) esclarecem que o aumento da concentração de P_4 *in vitro* e *in vivo* é dose dependente. Assim, o aumento na concentração de P_4 pode ser obtida com uma dose maior de rBST que causa elevação na concentração de IGF-1 capaz de estimular a síntese de P_4 pelo CL. Além disso, a categoria animal deve ser levada em consideração, visto que novilhas tratadas com rBST durante o estro não tem o aumento satisfatório da concentração de P_4 , sendo encontradas maiores concentrações de P_4 com a utilização de rBST em vacas lactantes, cujas capacidades esteroideogênicas encontram-se comprometidas pela lactação. Assim, é possível que uma maior dose de rBST eleve a concentração de IGF-1, por aumentar a captação, absorção de lipoproteínas e esteroideogênese das células da granulosa e do tecido luteal, estimulando a síntese de P_4 em novilhas (Haas et al., 2007).

A hipercolesterolemia pode aumentar a concentração plasmática de P_4 em bovinos. Conquanto, no presente trabalho a gordura dietética não aumentou a P_4 (Leroy et al., 2014).

A relação entre os efeitos da suplementação de AGPs nas concentrações sistêmicas de P_4 na literatura é inconsistente, com relatos de aumento, diminuição ou nenhuma alteração. Vacas tratadas com uma emulsão de óleo de soja exibiram uma redução da depuração hepática de P_4 (Doyle et al., 2019). Isso indica que a disponibilidade de colesterol pode não ser o único fator limitante na síntese de P_4 , e que pode ter havido alterações nos mecanismos responsáveis pelas variações nas concentrações plasmáticas de P_4 observadas. Esses dados podem explicar por que nesse não houve aumento da P_4 , apesar do aumento de HDL intrafolicular, o qual reflexo do colesterol plasmático, mas não alterou a concentração de P_4 (Hutchinson et al., 2012).

Apesar do aumento de área de CL lúteo observado no tratamento OL-rBST, não houve diferença para a concentração plasmática de P_4 . Estes resultados sugerem que pode um maior número de células da granulosa submetidas a diferenciação na ovulação, ou aumento da sobrevivência dessas células após a formação do CL (Hutchinson et al., 2012). As células lúteas ovarianas utilizam o colesterol disponível para síntese de P_4 através da reserva de lipoproteínas conjugadas com o colesterol. Lipoproteínas de alta densidade em ruminantes carregam o colesterol para os tecidos esteroideogênicos como aqueles do fígado, ovários, adrenal e testículos (Fernandes et al., 2013).

Apesar de não ter havido diferença na concentração de P_4 , esses achados estão positivamente correlacionados com a concentração de colesterol HDL encontrados no fluido intrafolicular nos grupos DG-rBST e OL-SL (Tabela 1). As mudanças séricas na concentração de AGPs refletem também na composição de ácidos graxos do ambiente folicular, ou seja, os níveis plasmáticos de AGPs são correlacionados com os níveis no fluido folicular (Leroy et al., 2014). Possivelmente, por estes mecanismos, o óleo de soja associado à rBST proporcionou aumento de área de corpo lúteo e aumento de HDL intrafolicular.

Os grupos de tratados com rBST e gordura dietética não aumentaram a produção nem a qualidade de embriões. Lucy (2011) sugere que, embora inicialmente o uso de rBST em protocolos de superovulação se mostrou uma promessa, o tratamento com rBST não tem aumentado o número de ovulações e/ou o número de embriões recuperados e transferíveis após superovulação. Em contrapartida, quando doses pulsáteis de rBST foram

administradas por 63 dias, verificou-se o aumento do número de folículos dominantes e aumento da taxa de ovulação (Lucy, 2011).

Em animais submetidos à gordura dietética, os lipídios armazenados dentro dos ovócitos e embriões em estágios iniciais representam uma importante fonte de energia (McKeegan et al., 2012). Geralmente, a suplementação de ácidos graxos poli-insaturados na dieta exerce efeitos benéficos sobre qualidade de ovócito e embrião (Zachut et al., 2011). No entanto, ainda não é claro até que ponto a concentração de lipídio no ovócito e embrião *in vivo* em resposta a dieta suplementada impacta na qualidade embrionária. Além disso, deve ser considerado o efeito tempo na administração de gordura dietética, bem como quanto à quantidade e natureza do suplemento dietético.

5-CONCLUSÃO

A suplementação com óleo de soja (6% de Extrato Etéreo na base da Matéria Seca) associada à aplicação de 320 mg somatotropina recombinante bovina (rBST) durante a superovulação não provocou o aumento e uniformização da resposta superovulatória e recuperação embrionária de novilhas holandesas.

6-REFERÊNCIAS

Acosta D.A.V., Schneider A., Jacometo C.B., Rincón J.A., Cardoso F., Corrêa M.N. (2017). Effect of bovine somatotropin injection in late pregnant Holstein heifers on metabolic parameters and steroidogenic potential of the first postpartum dominant follicle. *Theriogenol.*, 104: 164-172.

Action, Portal. ACTION STAT. Disponível em: <<http://www.portalaction.com.br/sobre-action>>. Acesso em: 16 de junho de 2021.

Association of Official Analytical Chemists (2005). *Official Methods of Analysis* (17nd ed.). Gaithersburg: MD.

Biancucci A., Sbaragli T., Comin A., Sylla L., Monaci M., Peric T., Stradaoli G. (2016). Reducing treatments in cattle superovulation protocols by combining a pituitary extract

with a 5% hyaluronan solution: Is it able to diminish activation of the hypothalamic pituitary adrenal axis compared to the traditional protocol? *Theriogenol.*, 85: 914–921.

Bó, G.A., Mapletoft, R.J. (2014). Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenol.*, 81: 38–48.

Bó G.A., Rogan D.R., Mapletoft R.J. (2018). Pursuit of a method for single administration of pFSH for superstimulation in cattle: What we have learned. *Theriogenol.*, 112: 26-33.

Carneiro M.M.Y., Morais M.G., Tonissi R.H., Goes B., Filho E.C.C., Costa T.G., Batista R.S., Duarte L.L., Souza A.R.D.L. Anais da X Mostra Científica FAMEZ/UFMS, Campo Grande, Mato grosso do Sul, 2017, p. 240-247.

Chesini R.G., Rosa P.P., Nunes L.P., Xavier A.A.S., Rösler D.C., Camacho J.S., Oliveira A.P.T., Faria M.R. (2019). Suplementação de fontes de gordura na dieta de vacas leiteiras. *R. Cient. Rural*, 21: 356-386.

Costa N.P., Diaza A.G., Pugliesi G., Maldonado M.B.C., Scollari S.C., Mello P.B., Feltrin I., Giroto R., Castilho C., Membrive C.M.B. (2020). Effects of recombinant bovine somatotropin on pregnancy per artificial insemination, corpus luteum cellular composition and endometrial gland morphometry in beef cattle. *Theriogenol.*, 141: 180-185.

Dambit T.F., Santana V.C., Santos R.O., Ferreira M.A., Varoni P.C. (2014). Impactos do uso da somatotropina bovina recombinante (rbST) sobre a reprodução de ruminantes. *Pubmed*, 8: 1-18.

Doyle D.N., Lonergan P., Diskin M.G., Pierce K.M., Kelly A.K., Stanton C., Waters S.M., Parr M.H., Kenny D.A. (2019). Effect of dietary n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation and post-insemination plane of nutrition on systemic concentrations of metabolic analytes, progesterone, hepatic gene expression and embryo development and survival in beef heifers. *Theriogenol.*, 127: 102-113.

Fernandes R.H., Madureira E.H. (2013). Fat supplementation on reproduction of beef cattle. *Ars Vet.*, 29: 60-67.

Gong J.G., Bramley T.A., Wilmut I., Webb R. (1993). Effect of recombinant bovine somatotropin on the superovulatory response to pregnant mare serum gonadotropin in heifers. *Biol. Reprod.*, 48: 1141 – 1149.

Guggeri D., Meikle A., Carriquiry M., Barbieri B., Montossi F., Viñoles C. (2018). Long-term effect of early nutrition on endocrine parameters and liver and endometrial gene expression of the members of the somatotrophic axis in Hereford heifers. *Reprod. Dom. anim.*, 00: 1–7.

Gulliver C.E., Friend M.A. King B.J., Clayton E.H. (2012). The role of omega-3 polyunsaturated fatty acids in reproduction of sheep and cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, 131: 9-22.

Haas G.T.S., Fernandes C.A.C., Costa E.P., Torres C.A.A., Marques P.A.F., Lopes F.G., Paula T.A.R. (2007). Taxa de prenhez e concentração sérica de progesterona em novilhas receptoras de embrião tratadas com somatotropina recombinante bovina (rBST). *Ceres*, 54: 26-32.

Hutchinson I.A., Hennessy A.A., Waters S.M., Dewhurst R.J., Evans A.C.O., Lone.rgan P., Butler S.T. (2012). Effect of supplementation with different fat sources on the mechanisms involved in reproductive performance in lactating dairy cattle. *Theriogenol.*, 78: 12–27.

Kozicki L.E., Weber H.S., Bacher H.L., Ramos I.S., Gaievski F.R., Schaus M.V., Talini R., Weiss R.R., Galan B.T., Segui M.S., Aita C.A.M. (2018). Determination of progesterone concentration during the estrous cycle in dairy cows using a chemiluminescence assay. *R. Acad. Cienc. Anim.*, 16: 1-11.

Leroy J.L.M.R., Sturmey R.G., Hoeck V.V., Bie J., McKeegan P.J., Bols P.E.J. (2014). Dietary Fat Supplementation and the Consequences for Oocyte and Embryo Quality: Hype or Significant Benefit for Dairy Cow Reproduction? *Reprod. Dom. Anim.*, 49: 353–361.

Lucy M.C. (2011). Growth hormone regulation of follicular growth. *Reprod. Fertil Dev.*, 24: 19–28.

McKeegan P.J., Sturmey R.J. (2012). The role of fatty acids in oocyte and early embryo development. *Reprod. Fertil. Dev.*, 24: 59-67.

Magalhães D.M., Sales E.T., Padilha R.T., Silva T.F.P., Tonioli R., Figueiredo J.R. (2012). Hormônio do Crescimento (GH) e Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-I (IGF-I): importantes reguladores da foliculogênese in vivo e in vitro. *R. Bras. Reprod. Anim.*, 36: 32-38.

Mahdavi A.L.I., Mahdavi A.T.A., Darabighane B., Mead A., Lee M.R.F. (2019). Effects of soybean oil supplement to diets of lactating dairy cows, on productive performance, and milk fat acids profile: a meta-analysis. *J. Anim. Sci.*, 18: 809-819.

Maldonado G.J., Santos R.R., Lara R.R. (2015). Superovulatory response and embryo quality of Holstein heifers treated with one or two injections of somatotropin. R. Colomb. Cienc. Pecu, 28: 339-346.

Miura R. (2019). Physiological characteristics and effects on fertility of the first follicular wave dominant follicle in cattle. J. Reprod. Dev., 65: 289-295.

National Research Council. (2001). Nutrient requirements of dairy cattle. Washington, NAS, 7 ed., pp. 356.

Oosthuizen O., Fontes P.L.P., Henry D.D., Ciriaco F.M., Sanford C.D., Canal L.B., Moraes G.V., DiLorenzo N., Currin J.F., Clark S., Whittier W.D., Mercadante V.R.G., Lamb G.C. (2018). Administration of recombinant bovine somatotropin before fixed-time artificial insemination and the effects on fertility, embryo and fetal size in beef heifers. J. Anim. Sci., 96: 1894–1902.

Ribeiro L.G.M., Júnior E.S.L. (2020). Efeito da somatotropina bovina recombinante (rbST) na produção *In vivo* e na maturação *In vitro* de oócitos bovinos da raça Sindi. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 72: 25-32.

Rincón J.A.A., Diego B.D., Acosta A.V., Gasperin B.G., Rovani M.T., Pegoraro L.M.C., Corrêa M.N., Schneider A. (2019). Effect of treatment with recombinant bovine somatotropin (rbST) on the follicular population and on development in non-lactating dairy cows. Anim. Reprod. 16: 914–922.

Silva D.J., Queiroz A.C. (2002). Análises de alimentos (métodos químicos e biológicos). Viçosa, MG, Editora UFV, 3 ed., pp. 235.

Silva J.A., Zervoudakis L.K.H., Júnior M.F.D., Silva R.P., Tsuneda P.P., Silva L.E.S., Barbosa L.A.B. (2014). Utilização de gordura na dieta de vacas leiteiras. Pubvet, 8: 2030-2172.

Soares P.H.A., Junqueira F.S. (2019). Particularidades reprodutivas da fêmea bovina: Revisão. Pubvet, 13: 1-6.

Stringfellow D.A., Seidel S.M. (1998). Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. IETS, p. 112-113.

Tríbulo, A., Rogan D., Tribulo H., Tribulo R., Alasino R.V., Beltramo D., Bianco I., Mapletoft R.J, Bó G.A. (2011). Superstimulation of ovarian follicular development in beef cattle with a single intramuscular injection of folltropin-v. Anim. Reprod. Sci., 129: 7-13.

Zachut M., Arieli A., Moallem U. (2011). Incorporation of dietary n-3 fatty acids into ovarian compartments in dairy cows and the effects on hormonal and behavioral patterns around estrus. *Reprod.*, 141: 833–840.



PPIZ

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INTEGRADO EM ZOOTECNIA

UFRB / UFS

Universidade Federal de Sergipe
Pró-Reitora de Pós-Graduação e Pesquisa
Programa de Pós-Graduação Integrado em Zootecnia
Cidade Universitária Prof. José Aloísio de Campos
Av. Marechal Rondon s/n - São Cristóvão – SE